

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

**Impacto de la infección por el virus Dengue en la adecuación
del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*)**

PRESENTA:

Biól. Gloria Imelda Ruiz Guzmán

PROGRAMA:

Maestría en Ciencias de la Salud

Enfermedades infecciosas

Generación 2010

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Ramos Castañeda

Cuernavaca, Morelos. Junio de 2013.

ÍNDICE

Resumen	2
1. Introducción y antecedentes	3
2. Justificación.....	10
3. Objetivos, hipótesis y predicciones	11
4. Materiales y métodos	13
4.1 Mosquitos y virus	13
4.2 Diseño experimental.....	13
4.3 Análisis estadísticos	16
4.3.1 Supervivencia.....	16
4.3.2 Número de huevos	16
4.3.3 Proporción de adultos emergidos.....	17
4.3.4 Proporción sexual.....	17
5. Resultados	18
5.1 Supervivencia.....	18
5.2 Número de huevos	18
5.3 Proporción de adultos emergidos	19
5.4 Proporción sexual	20
5.5 Proporción de grupos que presentaron amplificación de DENV	20
6. Discusión.....	22
6.1 Efecto de la infección en las madres	24
6.2 Efecto de la infección en las hijas.....	28
7. Conclusiones	30
8. Perspectivas.....	31
9. Literatura citada.....	32

RESUMEN

Una de las relaciones más fascinantes y complejas en el campo de la biología evolutiva es la relación parásito-hospedero. En esta interacción antagonista, el parásito y el hospedero están sujetos a presiones selectivas que dan origen a la aparición de adaptaciones y contra-adaptaciones de uno u otro, y a esto se le conoce como la carrera armamentista parásito-hospedero. Sin embargo, la virulencia podría atenuarse cuando el parásito es transmitido de manera vertical (de la madre a la progenie) y en este caso se esperaría que el parásito incremente su propia adecuación favoreciendo la cantidad de progenie de su hospedero. En esta tesis analicé esta idea en el sistema virus Dengue (DENV)-mosquito *Aedes aegypti*, ya que el virus es transmitido de manera vertical y la infección que establece en el mosquito es aparentemente inocua. Se registró la supervivencia, fecundidad, fertilidad y proporción sexual en un grupo de hembras que adquirió el virus vía oral y en sus hijas que adquirieron el virus de manera vertical. La ingesta de DENV favoreció la fecundidad de las madres y no afectó la supervivencia ni fertilidad. Sin embargo, las hijas de las madres que ingirieron DENV vivieron menos que las hijas de las madres control, mientras que no se observó ninguna otra diferencia significativa, lo que muestra que la tasa de oviposición de las hijas DENV fue mayor que la de las hijas Control ya que aunque pusieron la misma cantidad de huevos, esto sucedió en menor tiempo. Estos resultados podrían deberse a: a) las madres adquirieron el virus vía oral y enfrentaron la infección con los recursos que ya tenían como hembras adultas, mientras que las hijas adquirieron el virus y enfrentaron la infección durante toda su vida y b) la proporción de hembras infectadas fue mayor en las madres que en las hijas, donde el efecto de la infección se diluyó.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La historia evolutiva y de biodiversidad es en gran medida una historia de evolución de las interacciones entre especies y la mayoría de los organismos han evolucionado de tal manera que muchas veces requieren interactuar con otras especies para sobrevivir. Por lo tanto, es habitual encontrar especies viviendo unas con otras en una interacción simbiótica, de comensales, mutualistas o parásitos ⁽¹⁾.

Una de las relaciones más fascinantes y complejas en el campo de la biología evolutiva es la relación parásito-hospedero, en esta interacción el parásito comúnmente altera la conducta del hospedero, desarrolla mecanismos que evaden la respuesta inmune y/o modifica algunos rasgos de historia de vida como la fecundidad y supervivencia ^(2,3,4,5,6). Por otra parte, el hospedero evita la infección activando la respuesta inmunitaria más eficiente que le permita eliminar al parásito, generar resistencia o incluso ser tolerante a la invasión parasítica ⁽⁷⁾.

Por ejemplo, el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, representa una amenaza para un amplio rango de insectos ⁽⁸⁾, no obstante, los insectos están preparados para lidiar contra este patógeno y para ello activan su respuesta inmunitaria. Mientras tanto, el hongo debe superar diferentes barreras y evitar su detección para ser exitoso infectando al hospedero. Por ejemplo, Wang & Leger ⁽⁹⁾ reportaron que los hemocitos del hospedero tienen la capacidad de reconocer e ingerir los conidios del hongo para erradicar la proliferación, sin embargo, no son capaces de reconocer los cuerpos hifales porque en esas estructuras el gen Mcl1 semeja un β -glucano y le permite al hongo pasar desapercibido por el sistema inmunitario del hospedero. Esto demuestra cómo a cada estrategia de defensa del hospedero, corresponde una contra estrategia de ataque del parásito, y viceversa, y en ambos casos está en juego la adecuación (éxito reproductivo y de supervivencia).

El enfoque clásico de la relación parásito-hospedero, sugiere que esta interacción es altamente costosa para ambos organismos, siendo el hospedero quien normalmente paga el mayor costo ^(2,10,11), ya que si los parásitos transmiten sus genes a la siguiente generación son

ellos quienes explotan al hospedero ⁽¹²⁾. Sin embargo, también se ha propuesto que los parásitos podrían causar el menor daño posible. Por ejemplo, existen parásitos cuya reproducción es reducida, no son muy dañinos y generalmente viven mucho tiempo asociados a un hospedero, en el caso contrario, existen parásitos que tienen un mayor éxito reproductivo, son más dañinos, pero tienen una supervivencia mínima ⁽¹²⁾. Estas diferentes estrategias están asociadas a características inherentes al parásito y al hospedero, como el modo de transmisión y la virulencia del parásito, o el sistema inmunitario, los rasgos de historia de vida y algunos factores ambientales como la temperatura ^(13,14).

En cuanto a las características del parásito relacionadas con su virulencia, cabe resaltar el modo de transmisión como una de las más importantes. La transmisión de un parásito puede darse de distintas maneras: (a) de manera vertical (o transovárica, de una madre infectada a su prole), (b) de manera horizontal (por ejemplo vía oral) ⁽¹⁵⁾, o (c) tanto de manera vertical como horizontal cuando el parásito utiliza algún vector u hospedero intermedio para ser transmitido a su hospedero final (Figura 1). Se ha reportado que los parásitos que se transmiten horizontalmente suelen tener una mayor virulencia que aquéllos que se transmiten de manera vertical ^(16,17), por lo que se cree que los parásitos transmitidos de una madre a su prole deberían causar el menor daño posible ya que ellos también se beneficiarían de un aumento en las poblaciones de hospederos.

Con esta evidencia Combes (12) sugiere que la relación parásito-hospedero puede ser visualizada desde un enfoque distinto al clásico, es decir, que no solamente es el parásito quien explota al hospedero, sino que el hospedero podría explotar al parásito si éste le provee de beneficios al maximizar su transmisión. Esto lo sugiere porque la inversión por parte de ambos no debería ocurrir a menos de que haya reciprocidad en el intercambio de beneficios entre ellos, y la teoría predice que los parásitos con transmisión vertical tienden a establecer una relación mutualista con sus hospederos (13).

