

**VIGILANCIA ENTOMO-VIROLÓGICA DE ARBOVIRUS EN EL DISTRITO DE
SANTA MARTA, COLOMBIA. 2018 - 2019**

JUAN PABLO FRANCO-SALAZAR

CORPORACIÓN ACADÉMICA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLÍN

2022

**Vigilancia Entomo-Viológica de arbovirus en el Distrito de Santa Marta,
Colombia. 2018 – 2019**

**Tesis para optar al título de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Énfasis en Virología Universidad de Antioquia**

Presenta

Juan Pablo Franco-Salazar, *BSc*

Director

José Aldemar Usme-Ciro, *PhD*

Codirector

Winston Rojas Montoya, *PhD*

Comité tutorial

Gabriel Parra-Henao, *PhD*

Jaime Eduardo Castellanos, *PhD*

Katherine Laiton Donato, *PhD(c)*

**CORPORACIÓN ACADÉMICA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN**

2022

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	13
1.1 Vigilancia entomo-virológica.....	13
1.1.1 Arbovirus	13
1.1.2 Virus insecto específicos (ISV, del inglés <i>Insect-specific viruses</i>)	17
1.1.3 Elementos virales endógenos (EVE, del inglés <i>Endogenous Viral Elements</i>)	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
2.3 Objetivos	23
2.3.1 Objetivo general.....	23
2.3.1.1 Objetivos específicos.....	23
3. Entomologic and virologic surveillance of flaviviruses and alphaviruses in the District of Santa Marta, Colombia, 2018-2019.	24
Abstract	25
Keywords.....	26
Introduction	26
Materials and Methods.....	28
Study area	28
Entomological study.....	30
Total RNA extraction	31
cDNA Synthesis and Generic and Specific PCR assays.....	31
Sequencing and sequence handling.....	32
Genetic diversity and phylogenetic analysis	32
DNA extraction and barcoding analysis	33
Results	33
Diversity and abundance of mosquitoes in the different settings.....	33
Molecular detection of flaviviruses and alphaviruses.....	38
Different strains of DENV-1 are responsible for the 2018-2019 dengue epidemics in the city of Santa Marta.....	39
Cryptic circulation of ZIKV during a dengue epidemic	39
Molecular characterization of <i>Culex flavivirus</i>	40
Discussion.....	44
Conclusions	46

List of abbreviations	47
Acknowledgments	47
Funding.....	47
Authors' contributions	48
Competing interests	48
References.....	48
4. Integración ancestral de fragmentos virales en el genoma de los artrópodos y su papel en la dinámica actual de los arbovirus.....	61
Resumen.....	62
Palabras clave.....	63
Introducción	63
Relaciones coevolutivas entre los virus y sus hospederos.....	64
Endogenización de fragmentos virales a partir de virus de ARN no retrovirales	69
La vía de ARN que interactúa con PIWI es un potente mecanismo antiviral en insectos.....	74
Conclusiones	82
Referencias.....	83
5. Evidencia molecular de la presencia de un elemento viral endógeno (EVE) similar a Menghai flavivirus en mosquitos <i>Aedes aegypti</i> de la ciudad de Santa Marta, Colombia	100
Resumen.....	101
Introducción	102
Materiales y métodos	104
Muestreo.....	104
Identificación de especímenes.....	105
Extracción de ARN total.....	105
Síntesis de ADNc y ensayos PCR genéricos y específicos	105
Secuenciación y manejo de secuencias.....	106
Análisis filogenético.....	107
Resultados	107
Discusión	111
Conclusiones	114
Referencias.....	114
7. Conclusiones.....	130
8. Perspectivas	131
9. Referencias generales	133

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 3

Table 1. Virus detection in mosquito and sandfly pools	38
Supplementary table 1	57

Capítulo 5

Tabla 1. Identificación de secuencias estrechamente relacionadas a la secuencia de flavivirus CIST0332	108
Tabla 2. Identificación de NIRV en secuencias de ARN de virus no retroviral en <i>Aedes aegypti</i> , en zona urbana y rural de Santa Marta, Colombia	111

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Capítulo 3

Figure 1 Location of the three areas of study in the district of Santa Marta, Colombia. The colored circle determine the size of the pools obtained in the areas	29
Figure 2. Number.....	35
Figure 3.....	36
Figure 4. Number individuals for neighborhood of the urban area where the search for arboviruses was carried out, based on information from the Secretary of Health of Santa Marta of reported febrile cases.....	37
Figure 5. Phylogenetic reconstruction of the genus Flavivirus using the NS5 gene.....	41
Figure 7. Phylogenetic reconstruction of the Culex flavivirus.....	43

Capítulo 4

Figura 1. Esquema comparativo de la estructura de retrovirus, retrotransposon LTR y elementos LINE	69
Figura 2. Formación de NIRV en una célula infectada por un virus ARN no retroviral.	74
Figura 3. Modelo de biogénesis de piARN en <i>D. melanogaster</i>	80

Capítulo 5

Figura 1. Estrategia de amplificación a partir del genoma de Menghai flavivirus y de <i>Ae. aegypti</i>	106
Figura 2. Análisis filogenético de flavivirus insecto-específicos.....	109
Figura 3. Amplificación de regiones genómicas adyacentes al gen NS5 de flavivirus.....	110

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Salud para el Trópico (CIST) de la Universidad Cooperativa de Colombia sede Santa Marta; a los proyectos de MINCIENCIAS (Código 210477757671) y la convocatoria interna CONADI (Código INV1913) de la Universidad Cooperativa de Colombia

Este trabajo de tesis fue de gran importancia en mi vida, pues me permitió conocer personas maravillosas que me ayudaron a crecer académica y personalmente. En especial quiero expresar mi agradecimiento al doctor José A. Usme-Ciro, quien me dio la oportunidad de volver a la academia en el momento en que más lo necesitaba y, con su tiempo y contribuciones, me permitió andar por el camino correcto.

Al doctor Gabriel Parra-Henao, por compartir sus conocimientos, amistad y experiencia en el momento en que inicié esta nueva etapa de mi vida.

A la doctora Katherine Laiton-Donato por su apoyo y por siempre tener claro cómo darle continuidad a mi trabajo a través de los proyectos de la Universidad Cooperativa de Colombia y del Instituto Nacional de Salud de Colombia.

Al doctor Diego Alejandro Álvarez por su amistad y compañerismos que, desde mi pregrado, ha estado siempre dándome sus palabras de apoyo para que crea en mí.

A los miembros del comité asesor: los doctores Winston Rojas Montoya y Jaime Eduardo Castellano por sus comentarios en los comités del trabajo de investigación.

A los compañeros de la Secretaría de Salud del Distrito de Santa Marta: Erick Perdomo, Adalberto Duica y Juan Domínguez por compartir su experiencia en campo y a mis compañeros de la Universidad Cooperativa de Colombia: Paula Quintero, Andrew Muñoz y Sharon Pérez.

A Carolina, mi pareja, por motivarme a salir adelante y ser un ejemplo a seguir.

A mi abuela, madre, padre y hermana por estar siempre a mi lado acompañándome en mis metas y por ser siempre el apoyo necesario en mi vida. ¡Lo que soy hoy es por ellos!

ABREVIATURAS

Ago: *Argonaute*

AZT: *Azidothymidine*

CFAV: *Cell Fusing Agent virus*

CHIKV: *Chikungunya virus*

cISF: *classical ISF*

DENV: *Dengue virus*

EVE – *Endogenous Viral Element*

ERV – *Endogenous Retroviral Element*

miRNA: *MicroRNA*

piRNA: *PIWI-interacting RNA Enhancement*

RNAi: *RNA interference*

siRNA – *Small Interfering RNA*

TE: *Transposable Element*

RESUMEN

Las arbovirosis, son enfermedades transmitidas por vectores artrópodos con alta prevalencia en los países tropicales. Los flavivirus y los alfavirus son los géneros más relevantes de arbovirus que afectan a los humanos. La distribución de los arbovirus está determinada por el entorno geográfico en el que se encuentran los vectores y sus hospederos.

Para mitigar y encontrar estrategias de control de las arbovirosis, el sistema de salud cuenta con la vigilancia entomológica y el control vectorial, sin embargo, estos programas son incapaces de establecer con certeza las zonas de riesgo. El objetivo de este estudio fue establecer una vigilancia entomo-virológica de flavivirus y alfavirus en diferentes zonas (urbana, rural y selvática) del distrito de Santa Marta, Colombia. Las zonas seleccionadas fueron reportadas por la secretaria de salud del distrito de Santa Marta con casos febriles entre el periodo 2018-2019. Se capturaron un total de 3022 mosquitos adultos, de 14 géneros y 22 especies. Las especies más abundantes fueron: *Aedes (Ae.) aegypti* (56%), *Culex* sp. (7,7%), *Aedes* sp. (4,9 %), *Psorophora ciliata* (4,2 %) y *Lutzomyia* sp. (3,2 %), así como un elevado número de ejemplares indeterminados. Se extrajo de los mosquitos ARN total y se realizó un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de transcripción inversa (RT) para detectar flavivirus y alphavirus. A los grupos positivos se tipificaron para DENV, ZIKV y CHIKV.

De los 232 grupos analizados; 3 fueron positivos para DENV1, 1 para ZIKV en *Ae. aegypti*, 1 para *Culex flavivirus* en *Culex pipiens*, 51 para flavivirus genérico distribuidos en las siguientes especies *Ae. aegypti* (41), *Ae. taeniorhynchus* (1)

Culex pipiens (1), *Culex* spp (5) y dos grupos sin determinar. Para Menghai flavivirus fueron 13 grupos positivos en las especies *Ae. aegypti* (12) y *Ae. taeniorhynchus* (1).

La vigilancia entomo-viológica propuesta en esta investigación evidenció la presencia de zonas de transición, como escenarios que favorecen el contacto entre el humano y las especies de mosquitos propias de las zonas rural y selvática. Lo que resalta la importancia de esta estrategia para el monitoreo e identificación en tiempo real de cualquier cambio en la dinámica de las arbovirosis.

Esquema de la tesis

Esta tesis se estructura en 8 capítulos. El capítulo 1 contiene una introducción general enmarcada en la vigilancia entomo-virológica, resaltando la importancia y utilidad de esta metodología para la toma de decisiones en salud pública. El capítulo 2 exhibe el planteamiento de esta investigación, justificación y objetivos. En el capítulo 3 se presenta en formato de reporte científico los resultados entomológicos y virológicos obtenidos en el Distrito de Santa Marta, 2018-2019. El capítulo 4 se revisa el estado del arte de los elementos virales endógenos (EVE), hallazgos, importancia y perspectivas. El capítulo 5 reporta la primera evidencia de un posible EVE, en la población de *Aedes aegypti* en el Distrito de Santa Marta, Colombia. En el capítulo 6 se discute de forma general los resultados obtenidos en la investigación. El capítulo 7 y 8 contiene las conclusiones generales y perspectivas de esta investigación respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Vigilancia entomo-virológica

Es la integración de la entomología medica encargada de estudiar artrópodos de interés sanitario y la virología a través de la identificación por métodos moleculares de arbovirus. Detectando oportunamente la circulación de virus en vectores de importancia médica e interés en salud pública

Virus dengue (DENV), virus Zika (ZIKV), virus chikungunya (CHIKV) y virus de la fiebre amarilla (YFV) son arbovirus de gran preocupación siendo necesario una sólida vigilancia de vectores y programas de control necesarios para prevenir la transmisión de enfermedades.