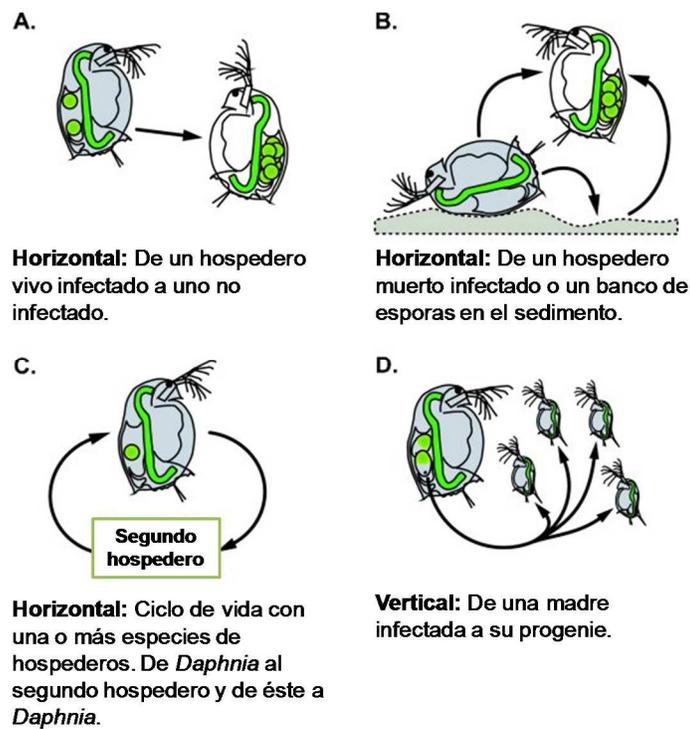


Figura 1 Diferentes modos de transmisión de los parásitos del micro crustáceo *Daphnia* (dibujos de Dita V. Visozo, imagen tomada y traducida de evolution.unibas.ch)

La bacteria *Wolbachia* infecta naturalmente a muchas especies de artrópodos, entre ellos *Drosophila simulans*. Hace 20 años se documentó que las moscas infectadas con esta bacteria tenían una menor fecundidad que las no infectadas, pero recientemente este efecto se ha invertido y se ha registrado que las moscas infectadas tienen una mayor fecundidad que las no infectadas. Estos trabajos revelan que después de ser un parásito que ocasionaba un costo en la fecundidad del hospedero, *Wolbachia* ha favorecido la fecundidad de su hospedero para aumentar su transmisión en la población de *D. simulans* ⁽¹⁸⁾ y poco a poco esta relación se ha ido volviendo benéfica. Esto sugiere que las bacterias transmitidas verticalmente generan beneficios en sus hospederos. Sin embargo, se sabe muy poco del impacto de los virus sobre su hospedero y los efectos que ocasionan durante la transmisión vertical ⁽¹⁹⁾.

En resumen, en la transmisión horizontal uno de los dos interactuantes obtiene más costos que beneficios mientras que en la transmisión vertical ambos pueden obtener beneficios. Sin embargo, cuando la transmisión horizontal y vertical ocurre en el mismo sistema, se esperaría que los costos o beneficios para ambos organismos estén balanceados, esto podría suceder porque el parásito no depende únicamente de uno u otro modo de transmisión sino de ambos. Los costos y beneficios no se han evaluado en un sistema que tenga transmisión vertical y horizontal al mismo tiempo.

El modelo de estudio utilizado en este trabajo para ponderar los costos y beneficios que obtiene un hospedero en relación al modo de transmisión del parásito fue la relación virus-mosquito, específicamente virus Dengue serotipo 2 (DENV-2)-mosquito *Aedes aegypti*. La razón es que el DENV es transmitido horizontal y verticalmente y la infección que establece en *Ae. aegypti* parece ser inocua ⁽²⁰⁾. La idea del efecto de la infección por DENV en el mosquito *Ae. aegypti* se ha puesto a prueba anteriormente, sin embargo esos resultados sólo han evaluado el efecto de la transmisión horizontal, al alimentar a las madres vía oral y no se ha indagado el efecto en las siguientes generaciones donde el virus es transmitido verticalmente. Además, el modo de infección por inoculación intratorácica en la mayoría de los estudios reportados podría afectar los resultados al ser un modo de infección no natural.

En esta relación mosquito-virus una hembra adquiere el virus después de ingerir sangre infectada de un humano. Después de la alimentación, las hembras depositan sus huevos durante los siguientes 3 ó 4 días, y éstos eclosionan de 1 a 3 días más tarde. Las larvas pasan por cuatro estadios de desarrollo alimentándose de microorganismos y partículas de materia orgánica. Cuando las larvas adquieren suficiente energía y tamaño se convierten en pupas, éstas no se alimentan y al paso de 1 ó 3 días se convierten en adultos. El ciclo de vida de *Ae. aegypti* dura de 8-10 días a temperatura ambiente y los mosquitos pueden vivir de uno a dos meses en condiciones naturales y alrededor de un mes en condiciones de laboratorio (²¹; Figura 2).

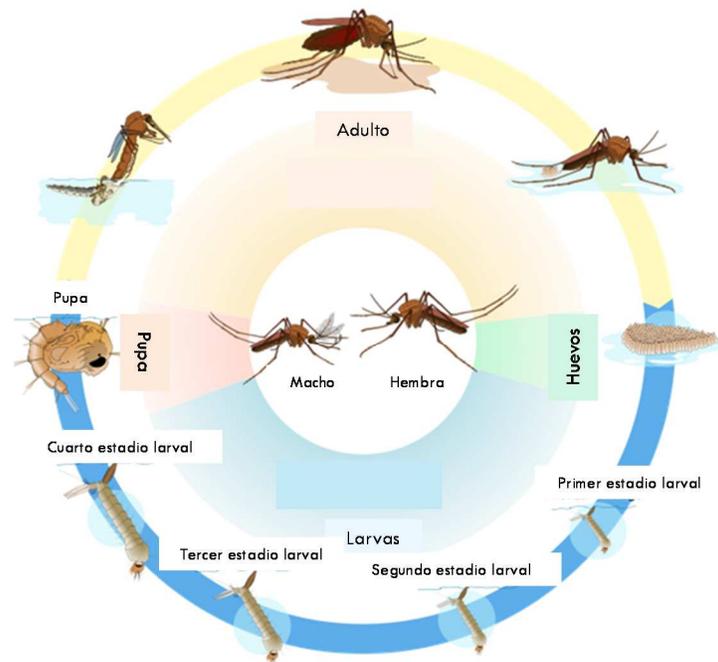


Figura 2 Ciclo de vida de *Ae. aegypti* (imagen tomada y traducida de infectionlandscapes.org)

Una vez que se establece una infección viral inicial en el intestino (que depende de la dosis viral ingerida), ésta se disemina a órganos blanco secundarios (ovarios, tejido nervioso, cuerpo graso, hemocele) para finalmente llegar a las glándulas salivales donde el virus se replica (Figura 3) y el mosquito puede picar e infectar a un humano. Posteriormente, pasan entre 7 y 14 días antes de que los mosquitos puedan transmitir el virus a un nuevo hospedero vertebrado ⁽²²⁾. El que se establezca una infección exitosa o no, e incluso el grado de infección en el mosquito depende de diversos factores, de entrada, el virus debe atravesar numerosas barreras morfológicas (membranas basales) y fisiológicas (factores de modulación del virus) para su diseminación dentro del mosquito. Además, el intestino y las glándulas salivales están envueltos en membranas, que consisten en múltiples láminas basales que dependiendo de la nutrición de la larva, pueden impedir o no, el movimiento del virus en esos órganos y otros tejidos ⁽²³⁾.

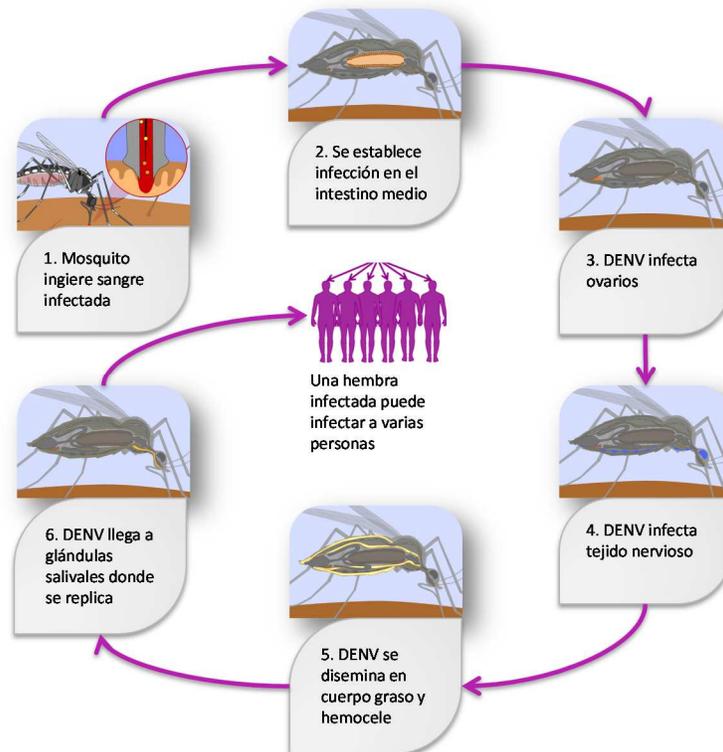


Figura 3 Secuencia de Infección por DENV en *Ae. aegypti* (imagen tomada de portaldoprofessor.mec.gov.br).

Para ponderar los beneficios y/o costos en la interacción DENV-*Ae. aegypti*, se compararon parámetros de adecuación entre hembras *Ae. aegypti* infectadas con DENV y no infectadas, en una cepa parental que adquirió el virus a través de la vía oral (madres) y lo transmitió de manera vertical a la F1 (hijas). Esta comparación es importante porque los trabajos del efecto del virus sobre parámetros de adecuación en el mosquito solamente han evaluado el efecto en las madres y no en la siguiente generación. La importancia de escudriñar esta idea es que si existe un aumento en la adecuación del mosquito durante la transmisión horizontal, la adecuación de la siguiente generación podría verse afectada. Para indagar lo anterior, se registró de manera individual la supervivencia, el número de huevos puestos y el número de mosquitos adultos emergidos para las madres y su progenie. Además, dado que son las hembras las que se alimentan de sangre y transmiten la enfermedad, se analizó si las hembras infectadas producían más hijas que hijos (²⁴). Al finalizar el experimento se corroboró la presencia del virus en una muestra de hembras de cada generación.

2. JUSTIFICACIÓN

En la interacción parásito-hospedero, el parásito no siempre afecta negativamente a su hospedero. En la transmisión vertical, un escenario es que el parásito favorezca su propia adecuación maximizando a su vez la adecuación de su hospedero, lo que conllevaría a una relación simbiótica positiva más que a una relación parasítica. Otro escenario es que el hospedero no obtenga beneficios pero tampoco costos elevados. Sin embargo, para evaluar esto se debe registrar la transmisión horizontal y al menos una generación de transmisión vertical. Los costos o beneficios de la infección por DENV han sido evaluados generalmente en una generación, es decir, en las madres que se infectan vía oral o por inoculación intratorácica, formas de infección consideradas como transmisión horizontal. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto de la infección por DENV en la adecuación de las madres *Ae. aegypti* y de su progenie al mismo tiempo, ni si en este caso la proporción sexual está sesgada a hembras, dado que son las hembras las que se alimentan con sangre. Una investigación de este tipo ayudaría a ponderar los costos y/o beneficios de la infección cuando el parásito es transmitido horizontal y verticalmente.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el efecto de la alimentación con DENV-2 mediante transmisión horizontal (vía oral) y vertical (transovárica) en la adecuación de hembras adultas de *Ae. aegypti*.

Objetivos particulares:

1. Determinar si existen beneficios de supervivencia y reproducción en la infección por DENV-2 en hembras *Ae. aegypti* (madres) que adquirieron el virus vía oral.

Hipótesis:

La infección por DENV-2 adquirido vía oral favorece la adecuación de las hembras de *Ae. aegypti* quienes van a transmitir el virus verticalmente.

Predicciones:

- a) La supervivencia, el número de huevos puestos y el número de adultos emergidos serán mayores en las madres infectadas que en las no infectadas.
- b) Las madres infectadas tendrán una mayor cantidad de hembras que machos en su progenie al ser comparadas con las no infectadas.

2. Determinar si existen beneficios de supervivencia y reproducción en la infección por DENV-2 en hembras *Ae. aegypti* (hijas de la cepa parental) que adquirieron el virus de manera vertical (transovárica).

Hipótesis:

La infección por DENV-2 mediante transmisión vertical, favorece la adecuación de las hembras de *Ae. aegypti*.

Predicciones:

a) La supervivencia, el número de huevos puestos y el número de adultos emergidos serán mayores en las hijas infectadas que en las no infectadas.

b) Las hijas infectadas tendrán una mayor cantidad de hembras que machos en su prole al ser comparadas con las no infectadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MOSQUITOS Y VIRUS

Los mosquitos adultos utilizados en este trabajo pertenecen a una cepa mexicana de *Ae. aegypti* proveniente de Cuernavaca, Morelos y criada durante 3 años (aproximadamente una generación por mes), esta cepa fue obtenida del insectario del Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos, y mantenida bajo condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y fotoperiodo (27°C, 70% y 12:12 luz oscuridad; ^{25,26}). En el caso del virus, se utilizó la cepa DENV-2 NGC (Nueva Guinea C), obtenida después de 2 pases en cerebro de ratón, el cual está diluido en medio MEM (Medio Esencial Mínimo) al 30%.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se establecieron dos grupos de hembras de *Ae. aegypti* en edad reproductiva y previamente apareadas (entre 4 y 5 días de edad). El grupo sin manipulación fue denominado grupo "Control", mientras que el grupo experimental fue denominado grupo "DENV". El grupo Control fue alimentado con una suspensión de 1 mL de eritrocitos de conejo, 2 mL de SFB y 1 mL de PBS (al que se adicionó azúcar y ATP para promover la alimentación). El grupo DENV fue alimentado con una suspensión de 1 mL de eritrocitos de conejo, 2 mL de SFB, 920 µL de PBS (al que se adicionó azúcar y ATP) y 80 µL de DENV-2 para mantener la proporción de virus 1:50 en el volumen final de alimento. Para aumentar la probabilidad de alimentación en los mosquitos, todas las hembras se alimentaron después de un día de privación de alimento.

La alimentación de ambos grupos se llevó a cabo con alimentadores artificiales, al mismo tiempo y durante una hora para asegurar que la mayoría de las hembras hubieran comido, durante ese tiempo, el alimento de ambos grupos tuvo una temperatura de 37°C. No todas las hembras comieron, por lo que después de ser alimentadas, sólo las hembras con el abdomen lleno de sangre fueron seleccionadas e individualizadas (aprox. 100 hembras por grupo) en tubos Falcon[®] de 50 mL que contenían algodón húmedo y un círculo de papel filtro sobre éste para propiciar la oviposición. A partir de este momento, las hembras fueron alimentadas

diariamente con algodones humedecidos en una solución de agua y azúcar al 10 % y la mortalidad fue registrada cada día.

Las hembras depositaron huevos entre el día 1 y 4 después de ser individualizadas. En el caso de las hembras que ovipositaron, se extrajo el papel filtro y los huevos de cada hembra fueron contabilizados y cuidadosamente colocados en un vaso de plástico con agua (y tapado con una malla) para posteriormente registrar el número de adultos emergidos y hacer el seguimiento por familia para cada hembra. Una vez que los adultos emergieron, se registró la proporción sexual de la progenie de cada una de las madres, y esos adultos fueron colocados en un recipiente etiquetado ya sea como Control o como DENV, para que hembras y machos se aparearan entre mosquitos del mismo grupo. Al cumplir los 5 días de edad, sólo las hembras fueron alimentadas nuevamente para conformar ahora los grupos Control y DENV correspondientes a las hijas. Cabe mencionar que ambos grupos de hijas (tanto de las madres Control como DENV) fueron alimentadas con el mismo alimento del grupo Control, es decir, ningún grupo hijas se alimentó con virus, ya que el objetivo fue propiciar exclusivamente la transmisión vertical. Entonces, para el registro de mortalidad, número de huevos, número de adultos emergidos y proporción sexual en las hijas, se llevó a cabo el método antes descrito en el caso de las madres.

Por otra parte, con la finalidad de corroborar la presencia del virus tanto en las madres como en las hijas, las hembras que murieron entre los 7 y 10 días post infección (cuando hubo una mayor representación del virus en el mosquito; Figura 4), y una muestra de hembras vivas elegidas al azar en esos mismos días, fueron guardadas en grupos de 5 en tubos *Eppendorf* a -70°C para posteriormente determinar la proporción de grupos infectados en cada generación, ésta se determinó por qRT-PCR. Primero se llevó a cabo la extracción de RNA viral utilizando el kit QIAamp *Viral RNA* Mini Kit®, posteriormente se realizó el qRT-PCR utilizando el kit QIAGEN *OneStep* RT-PCR Kit®. Los *primers* utilizados para cuantificar la amplificación de DENV-2 fueron: *Primer* 1) DENV qPCR + CATATTGACGCTGGGAAAGAC, *Primer* 2) DENV qPCR – TTCCATTTTCTGGCGTTCTGTG y la sonda Taqman: 6FAM AGATCCTGCTGTCTCCTCAG, las reacciones consistieron en un volumen final por reacción de 20 µL, conteniendo 4 µL de RNA

como templado y 0.46 μ L de los *primers* y la sonda Taqman. El aparato utilizado fue el qPCR *Real-Time PCR* de *Applied Biosystems*[®] con los siguientes ciclos de temperatura: 40°C por 30 minutos (1 ciclo), 92°C por 15 minutos (1 ciclo), 95°C por 15 segundos (40 ciclos) y 60°C por 1 minuto (40 ciclos). Al final se detectaron las muestras en las que hubo amplificación, las cuales fueron tomadas como positivas, para obtener la proporción de grupos positivos en cada generación.