1.1.1 Arbovirus

Los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos, del inglés *Arthropod-Borne Viruses*) son transmitidos por artrópodos hematófagos, principalmente mosquitos y garrapatas. Se designan como un grupo de virus que circula a través de un ciclo de transmisión, que requiere tres componentes: un vector (artrópodos), un huésped vertebrado y un patógeno (arbovirus).

El mantenimiento de los arbovirus se debe a la circulación entre el vector y el huésped a través de la picadura del vector a un vertebrado infectado. Los arbovirus circulan dentro de un ciclo enzoótico en el cual intervienen primates no humano y la preferencia del vector por alimentarse de animales. El comportamiento de los artrópodos de alimentarse tanto de animales como de humanos puede permitir el

paso del virus de animales a humanos y causar un cambio de ciclo selvático a un ciclo urbano (1).

La carga de las arbovirosis para el sistema de salud es alta, debido a los costos de la hospitalización de casos graves, diagnóstico, tratamiento, días laborales perdidos, educación a las comunidades, aplicación de medidas de control del vector y demás costos, como aquellos asociados a las secuelas congénito y a la muerte.

a. Virus dengue

DENV pertenece a la familia Flaviviridae y al género *Flavivirus*, virus transmitidos por mosquitos y garrapatas, así como otros agentes zoonóticos para los cuales no se ha demostrado la existencia de un vector artrópodo (2). DENV presenta cuatro serotipos genéticamente relacionados. Comparten aproximadamente el 65% de su genoma y son transmitidos a primates no humanos (ciclo selvático) y humanos (ciclo urbano). El DENV posee un genoma ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 11 kb, el cual contiene regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' (5' y 3' UTRs, del inglés *untranslated regions*) y una región codificante a partir de la cual se genera una poliproteína, que es posteriormente procesada por proteasas virales y de la célula hospedera, para dar origen a las tres proteínas estructurales [cápside (C), pre-membrana (prM), y envoltura (E)] y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (3). La amplia distribución del DENV, sus constantes picos epidémicos y la enfermedad grave que puede causar le han permitido convertirse en la

arbovirosis de mayor importancia en el mundo. A causa del DENV, aproximadamente 500 millones de personas en las Américas están hoy en riesgo, con una tendencia al aumento en las últimas cuatro décadas. Se registraron 1,5 millones de casos de dengue acumulados en la década de 1980-1989, aumentando a 16,2 millones en la década 2010-2019 (4). La detección de casos de los cuatro serotipos de DENV a través del tiempo y el continuo reemplazo cíclico de serotipos (5,6), evidencia el éxito en el establecimiento del virus en circulación endémica y su mantenimiento en las poblaciones de vectores. Los brotes causados por un cierto serotipo de DENV, demuestran que la dinámica de los arbovirus va más allá de la epidemiología basada en casos sintomáticos y justifica una vigilancia activa en los mosquitos, que permita reconocer su actividad y anticiparse al riesgo de transmisión en una población susceptible (5).

b. Virus Zika

ZIKV pertenece a la familia Flaviviridae, es un virus envuelto y esférico con un diámetro de aproximadamente 50 nm. Tiene un genoma de ARN de sentido positivo de una sola hebra de aproximadamente 10.8 kb. Es un patógeno en humanos al igual que el DENV, el virus del Nilo Occidental (WNV, *West Nile virus*), el virus de la encefalitis japonesa (JEV, *Japanese encephalitis virus*), el virus de la fiebre amarilla (YFV, *Yellow fever virus*), entre otros. Entre 2015 y 2016, la infección por ZIKV llegó a convertirse en una emergencia en salud pública de preocupación internacional, debido a su asociación con la ocurrencia de malformaciones como la

microcefalia en fetos de mujeres gestantes que adquirieron la infección, principalmente, durante el primer trimestre del embarazo (7).

c. Virus chikungunya

CHIKV pertenece a la familia *Togaviridae*, género *Alphavirus*. Es un virus envuelto de aproximadamente 65-70 nm de diámetro, su genoma es ARN de cadena sencilla de sentido positivo de entre 11 y 12 kb. El genoma contiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican cada uno para una poliproteína. La primera poliproteína se procesa en cuatro proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) y la segunda da origen a las cinco proteínas estructurales del virus (C, E3, E2, 6K, E1). CHIKV, genera mucha preocupación, debido a que en el 2015 afectó a toda la zona de América, ingresando por la Isla de Saint Martin (8)

d. Virus de la fiebre amarilla

YFV es un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Es un virus de cadena sencilla de ARN de polaridad positiva. Su genoma codifica una poliproteína de una total de diez proteínas, tres proteínas estructurales (C, M y E) y siete no estructurales (1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B y 5). La proteína E, participa en el tropismo celular, la virulencia y la inmunidad. Para las proteínas C y M, se ha descrito, en los mecanismos de la construcción de la cápside y la maduración de las partículas infecciosas respectivamente (9). Desde su ingreso a las Américas hace 300 a 400 años proveniente de África, causó un gran número de infecciones y muertes (10). Logrando establecerse en ciclos selvático y urbano. A pesar

de que existe una vacuna efectiva, casos de fiebre amarilla se presentan con frecuencia como resultado de la invasión de zonas selváticas y exposición a la picadura por mosquitos de los géneros *Haemagogus* y *Sabethes*, en personas no vacunadas (11).