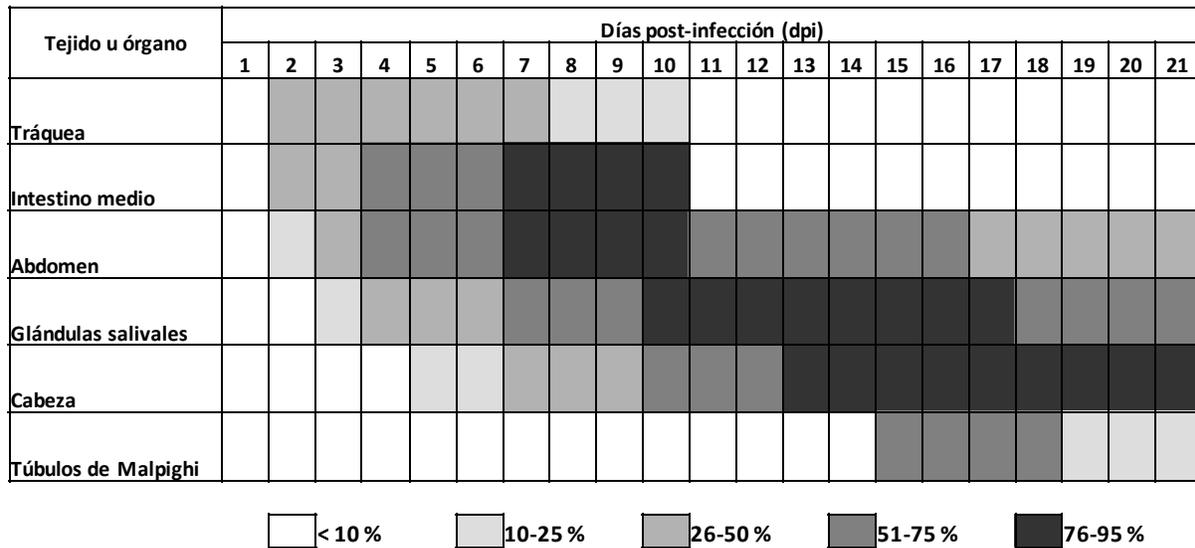


Figura 4 Dinámica de infección de DENV en *Ae. aegypti*. Se muestran los órganos o tejidos y los días post infección con el porcentaje probable de infección ⁽²⁷⁾.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis fueron realizados en el paquete estadístico R, y en todos se utilizó un intervalo de confianza del 95 %.

4.3.1 Supervivencia

Para calcular la función de supervivencia individual se empleó el estimador Kaplan-Meier. Para determinar si la diferencia entre curvas fue estadísticamente significativa o no, se utilizaron dos pruebas de hipótesis; la primera para verificar la existencia de riesgos proporcionales (prueba Grambsch y Therneau) y la segunda para contrastar la igualdad de las curvas de supervivencia (prueba log-rank o Gehan). El supuesto de riesgos proporcionales consiste en determinar si las fuerzas de mortalidad de ambos (o más) grupos son proporcionales. Esta prueba es importante ya que indica si se debe utilizar la prueba de log-rank o la prueba de Gehan para estimar si existe una diferencia significativa entre dos o más curvas de supervivencia. Si se cumple el supuesto de riesgos proporcionales la prueba más potente y adecuada es la de log-rank y si no existen riesgos proporcionales, la prueba más potente es la de Gehan. En el programa R se utilizó la paquetería *survival*.

4.3.2 Número de huevos

Para analizar esta variable, se utilizó un modelo GAMLSS (siglas en inglés para el Modelo Aditivo Generalizado para Localización, Escala y Forma) que es un tipo de modelo de regresión semiparamétrico que no sólo permite modelar la media, sino también otros parámetros de la distribución como la varianza y parámetros de forma, escritos en términos de variables explicativas. Para aplicar este modelo, se utilizó el criterio de información de Akaike, éste indica cuál de los modelos GAMLSS es el más adecuado para los datos y el que mejor se ajustó fue el modelo de regresión binomial negativa que modela la heterogeneidad (^{28,29}). Como variables explicativas para el número de huevos, se incluyeron la longevidad y el alimento. En el programa R se utilizó la paquetería *GAMLSS*.

4.3.3 Proporción de adultos emergidos

Un modelo adecuado para analizar la proporción de adultos emergidos es la distribución beta binomial. Ésta es una distribución que se utiliza para modelar el número de éxitos en n ensayos cuando la probabilidad de éxito p sigue una distribución Beta ⁽³⁰⁾. Las posibles variables explicativas incluidas en este análisis fueron el alimento y el número de huevos.

4.3.4 Proporción sexual

Para llevar a cabo el análisis estadístico de estos datos, también se utilizó el modelo de regresión binomial negativa, mencionado con anterioridad.

5. RESULTADOS

5.1 SUPERVIVENCIA

Respecto a la función de supervivencia bajo influencia del alimento, no se observaron diferencias entre la supervivencia de las Madres Control y las Madres DENV (log-rank, $X^2 = 0.4$; $p = 0.536$; Figura 5A). Sin embargo, las Hijas Control vivieron más que las Hijas DENV (log-rank, $X^2 = 5.3$; $p = 0.02$; Figura 5B).

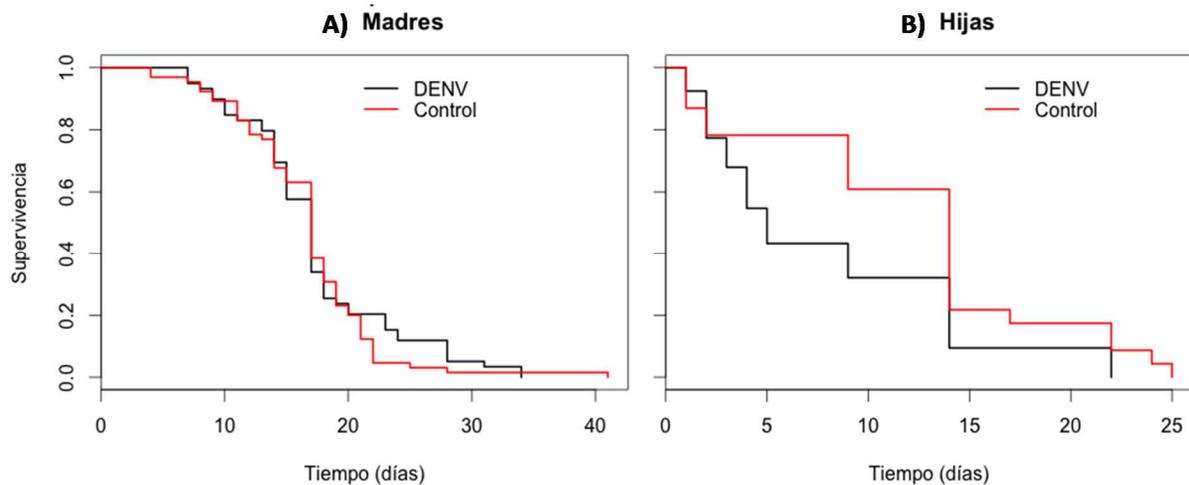


Figura 5 Supervivencia bajo la influencia del alimento (Control y DENV) en Madres (A) e Hijas (B).

5.2 NÚMERO DE HUEVOS

El alimento influyó significativamente en el número de huevos que pusieron las Madres: las hembras del grupo DENV pusieron más huevos que las hembras del grupo Control (Estimador = -0.4271 ; $t = -2.314$; $p = 2.216 \times 10^{-2}$; Figura 6A), mientras que en el caso de las Hijas, no existieron diferencias significativas (Estimador = 0.07502 ; $t = 1.873$; $p = 6.491 \times 10^{-2}$; Figura 6B).

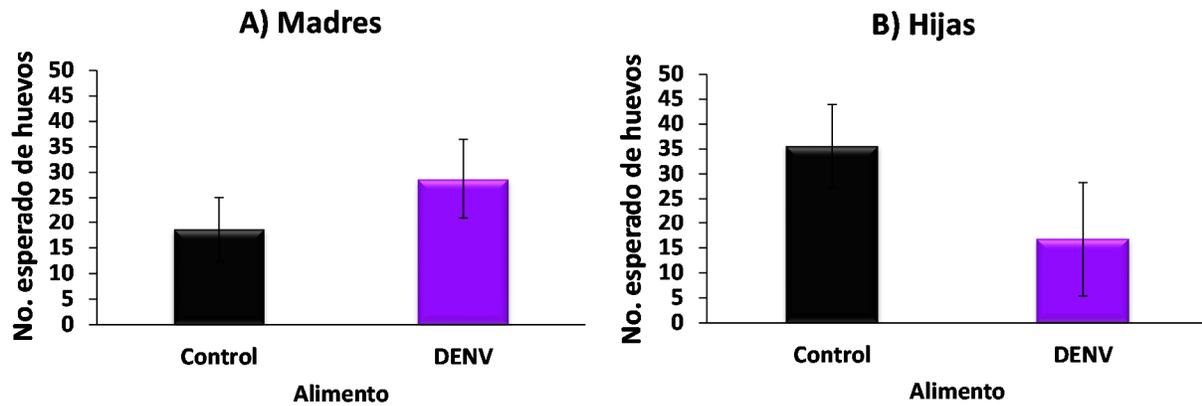


Figura 6 Número esperado de huevos para A) Madres y B) Hijas de los grupos Control y DENV \pm DE.

5.3 PROPORCIÓN DE ADULTOS EMERGIDOS

En Madres e Hijas, la proporción de adultos emergidos se vio influenciada negativamente por el número de huevos, es decir, a mayor número de huevos, emergió una menor proporción de adultos (Madres: estimador = -0.02008; EE = 0.004798; $t = -4.185$; $p = 5.573 \times 10^{-5}$; Figura 7A. Hijas: estimador = -0.02878; EE = 0.003227; $t = -8.92$; $p = 1.122 \times 10^{-11}$; Figura 7B), mientras que en ambos grupos el alimento no influyó en el número de adultos emergidos.

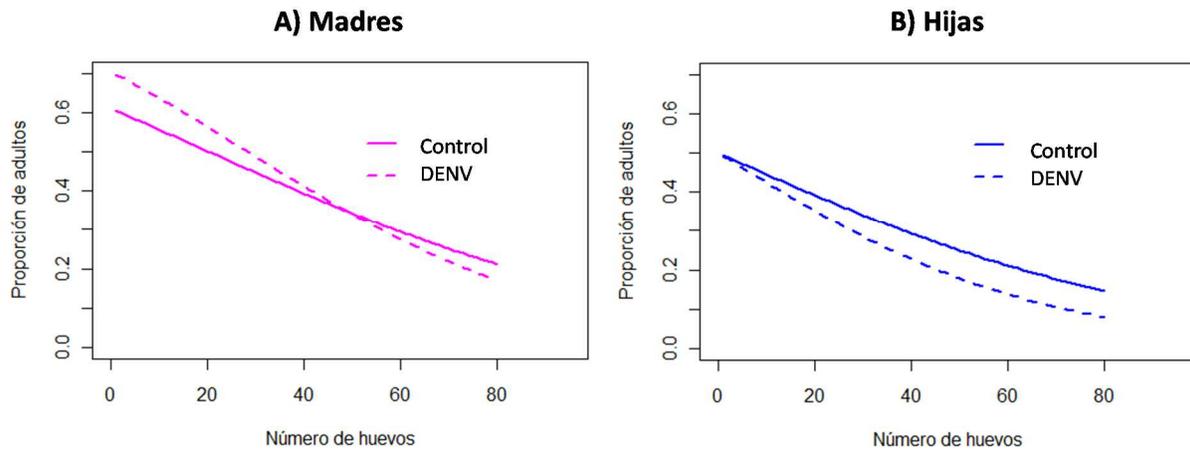


Figura 7 Proporción de adultos emergidos para A) Madres y B) Hijas de los grupos Control y DENV.

5.4 PROPORCIÓN SEXUAL

La proporción de hembras emergidas de manera general estuvo influenciada negativamente por el número de adultos emergidos, es decir, hubo menos hembras conforme el número de adultos aumentó (Madres: estimador = -0.02043; EE = 0.008088; $t = -2.526$; $p = 0.01311$; Hijas: estimador = -0.01914; EE = 0.01426; $t = -1.3426$; $p = 0.1876$). Las Madres Control tuvieron una mayor proporción de hembras en un 5% respecto a las Madres DENV (Figura 8A). En el caso de las Hijas, no hubo diferencia en la proporción de hembras entre los grupos Control y DENV (Figura 8B).

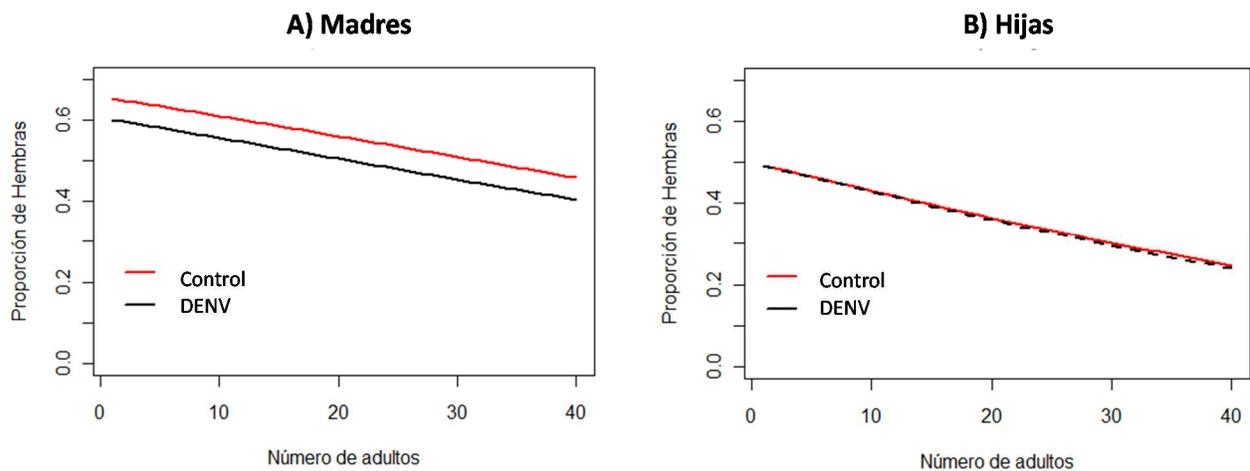


Figura 8 Proporción de hembras emergidas para A) Madres y B) Hijas de los grupos Control y DENV.

5.5 PROPORCIÓN DE GRUPOS QUE PRESENTARON AMPLIFICACIÓN DE DENV

Al final del experimento se corroboró la infección por DENV, los resultados de PCR en tiempo real arrojaron el número de grupos de hembras en los que la amplificación del virus fue detectada (Tabla 1).

Tabla 1. Número y porcentaje de grupos de Madres e Hijas en los que se detectó amplificación.

Grupo	No. de grupos positivos	Total de individuos analizados	Porcentaje de Infección
Madres	11 de 19	95	57.89%
Hijas	4 de 9	45	44.44%

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En una interacción biológica los organismos pueden verse beneficiados, perjudicados o no afectados, dependiendo del contexto en el que ocurra la interacción. Cuando los efectos positivos o negativos de una interacción se ven reflejados en los componentes de adecuación de uno de los implicados es probable que la interacción afecte procesos ecológicos o evolutivos ⁽³¹⁾.

Aunque los virus son frecuentemente estudiados como patógenos, muchos de ellos podrían resultar benéficos para su hospedero, pues proveen funciones esenciales (mutualistas obligados) en algunos casos y funciones benéficas condicionales en otros (proveen beneficios bajo ciertas condiciones ambientales) ⁽³²⁾. La idea de que cuando el virus es transmitido tanto horizontal como verticalmente, habrá beneficios bajo determinadas circunstancias fue puesta a prueba en este trabajo con el sistema virus Dengue-mosquito *Ae. aegypti* y los resultados de esta tesis apoyan parcialmente esa hipótesis. El efecto de la infección es distinto en madres e hijas (Tabla 2); las madres infectadas (MD) en comparación con las no infectadas (MC): (a) pusieron más huevos y (b) tuvieron un menor número de hembras emergidas, mientras que no se encontraron diferencias en (c) supervivencia ni en (d) el número de adultos emergidos. En lo que respecta a las hijas, las infectadas (HD) (a) vivieron menos que las no infectadas (HC), y no se encontraron diferencias significativas en (b) el número de huevos, (c) el número de adultos, ni en (d) el número de hembras emergidas. Cada una de estas observaciones es discutida a continuación.