Los virus anteriormente mencionados han sido reconocidos históricamente como los arbovirus más importantes, por su éxito en el establecimiento en ciclo urbano y la presencia de sus vectores alrededor del mundo en diversos ecosistemas e interacciones ecológicas (12).

En el caso específico de los flavivirus, éstos han sido clasificados como virus de doble hospedero (mosquito-vertebrado, garrapata-vertebrado), flavivirus específicos de vertebrados, nombrados flavivirus sin vector conocido; aislados en la naturaleza casi exclusivamente de vertebrados (murciélagos, roedores y ocasionalmente humanos) y nunca de artrópodos y por último, flavivirus insecto-específicos, aquellos que sólo han sido identificados en insectos y cuyos estudios in vitro e in vivo demuestran su incapacidad para infectar células de vertebrados (13).

1.1.2 Virus insecto específicos (ISV, del inglés *Insect-specific viruses*)

Los virus insecto-específicos son virus que infectan una gran variedad de especies de mosquitos, siendo los flavivirus insecto-específicos (ISFV, del inglés *Insect-specific flaviviruses*) los más frecuentemente reportados en vectores de arbovirus (14).

Los ISFV se han descrito en dos grupos: el primero se denomina los “ISFV clásicos” (ciSF) los cuales son un grupo muy diverso y más distante filogenéticamente de los

demás flavivirus conocidos. El primer cISF descrito fue el virus agente de fusión celular (CFAV), en 1975 (15), aislado de *Ae. aegypti*, el cual tuvo relevancia después de aproximadamente 30 años cuando se comenzó a identificar en varios países con la ayuda de los avances en biología molecular (14,16,17).

Recientemente se han descrito más cISF como el virus del Río Kamiti (KRV), aislado de *Ae. mocintoshi*, el *Culex flavivirus* (CxFV), *Aedes flavivirus* (AEFV), *Aedes galloisi flavivirus* (AGFV), virus Nakiwogo (NAKV) y el virus Palm Creek (PCV) (18)

El segundo grupo de los ISFV, denominado dISF, está más estrechamente relacionado filogenéticamente a los flavivirus de doble hospedero. Entre ellos se encuentran el virus de Noinané (NOUV), virus Barkdjo (BJV), virus Chaoyang (CHAOV), virus del mosquito Marisma (MMV), el virus Nanay (NANV) y virus Nhumirim (NHUV) (19–24). Las recientes investigaciones sugieren que los diferentes grupos de ISFV (cISF y dISF) se originaron mediante eventos evolutivos independientes (18,25).

Uno de los cISF que ha sido reportado en los últimos años es el *Culex flavivirus* (CxFV). CxFV es un ISV reportado por primera vez en Japón en mosquitos *Culex pipiens*, en 2007, y a la fecha se ha descrito en diferentes regiones de todo el mundo (26–32).

Un factor reciente que se ha descrito al aumentar la vigilancia entomo-virológica ha sido los elementos virales endógenos los cuales se originan en su mayoría a partir de secuencias de ISV

1.1.3 Elementos virales endógenos (EVE, del inglés *Endogenous Viral Elements*)

Son secuencias de virus retrovirales o no retrovirales y son el resultado de la endogenización de las copias del material genético del virus en los cromosomas del hospedero y al ocurrir en células de la línea germinal, se pueden transmitir a las siguientes generaciones.

Dentro de los EVE se reporta el subgrupo de elementos de virus no retrovirales, llamados elementos NIRV (del inglés *Non-retroviral Integrated RNA Virus*). Estos constituyen un hallazgo de gran interés por integrarse al genoma del hospedero, sin derivar de virus que expresen retrotranscriptasas e integrasas. Recientemente se ha descrito que durante la infección con DENV, virus Sindbis (SINV) y CHIKV, los fragmentos de ARN se convierten en DNA viral (DNA_v) mediante la acción de la actividad retrotranscriptasa propia de la célula hospedera(33,34).

Los NIRV son productos de virus no retrovirales de diversas familias. La familia Flaviviridae incluye el género *Flavivirus*, el cual ha sido reconocido históricamente como un importante grupo de arbovirus, con un gran número de especies de importancia médica distribuidas alrededor del mundo, en una gran variedad de ecosistemas e interacciones ecológicas. Algunos ISFV, han logrado integrar parte de su genoma al genoma de los mosquitos en forma de NIRV.

Los NIRV han sido asociados con la vía de biogénesis de piARN (PIWI ARNs), que constituye un importante mecanismo antiviral del hospedero (35–37) y podría tener un impacto significativo en la competencia vectorial de especies como *Ae. aegypti* en zonas endémicas para arbovirus. Además, la integración de fragmentos del

genoma viral podría afectar el desempeño de pruebas moleculares genéricas comúnmente utilizadas en la vigilancia entomo-virológica de arbovirus.