Tabla 2. Resumen gráfico de resultados.

Generación	Supervivencia	Huevos puestos	Adultos Emergidos	Hembras emergidas
Madres DENV (MD) Madres Control (MC)	MD ≈ MC	MD > MC	MD ≈ MC	MD < MC
Hijas DENV (HD) Hijas Control (HC)	HD < HC	HD ≈ HC	HD ≈ HC	HD ≈ HC

La corroboración de infección mostró que 57.89 % de las madres estaban realmente infectadas. Esto concuerda con lo reportado previamente de que la exposición a DENV no siempre resulta en una infección exitosa ⁽³³⁾. Aunque el hecho de que no todas las hembras se infectaron podría ser un problema en la interpretación de los resultados, existe evidencia reciente que muestra que la respuesta de hembras *Ae. aegypti* tanto infectadas como expuestas a DENV adquirido vía oral (como en el caso de las madres) es prácticamente la misma ⁽³⁴⁾. Por lo tanto, en esta tesis se consideran hembras infectadas y expuestas dentro del grupo DENV, pero sin hacer distinción entre ellas, por lo que los resultados son discutidos desde el punto de vista poblacional y no individual.

Es importante mencionar también, que debido a las diferencias en el modo de infección y al uso de cepas susceptibles o resistentes a la infección en los diversos artículos publicados, resulta difícil hacer comparaciones directas con los resultados obtenidos en este estudio, donde se utilizó una cepa heterogénea a la infección. Sin embargo, creemos que nuestro método es mejor que los estudios previos por las siguientes razones: 1) la infección de las madres se llevó a cabo de manera oral, que es la manera natural de alimentación, a diferencia de otros estudios donde utilizan la inoculación intratorácica, 2) registramos una mayor cantidad de variables que nos proporcionan mayor información del efecto de la infección por DENV

(supervivencia, número de huevos, número de adultos emergidos y proporción sexual) mientras que los demás estudios se centran particularmente en la supervivencia y algunas veces en la fecundidad, 3) registramos el número de adultos emergidos en vez de la eclosión, lo que nos da una cifra más real del éxito reproductivo de las hembras al enfrentar la infección y 4) registramos el efecto de la infección en los componentes de adecuación no sólo en las madres, como el resto de los trabajos, sino también en sus hijas donde el virus es transmitido verticalmente. A continuación discuto los resultados separando el efecto de la infección de acuerdo con el modo de transmisión del virus; horizontal en las madres y vertical en las hijas.

6.1 EFECTO DE LA INFECCIÓN EN LAS MADRES

a) La infección por DENV no influye en la supervivencia de las hembras MD, quienes aun enfrentando al virus, vivieron lo mismo que aquéllas que no lo hicieron.

Maciel-de-Freitas *et al.* (34) y Sylvestre *et al.* (6) observaron una menor supervivencia en hembras *Ae. aegypti* infectadas vía oral con DENV-2 que en el grupo control. Sin embargo cabe aclarar que en esos dos estudios esta disminución de supervivencia sólo es observada en la cepa susceptible de hembras *Ae. aegypti*. Moutaliller *et al.* (2010¹⁰) también registraron una menor supervivencia en la cepa susceptible de *Ae. aegypti* infectada con DENV, mientras que las hembras infectadas pertenecientes a la cepa resistente tuvieron una mayor supervivencia que las no infectadas. Mientras tanto el resultado aquí observado muestra que en una cepa heterogénea, la infección por DENV no tiene efecto sobre la supervivencia. Esto es importante ya que las cepas de referencia han estado sujetas a una presión de selección artificial en laboratorio mientras que la cepa heterogénea podría ser un poco más parecida a la población de mosquitos en campo.

b) Continuando con la fecundidad observada en las madres, hay que destacar que las MD pusieron un mayor número de huevos que las MC sin que esto ocasionara un costo en su supervivencia.

La teoría de los compromisos (*trade-offs*) sugiere que existe competencia entre los rasgos de historia de vida debido a que los recursos son finitos y es difícil maximizar varios rasgos a la vez sin enfrentar compromisos en otros, como la supervivencia o reproducción futura ⁽³⁵⁾. Por tanto, se esperaría que si las MD pusieron más huevos en la primer oviposición, tuvieran un costo de supervivencia o de reproducción futura. Sin embargo, en este estudio sólo se registró la primer oviposición ya que se tuvo la evidencia de que el RNA viral de DENV estaba presente en los ovarios de *Ae. albopictus* desde el primer día post-infección y que los niveles de RNA viral en ovarios eran similares desde el día 1 hasta el día 27 post-infección ⁽³⁶⁾. En línea con lo anterior, Sylvestre *et al.* (6) reportaron un efecto negativo de la infección por DENV en la fecundidad de *Ae. aegypti*, en dicho estudio se registraron tres oviposiciones, éstas fueron al día 7, 14 y 21 días post-infección. En la primer oviposición el número de huevos fue mayor en las hembras infectadas que en las no infectadas, lo cual coincide con lo observado en el presente estudio, mientras que en las siguientes dos oviposiciones este resultado se invirtió, mostrando un efecto negativo en la fecundidad atribuido a la infección por DENV. Pero, como se ha citado anteriormente, es posible que esa observación también se deba a un costo de reproducción, que esté afectando la reproducción futura. Además, se sabe que los individuos de una cierta edad tienen un determinado valor reproductivo, y esto se debe a que la selección natural actúa para maximizar el valor reproductivo a cada edad, balanceando el desarrollo, el mantenimiento y la reproducción ⁽³⁷⁾.

Entonces, podría surgir la pregunta ¿por qué si las MD tuvieron un mayor número de huevos, no se observó un costo en la supervivencia o en algún otro rasgo de historia de vida? Efectivamente las MD parecen tener una buena condición, ya que a pesar de estar infectadas con DENV fueron capaces de maximizar su reproducción sin disminuir su supervivencia. Debido a que en este estudio sólo se registró la primer oviposición, no es posible determinar si habría existido un costo en la reproducción futura. Aunque de acuerdo con los resultados de Sylvestre *et al.* (6) es posible especular que probablemente en las próximas oviposiciones se hubiera registrado un menor número de huevos.

Moutaliller *et al.* (10) también encontraron que las hembras *Ae. aegypti* con infección diseminada por DENV, ponen más huevos que las no infectadas, independiente de si pertenecen a una cepa de mosquitos susceptible (*Ae. ae. aegypti*) o resistente (*Ae. ae. formosus*). Contrario a este resultado, Maciel-de-Freitas *et al.* (34) reportan nuevamente un efecto negativo en la fecundidad de las hembras *Ae. aegypti* infectadas con DENV, y aunque asocian ese resultado a la transmisión horizontal del virus (al ser adquirido vía oral), es posible que también haya influido el hecho de que el grupo control fue alimentado con 3 mL de sangre mientras que el grupo DENV se alimentó con 2mL de sangre y 1 mL del stock viral, es decir, la disponibilidad y concentración de sangre no fue la misma para ambos grupos, y como se sabe, la alimentación con sangre induce la vitelogénesis para activar la producción de huevos y la cantidad y calidad de la sangre ingerida determinan la cantidad y calidad de los huevos producidos (38,39). Además, esta baja fecundidad fue registrada y discutida únicamente en relación a las hembras pequeñas, cuando se sabe que en general un organismo pequeño se considera de menor calidad que un organismo de mayor tamaño al haber tenido acceso a una menor cantidad de recursos quizá por haber estado expuesto a un ambiente estresante (40).

c) Otra observación que apoya la idea de que las MD tienen una buena condición es que de acuerdo con la teoría (40) se esperaría entonces que si las MD pusieron una mayor cantidad de huevos que las MC sin disminuir su supervivencia, hubiera un costo en la fertilidad, definida en este estudio como el número de adultos emergidos que además son sexualmente maduros.

Se sabe que en un ambiente estresante donde el futuro podría ser incierto (por ejemplo, la infección por DENV) las hembras tienen a dirigir la mayoría de sus recursos a la producción de huevos, y al producir tantos huevos invierten menos recursos en cada uno de ellos y en consecuencia éstos son de menor calidad y es posible que emerjan en menor cantidad (35). Pero sorprendentemente, la fertilidad de las MD no decreció, sino que fue la misma que la de las MC que no enfrentaron la infección. En ese sentido, es importante mencionar que los pocos estudios que han reportado el efecto del DENV en la fertilidad de *Ae. aegypti* únicamente han registrado la eclosión de los huevos como una medida de éxito reproductivo, cuando se sabe que en este sistema una mejor medida de éxito o densidad poblacional de los mosquitos es

registrar la cantidad de larvas de cuarto estadio o mejor aún, la cantidad de pupas, ya que un muy pequeño porcentaje de larvas eclosionadas llegan a ser individuos adultos, lo cual es importante desde el punto de vista epidemiológico pues nos da una estimación más real de la densidad vectorial ⁽⁴¹⁾. En este trabajo se decidió registrar una medida aún más fina, que es el número de adultos sexualmente maduros, esta variable revela más cercanamente el éxito reproductivo del vector en la población. Entonces es muy probable que los resultados del efecto de la infección en la fertilidad presentados aquí, difieran en menor o mayor medida con los reportados en la literatura revisada.

d) Finalmente, para terminar de describir el efecto observado en las madres, y de acuerdo con el razonamiento expresado a lo largo del escrito, se predijo que las MD podrían tener una mayor proporción de hijas que de hijos en su progenie, lo cual sería una estrategia del virus para maximizar su transmisión. Sin embargo esta predicción no se cumplió, y se observó lo contrario, las MD tuvieron una mayor cantidad de machos de que hembras respecto a las MC.

Inicialmente se predijo lo anterior, sabiendo que los porcentajes de transmisión vertical registrados en este sistema son muy bajos ⁽³³⁾. En torno a esta idea, cabe destacar que esta estrategia de sesgar la proporción sexual es mayormente utilizada por parásitos cuyo único o principal modo de transmisión es la transmisión vertical, lo que significa que su presencia en las poblaciones de hospederos depende en un 100% de la eficiencia de transmisión vertical. Aunque este no es el caso del DENV, el cual se mantiene mayoritariamente a través de la transmisión horizontal en su hospedero humano, se sabe que algunos parásitos que distorsionan la proporción sexual, han tenido un grado de transmisión horizontal ⁽⁴²⁾. Sin embargo, la virulencia adicional causada por la transmisión horizontal, como en el caso de DENV en su hospedero humano, reduce la capacidad de las hembras para transmitir el parásito verticalmente, reduciendo con ello la eficiencia de la producción de hembras. No obstante, también es posible que las MD hayan producido un mayor número de machos que de hembras ya que la producción de huevos para las hembras fue costosa y dado que en la mayoría de las especies, el sexo más grande es el más costoso de producir, las hembras invierten en el sexo pequeño (los machos en el caso de *Ae. aegypti* ⁴³).

Respecto a este resultado, se ha documentado que los machos *Ae. albopictus* infectados por transmisión vertical con DENV también son capaces de transmitir el virus por vía venérea (en el eyaculado) a las hembras con las que se aparean ⁽⁴⁴⁾ y que esas hembras infectadas vía venérea pueden incluso transmitir el virus vía vertical a su prole ⁽⁴⁵⁾. Los resultados de proporción sexual aquí observados y esta idea de la transmisión en machos sugieren que es importante tomar en cuenta a los machos en la diseminación del DENV.

6.2 EFECTO DE LA INFECCIÓN EN LAS HIJAS

a) En las HD se observó un costo de la infección en la supervivencia, pero tuvieron el mismo número de huevos y de adultos emergidos que las HC. Además, no hubo diferencia entre la proporción sexual de las HD y las HC.

Al parecer la inversión reproductiva en las HD fue costosa y comprometió su supervivencia. Esto podría deberse al tiempo que ambas generaciones estuvieron en contacto con el virus: las madres en estado adulto, después de la alimentación y las hijas toda su vida. De acuerdo con la hipótesis de la inversión terminal, los organismos dan prioridad a la reproducción si su supervivencia está en riesgo ⁽⁴⁶⁾, lo que sugiere que las hembras priorizaron en cierta medida la reproducción a expensas de la supervivencia, pues a pesar de vivir menos, el número de huevos que pusieron fue igual que las HC que no enfrentaron la infección, es decir, tuvieron una mayor tasa de oviposición. Además, aun viviendo poco, el 40% de ellas se infectó y aunque no exista un aumento en la cantidad de huevos ni de adultos emergidos con respecto a las HC, este resultado muestra que aun así el virus quedó representado en el 40% de la población de hospederos. Es probable también, que el efecto observado en las hijas sea un costo de inversión de sus madres, quienes invirtieron recursos en la reproducción y no tuvieron algún costo de la infección.

Las HD tuvieron una cantidad de hembras similar a las HC. Aunque de entrada este resultado parece no mostrar algún efecto de la infección al no observar una tendencia significativa, es importante hacer notar que a diferencia de las madres, quienes produjeron más machos que hembras, en las hijas la producción de hembras de las HD tiende a igualar la

producción de hembras en las HC. Este resultado sugiere que aunque las MD pusieron muchos huevos y muchos de ellos llegaron a ser adultos, produjeron el sexo menos costoso, los machos. Mientras que la estrategia de las HD, fue producir menos huevos que llegaron a adultos en similar cantidad que los de las HC, pero produjeron el sexo más costoso, las hembras.

Los resultados de este trabajo muestran que la infección y exposición al DENV generan cambios en la adecuación de las hembras y sus crías, pero no se observó que todos los parámetros de adecuación incrementaran en las madres expuestas y sus crías. Esto sugiere que la interacción DENV-*Ae. aegypti* aún no es tan estrecha como para que ambos obtengan beneficios y esto podría deberse a que el modo de transmisión del DENV no es 100% vertical, sin embargo tampoco se observaron costos de la infección, lo que posiblemente sugiera que el DENV maximiza su transmisión pero al mismo tiempo preserva el mantenimiento de su hospedero.

Finalmente, se cree que la intensidad de la transmisión de dengue está ampliamente influenciada por la capacidad vectorial de *Ae. aegypti*, la densidad de población, la supervivencia, la susceptibilidad a la infección, la conducta de alimentación, entre otras características. Por ello se sugiere que es necesario entender cómo estos rasgos de historia de vida cambian durante la infección y cómo esto altera la competencia vectorial del mosquito.

7. CONCLUSIONES

1. La infección por DENV en el mosquito *Ae. aegypti* provee un beneficio reproductivo en las madres infectadas horizontalmente (vía oral). Las madres infectadas tuvieron más huevos que las no infectadas.
2. La infección por DENV genera un costo de supervivencia en las hijas infectadas verticalmente. Las hijas infectadas viven menos que las no infectadas.
3. Las madres infectadas tuvieron un sesgo en la proporción sexual de su progenie, emergieron más machos que hembras.
4. Se puede especular que la estrategia del virus es exitosa ya que, aunque en baja proporción, asegura su presencia y mantenimiento en la población de hospederos,
4. El hecho de que las madres infectadas horizontalmente hayan tenido un beneficio en su reproducción mientras que las hijas infectadas verticalmente hayan tenido un costo en su supervivencia puede deberse a la inversión de recursos de las madres, lo cual les costó en la siguiente generación.

8. PERSPECTIVAS

1. Los porcentajes de transmisión transovárica que se han registrado tanto en campo como en laboratorio del DENV en su hospedero *Ae. aegypti* son muy pequeños y muy variables, incluso hay quien duda de su existencia, sin embargo, no hay duda de que la transmisión vertical existe, pero su importancia en la persistencia del dengue en las poblaciones de hospederos es poco clara. Por lo tanto, sería mucho mejor realizar un estudio similar a éste, pero con un virus asociado a *Aedes* cuya único modo de transmisión sea el vertical como el CFV (*Cell fusion virus*), quizá en esa interacción los beneficios de la infección podrían ser mayores.
2. Hasta donde sabemos, no se ha registrado cuidadosamente el impacto del papel de los machos en la diseminación del virus en la población vectorial. Pero resultados previos sugieren que también es un tema importante, y se debería explorar más detenidamente.
3. Podría ser mejor registrar al menos 3 ó 4 ciclos gonadotrópicos para asegurar que el aumento en la fecundidad de las madres es ocasionado como efecto de la infección.
4. También sería útil comparar el efecto de la infección entre poblaciones de mosquitos silvestres y las cepas de referencia (susceptible y resistente) que han estado sujetas a presiones artificiales de selección, para conocer como varían cada una de las variables registradas bajo estos distintos escenarios.
4. Finalmente se sugiere registrar los parámetros de adecuación aquí reportados en una o dos generaciones más, lo cual nos daría mayor información sobre las estrategias empleadas ante la infección por DENV y la presencia de costos o beneficios en cada generación, además de que se podría determinar la persistencia del virus durante las generaciones.