El escenario de transmisión sostenida de arbovirus en Colombia, y específicamente en el Distrito de Santa Marta donde confluyen diferentes ambientes, representa una oportunidad para el establecimiento de nuevos ciclos de transmisión. Por lo tanto, promover de manera efectiva la vigilancia entomo- virológica aportará la descripción de las dinámicas de la enfermedad y la posibilidad de establecer medidas de prevención y focalización del control que sean efectivas.

En diversas regiones del país, y en especial en el Distrito de Santa Marta, áreas urbanas, periurbanas y rurales constantemente se mezclan con áreas selváticas y generan un conjunto de ambientes que podrían favorecer la adaptación de arbovirus a nuevos ciclos de transmisión.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las familias *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Bunyaviridae* (actualmente *Peribunyaviridae*), están registradas en el catálogo de arbovirus, de los cuales más de 100 virus son considerados de importancia médica (5,38–40). El DENV presenta una incidencia de 400 millones de casos al año. De igual forma, CHIKV y ZIKV han sido responsables de epidemias recientes en las Américas, en 2014-2016 y 2015-2016, respectivamente (41), y virus Oropouche (OROV), virus Mayaro (MAYV) y virus de la fiebre amarilla (YFV, por sus siglas en inglés) (42,43) se encuentran en latencia de emerger o reemerger como serios problemas de salud pública. Se hace necesario implementar estrategias como la vigilancia entomo-virológica para la

estratificación de las áreas de riesgo y la identificación temprana de los arbovirus circulantes.

Los arbovirus son virus cuyo ciclo de transmisión involucra especies de vertebrados y artrópodos hematófagos que actúan como hospederos y vectores biológicos, respectivamente. Al alimentarse de sangre de un vertebrado en fase de viremia, el vector adquiere viriones capaces de atravesar las barreras naturales y multiplicarse en sus diferentes tejidos hasta colonizar nuevamente las glándulas salivales, desde donde iniciará un nuevo ciclo (44).

La dinámica de las arbovirosis es el resultado de interacciones complejas entre diversas variables, tales como la distribución real de los vectores (45), sus oscilaciones en abundancia de acuerdo con la variación climática (46), las diferencias en la competencia de las poblaciones del mosquito para transmitir cada arbovirus (47,48), la transmisión vertical y sexual en los vectores (49), la existencia de hospederos y vectores en ciclos enzoóticos (43), la globalización, la urbanización en altas densidades y con deficientes servicios sanitarios (50), el cambio en el uso del suelo, la deforestación, la minería y múltiples alteraciones que favorecen nuevas interacciones ecológicas y con ellas la emergencia de enfermedades y la imprevisibilidad de su potencial epidémico (51).

Los arbovirus son de gran importancia ya que involucran al humano como su principal hospedero amplificador y a su evidente éxito para establecerse en el ciclo urbano. Estos virus son transmitidos por las hembras de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti*, razón por la cual, gran parte de la vigilancia y las medidas actuales de prevención y control han estado dirigidas a este vector (52)

La sola vigilancia entomológica, con los índices aédicos tradicionales, ha fallado para establecer con certeza las zonas de riesgo (53). En la última década, y como una aproximación que ha estado estrechamente ligada a la academia, se ha incorporado el porcentaje de infección o la tasa mínima de infección como un indicador más directo del riesgo real de las poblaciones expuestas al vector (54–56). Es necesario emprender actividades de vigilancia entomo-viológica activa como una herramienta sensible para la identificación temprana de arbovirus y con ello la focalización de las estrategias de control del vector que permitan anticiparse a un brote (57,58).

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Identificar los arbovirus circulantes en poblaciones de mosquitos del Distrito de Santa Marta durante el periodo 2018-2019 a través de métodos moleculares genéricos y específicos.

2.3.1.1 Objetivos específicos

- Identificar los vectores de importancia medica que circulan en tres zonas (urbana, rural y selvática) del Distrito de Santa Marta
- Identificar los arbovirus, flavivirus insecto-específicos y NIRV presentes en las poblaciones de mosquitos del área urbana del Distrito de Santa Marta.
- Determinar la frecuencia de NIRV en las poblaciones de mosquitos analizadas.

3. ENTOMOLOGIC AND VIROLOGIC SURVEILLANCE OF FLAVIVIRUSES AND ALPHAVIRUSES IN THE DISTRICT OF SANTA MARTA, COLOMBIA, 2018-2019.

Running head: Arbovirus surveillance in Santa Marta, Colombia.

Authors: Juan Pablo Franco-Salazar¹, Eric Perdomo^{1,2}, Andrew Muñoz¹, Adalberto Duica², Juan Domínguez², Sharon Pérez¹, Paula Quintero-Cortés¹, Homero San Juan-Vergara³, Guillermo Cervantes³, Gabriel Parra-Henao¹ Jose A. Usme-Ciro^{1,*}

Institutions: ¹Centro de Investigación en salud para el Trópico – CIST, Universidad Cooperativa de Colombia, Santa Marta, Colombia; ²Secretaría de Salud del Distrito de Santa Marta, Santa Marta, Colombia. ³Grupo de Biotecnología, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia.

Additional files:

*Corresponding author: Jose A. Usme-Ciro, Centro de Investigación en Salud para el Trópico, Universidad Cooperativa de Colombia, Troncal del Caribe, Sector Mamatoco, Santa Marta, Colombia; Phone: +57(314)6289435. Email: jose.usmec@ucc.edu.co

Title: Entomologic and virologic surveillance of flaviviruses and alphaviruses in the District of Santa Marta, Colombia, 2018-2019.

Running head: Arbovirus surveillance in Santa Marta, Colombia.

Abstract

Introduction: Flaviviruses and alphaviruses are the more relevant genera of arboviruses affecting humans. They are widely distributed and can be transmitted in enzootic, epizootic, and epidemic cycles. Current surveillance strategies for arboviral diseases involve the serologic and virologic study of clinical cases and the characterization of the presence and densities of immature and mature stages of the mosquito vectors. **Objective:** To establish an entomo-virologic surveillance of flaviviruses and alphaviruses in different settings of the Santa Marta district, Colombia. **Materials and Methods:** Mosquito and sand fly specimens were collected in urban, rural, and sylvatic areas from the district of Santa Marta, morphotypes were separated and mounted for classic taxonomy or preserved in absolute ethanol or liquid nitrogen for molecular systematics through the DNA barcoding approach, and virus detection through generic and specific methods of molecular detection of flaviviruses and alphaviruses. **Results:** Several species of mosquitoes were identified by classic taxonomy and corroborated through comparison of their COI gene sequence with public DNA sequences databases. Viral detection revealed the circulation of two lineages of DENV-1 genotype American/African with different recent origins, the presence of ZIKV in cryptic circulation, the lack of evidence of CHIKV in endemic circulation, as well as the presence of *Culex flavivirus* in a *Culex* sp pool and a non-retroviral integrated RNA

virus element derived from Menghai-like flavivirus in the genome of *Ae. aegypti*.

Conclusions: Further studies are needed to establish the effect of this virus and genetic element in the vector competence for arboviruses currently circulating in the urban area. The entomo-virologic surveillance of arboviruses and other closely related viruses is of major importance for the disease prevention and control.

Keywords

Dengue virus, Zika virus, flavivirus, *Culex flavivirus*, surveillance, endogenous viral elements, mosquitoes, sandflies.

Introduction

Arthropod-borne viruses (arboviruses) are an important health problem in tropical and subtropical countries around the world (1). The global impact of arboviral diseases is mainly determined by the vector species (e.g. mosquitoes, midges, ticks), successfully colonizing and extending permissive areas due to climate change (2–4). Arbovirus dynamics and epidemiology varies according to the human role in the transmission cycle and the stage in the emergence process (5). Viruses involved in enzootic cycles frequently infect humans and domestic animals, which act as dead-end hosts where the transmission is interrupted (6). Eventually, humans can act as amplifying hosts of some arboviruses (e.g. *Dengue virus* - DENV, *Chikungunya virus* - CHIKV, *Zika virus* - ZIKV, *Yellow fever virus* - YFV), and the vector competence and naïve human population, among other factors will determine the epidemic magnitude (7,8). Arboviruses circulating in the urban cycle in Colombia are led by DENV, which reemerged in the 70's and 80's (9), and have been maintained in the human and vector population through cyclic behavior of

endemic/epidemic periods (10). DENV epidemics during the last decade have been stronger in magnitude and severity, making it the main arboviral disease in the region (11). CHIKV and ZIKV appeared in the country in 2014 and 2015, respectively, becoming major treats by the direct effect of the epidemics and the sequels related to the chronic disease after CHIKV infection or neurologic impairment in some ZIKV infection cases (12–14)

Arbovirus dynamics is complex and increasing evidence suggest an impact of the presence of some insect-specific viruses (ISV) and non-retroviral integrated RNA virus (NIRV) elements on vector competence for arbovirus transmission (15,16). The presence of *Culex flavivirus*, reported for the first time in 2007 in *Culex pipiens* mosquitoes from Japan is of interest for entomo-virological surveillance as it has been frequently detected in *Culex* mosquitoes and despite the anthropophilic behavior and circulation at high densities, this mosquito genus has not been definitively incriminated in urban arbovirus transmission (17,18)

Santa Marta is a tropical city in the Caribbean coast of Colombia. While urban arboviruses are currently considered endemic in the district, the proximity to sylvatic areas with historic evidence of enzootic transmission of YFV and *Venezuelan equine encephalitis virus* -VEEV, and the fact that it has become one of the most important tourist destination for nationals and foreigners could mean a complex arbovirus dynamics and a major challenge for the diagnosis of acute febrile syndrome. Here, we implemented a generic approach for the molecular detection of flaviviruses (19) and alphaviruses (20) to establish an entomologic-virologic surveillance strategy in

urban, rural, and sylvatic settings of the District of Santa Marta, Magdalena, Colombia, during the 2018-2019 epidemic period.

Materials and Methods

Study area

The District of Santa Marta, Magdalena, Colombia is located at the Caribbean coast of Colombia with coordinates 11° 14' 50" and 74° 12' 06". This is one of the most important tourist destinations for nationals and foreigners. The urban area covers around 55 km² and the rural area extends around 2338 km².

The study was conducted in three different locations covering the gradient from the urban-rural-sylvatic settings, during the period 2018-2019. Sampling in the urban area was focused on the houses and neighborhoods of patients reported to the public health system as suspected dengue cases, while sampling in the rural area was performed in linear transects of around 2 km delimited inside the sampling area.