9. LITERATURA CITADA

- ¹ **Thompson N. J. 1999.** The evolution of species interactions. *Science* **284**, 2116-2118.
- ² **Moore J. 2002.** Parasites and the behavior of animals. New York. Oxford University Press, pp. 315-316.
- ³ **Hurd, H. 2003.** Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology* **48**, 141-161.
- ⁴ **Lefèvre T., Adamo S. A., Biron D. G., Missé D., Hughes D. & Thomas F. 2009.** Invasion of the Body Snatchers: the diversity and evolution of manipulative strategies in host-parasite interactions. *Advances in Parasitology* **68**, 45-84.
- ⁵ **Poulin R. 2010.** Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions. *Advances in the Study of Behavior* **41**, Elsevier. DOI: 10.1016/S0065-3454(10)41005-0.
- ⁶ **Sylvestre G., Gandini M. & Maciel-de-Freitas R. 2013.** Age-dependent effects of oral infection with Dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feeding behavior, survival, oviposition success and fecundity. *Plos One* **8**, e59933.
- ⁷ **Svensson E. I. & Råberg L. 2010.** Resistance and tolerance in animal enemy-victim coevolution. *Trends in Ecology and Evolution* **25**, 267-274.
- ⁸ **Gottar M., Gobert V., Matskevich A. A., Reichhart J. M., Wang C., Butt T. M., Belvin M., Hoffman J. A. & Ferrandon D. 2006.** Dual detection of fungal infections in *Drosophila* through recognition of microbial structures and sensing of virulence factors. *Cell* **127**, 1425-1437.
- ⁹ **Wang C. & Leger R. J. St. 2006.** A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 6647-6652.
- ¹⁰ **Moutailler S., Guichoux E., Vazeille M. & Failloux A. B. 2010.** Differential mortalities of dengue-infected *Aedes aegypti*: preliminary results. *Annales de la Societe Entomologique de France* **46**, No. 3.
- ¹¹ **Poulin R. 2011.** Evolutionary ecology of parasites. Princeton University Press.
- ¹² **Combes, C. 2005.** The art of being a parasite. The University of Chicago Press, pp. 291.
- ¹³ **Ouedraogo R. M., Cusson M., Goettel M. & Brodeur J. 2003.** Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology* **82**, 103-109.
- ¹⁴ **Thomas F., Brodeur J., Maure F., Franceschi N., Blanchet S. & Rigaud T. 2011.** Intraspecific variability in host manipulation by parasites. *Infection, Genetics and Evolution* **11**, 262-269.
- ¹⁵ **Weaver S. C. & Reisen W. K. 2010.** Present and future arboviral threats. *Antiviral Research* **85**, 328.

-
- ¹⁶ **Vautrin E. & Vavre F. 2008.** Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict? *Trends in Microbiology* **17**, 95-99.
- ¹⁷ **Magalon H., Nidelet T., Martin G. & Kaltz O. 2010.** Host growth conditions influence experimental evolution of life history and virulence of a parasite with vertical and horizontal transmission. *Evolution* **64**, 2126-2138.
- ¹⁸ **Weeks A. R., Turelli M., Harcombe W. R., Reynolds K. T. & Hoffmann A. A. 2007.** From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology* **5**, e114. doi:10.1371/journal.pbio.0050114.
- ¹⁹ **Longdon B. & Jiggins F. M. 2012.** Vertically transmitted viral endosymbionts of insects: do sigma viruses walk alone? *Proceedings of the Royal Society B* **279**, 3889-3898.
- ²⁰ **Weaver SC, Barrett ADT. 2004.** Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews* **2**, 789-801.
- ²¹ **CDC.** Disponible en línea (http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html) Consultado el 29 de marzo de 2013.
- ²² **Alto B. W., Lounibos P. L., Mores C. H., Reiskind M. H. 2008.** Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. *Proceedings of the Royal Society* **275**, 463-471.
- ²³ **Hardy J. L., Houk E. J., Kramer L. D., Reeves W. C. 1983.** Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Review of Entomology* **28**, 229-262.
- ²⁴ **Engelstädter J. & Hurst G. D. 2009.** The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**, 127-149.
- ²⁵ **Ng'habi K. R., John B., Nkwengulila G., Knols B. G. J., Killeen G. F. & Ferguson H. M. 2005.** Effect of larval crowding on mating competitiveness of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Malaria Journal* **4**, 49-52.
- ²⁶ **Huho B. J., Ng'habi K. R., Killeen G. F., Nkwengulila G., Knols B. G. & Ferguson H. M. 2007.** Nature beats nurture: a case study of the physiological fitness of free-living and laboratory-reared male *Anopheles gambiae* s. l. *The Journal of Experimental Biology* **210**, 2939-2947.
- ²⁷ **Salazar M. I., Richardson J. H., Sánchez-Vargas I, Olson K. E. & Beaty B. J. 2007.** Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology* **7**, 9.
- ²⁸ **R-project.** Disponible en línea (<http://www.r-project.org/>) Consultado el 15 de enero de 2013.
- ²⁹ **Rigby R. A. & Stasinopoulos D. M. 2005.** Generalized additive models for location, scale and shape. *Journal of the Royal Society C (Applied Statistics)* **54**, 507-554.

-
- ³⁰ **Luceño A., González F. J. 2004.** Métodos estadísticos para medir, describir y controlar la variabilidad. Servicio de publicaciones de la Universidad de Cantabria.
- ³¹ **Boege K. & Del Val E. 2012.** Bichos vemos, relaciones no sabemos: diversidad e importancia de las interacciones bióticas. *Ciencias* **102** (102).
- ³² **Roossinck M. J. 2011.** The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 99-108.
- ³³ **Adams B. & Boots M. 2010.** How important is vertical transmission in mosquitoes for the persistence of dengue? Insights from a mathematical model. *Epidemics* **2**, 1-10.
- ³⁴ **Maciel-de-Freitas R., Koella J. C. & Lourenço-de-Oliveira R. 2011.** Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **105**, 452-458.
- ³⁵ **Stearns S. C. 1992.** The Evolution of Life Histories. Oxford University Press. Life history tactics: a review of the ideas. *Quarterly Review of Biology* **51**, 3-47.
- ³⁶ **Zhang M., Zheng X., Wu Y., Gan M., He A., Li Z., Liu J. & Zhan X. 2010.** Quantitative analysis of replication and tropisms of Dengue virus type 2 in *Aedes albopictus*. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* **83**, 700-707.
- ³⁷ **Sheldon B. C. & Verhulst S. 1996.** Ecological immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 317-321.
- ³⁸ **Regis L. 1979.** The role of the blood meal in egg-laying periodicity and fecundity in *Triatoma infestans*. *International Journal of Invertebrate Reproduction* **1**, 187-195.
- ³⁹ **Attardo G. M., Hansen I. A. & Raikhel A. S. 2005.** Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 661-675.
- ⁴⁰ **Edward D. A. & Chapman T. 2011.** Mechanisms underlying reproductive trade-offs: Costs of reproduction. *Mechanisms of life history evolution. The genetics and physiology of life-history trade-offs.* Oxford University Press, Oxford, 137-152.
- ⁴¹ **Wai K. T., Arunachalam N., Tana S., Espino F., Kittayapong P., Abeyewickreme W., & Petzoid M.** Estimating dengue vector abundance in the wet and dry season: implications for targeted vector control in urban and peri-urban Asia. *Pathogens and global health* **106**, 436-445.
- ⁴² **Jiggins F. M., Hurst G. D. & Majerus M. E. 2000.** Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **267**, 69-73.

⁴³ **Trivers R. L. & Willard D. E. 1973.** Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. *Science* **179**, 90-92.

⁴⁴ **Rosen L. 1987.** Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **38**, 398-402.

⁴⁵ **Leon R. 1987.** Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **37**, 398-402.

⁴⁶ **Clutton-Brock T. H. 1984.** Reproductive Effort and Terminal Investment in *Iteroparous* Animals. *The American Naturalist* 123, No. 2, pp. 212-229.