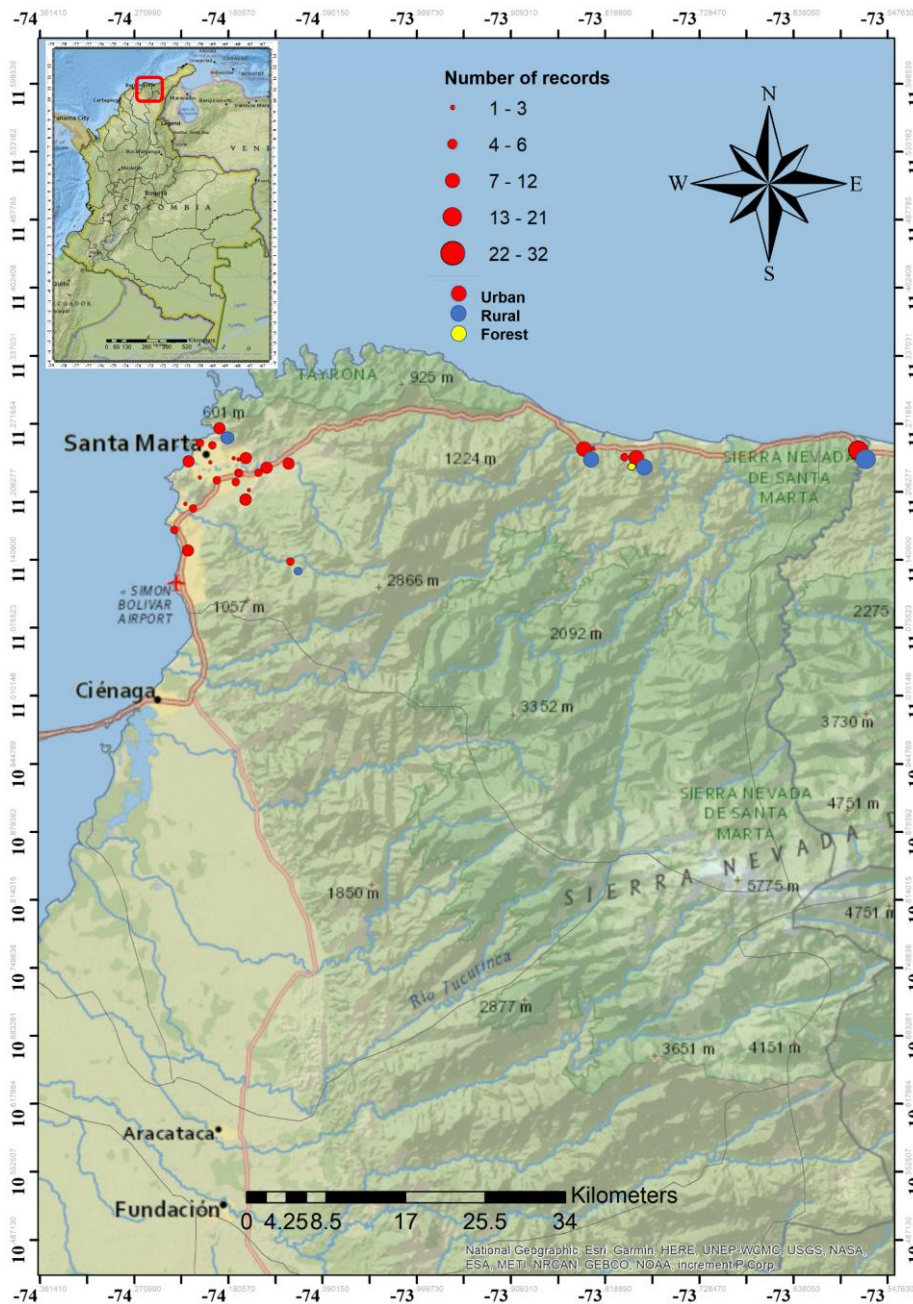


Figure 1 Location of the three areas of study in the district of Santa Marta, Colombia. The circles size determine the number of mosquitoes pools that were obtained from each collection site.

Entomological study

Adult mosquito and sandfly specimens were captured by three different methodologies. In the urban area, CO₂-baited CDC light traps were installed outside the houses between 18:00 hours and 6:00 hours of the next day, and manual capture with entomological networks and aspirators was performed inside the houses between 8:00 hours and 11:00 hours. In the rural area, CO₂-baited CDC light traps were installed outside the dispersed houses between 18:00 and 6:00 hours of the next day, a white Shannon trap was installed between 19:00 and 23:00 hours with active capture using standard mouth aspiratorf, and the capture was made inside and outside the walls of the houses, in defined transects between 7:00 and 11:00 hours. In the sylvatic area, CO₂ baited CDC light traps were installed in the forest at 1.5 m from the floor and Shannon trap was intalled between 19:00 and 23:00, and manual capture was carried out in defined transects between 7:00. and 11:00..Sample preparation

Captured mosquito and sand fly specimens were rapidly separated in the field station (or the Entomology Lab if samples were collected in the urban area) and sacrificed with ethyl ether. Subsequently, the specimens were identified using the dichotomous keys such as those of Rueda at al and those of the Walter Reed Biosystematics Unit. Subsequently, the specimens were identified using the dichotomous keys such as those of Rueda et al, and those of the Walter Reed Biosystematics Unit

According to the morphotype with the help of a stereomicroscope and a cold plate, pooled and stored at different conditions: i) at room temperature (for specimen mounting), ii) at -20°C in absolute ethanol (for DNA barcoding), and iii) at -196°C in liquid nitrogen (for virologic detection).

Total RNA extraction

Mosquito and sandfly pools were homogenized in RLT buffer with ceramic Magna lyser green beads (Roche, Mannheim, Germany) in a BeadBug homogenizer (BenchMark Inc.) for 25 sec and 4000 rpm, and total RNA from the whole specimens extracted with the RNeasy minikit (QIAGEN Inc.) by following the manufacturer's recommendations. Alternatively, the pools were homogenized in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) 1X, with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin, cleared by centrifugation and 140- μ l aliquots used for RNA extraction using the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) by following the manufacturer's recommendations.

cDNA Synthesis and Generic and Specific PCR assays

RNA extracts were used for first-strand cDNA synthesis with the SuperScript IV reverse transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Mix 1, containing 0,2 μ g random hexamer primer (Thermo Scientific), 0,5 mM each dNTP and 50-500 ng total RNA was incubated at 65°C 5 min and immediately transferred to an ice bath for 1 min. Mix 2, containing 1X SSIV buffer, 4 mM DTT, 40 Units RNaseOUT recombinant RNase inhibitor (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 200 Units Superscript IV Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was combined with mix 1 and incubated at 23°C 10 min, 52°C for 10 min, 80°C for 10 min and kept at 4°C.

Generic PCR for detection of members of the genera *Flavivirus* and *Alphavirus* were performed as previously described (20,21). Subsequently, specific protocols for detection and typing of Dengue virus were performed as previously described by Usme-Ciro et al (22–24) Chikungunya virus detection was assessed by following the primers and previously described protocol (25). A set of primers targeting the complete envelope gene of Zika virus were used for specific detection (unpublished) and those described by Domingo et al (21) were used for DENV-1 amplification and sequencing.

Sequencing and sequence handling

Amplicons were purified and sequenced with forward and reverse primers spaced every 400 bp approx., through a direct sequencing service (Macrogen Inc., South Korea). Electropherograms visualization, contigs assembly and trimming to eliminate the primer targeting sequences were performed through the software Geneious v9.1.8 (Biomatters Ltd., San Diego, CA, USA). Multiple sequence alignments, including sequences obtained in the present study and those representing the genus *Flavivirus*, and the global intra-serotype and intra-genotype variability of DENV-1 were generated through MAFFT (26)

Genetic diversity and phylogenetic analysis

Sets of sequences of representative strains of DENV-1 and insect-specific flaviviruses were prepared for alignment and phylogenetic inference. Matrices were constructed with all available sequences from Colombia and border countries and subsequently depurated by preserving the global genetic variation. The DENV-1 matrix contained 247 sequences of 1485 bp. The matrix for genus *Flavivirus* using the NS5 gene contained 44 sequences of 1097 nt for NIRV and 45 sequences of

186 nt for *Culex flavivirus* representative species. Matrices were used to calculate the best nucleotide substitution model through the Akaike Information Criterion implemented in the ModelFinder algorithm in IQ-TREE (27). Estimates of genetic distances and diversity were obtained from the Mega 7 software (28). The first step in the phylogenetic analysis was the evaluation of potential recombinant sequences in the analyzed matrix through RDP v3.44 (29). Phylogenetic inference was performed through the *Neighbor Joining* and *Maximum Likelihood* algorithms implemented in Mega 7 software using the previously obtained nucleotide substitution model and 1000 bootstrap replicates. Consensus tree was calculated by the majority-rule.

DNA extraction and barcoding analysis

Total DNA was extracted from individual mosquito specimens through the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc.) by following the manufacturer recommendations. Amplification of the Cytochrome oxidase I gene was performed by the primer sets previously described by Folmer et al (30) or Kumar (31). DNA sequences were edited, assembled, and analyzed through BLASTn, BOLD system and species designation corroborated in GBIF.

Results

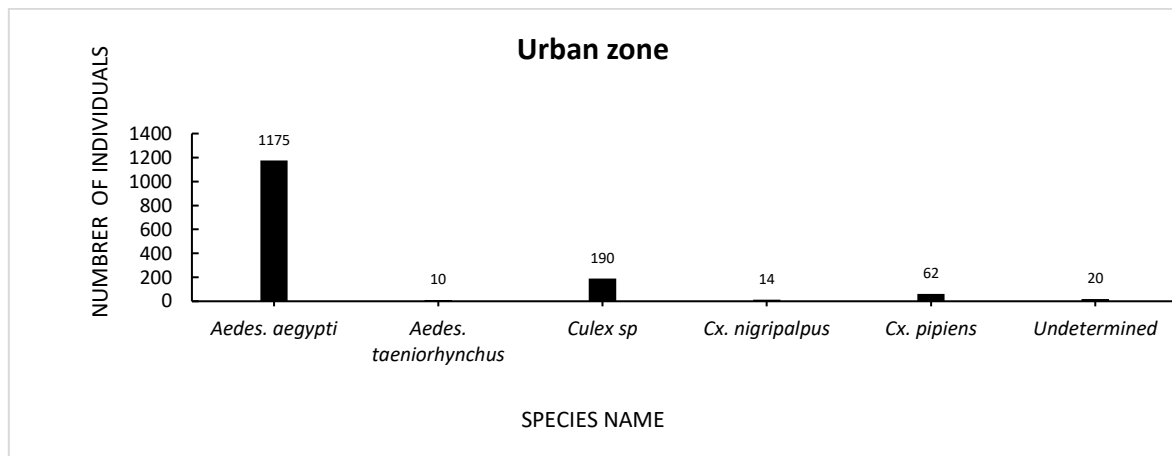
Diversity and abundance of mosquitoes in the different settings

Three different scenarios were analyzed in the present study, covering the ecological gradient from sylvatic to urban areas (Figure 1). The entomological fieldwork was successfully performed in 24, 8, and 1 sampling places in the urban, rural, and sylvatic settings, respectively (Suppl. Table 1); it allowed the collection of a total 3022 adult mosquitoes and sandflies that were separated and stored in 272 pools, with

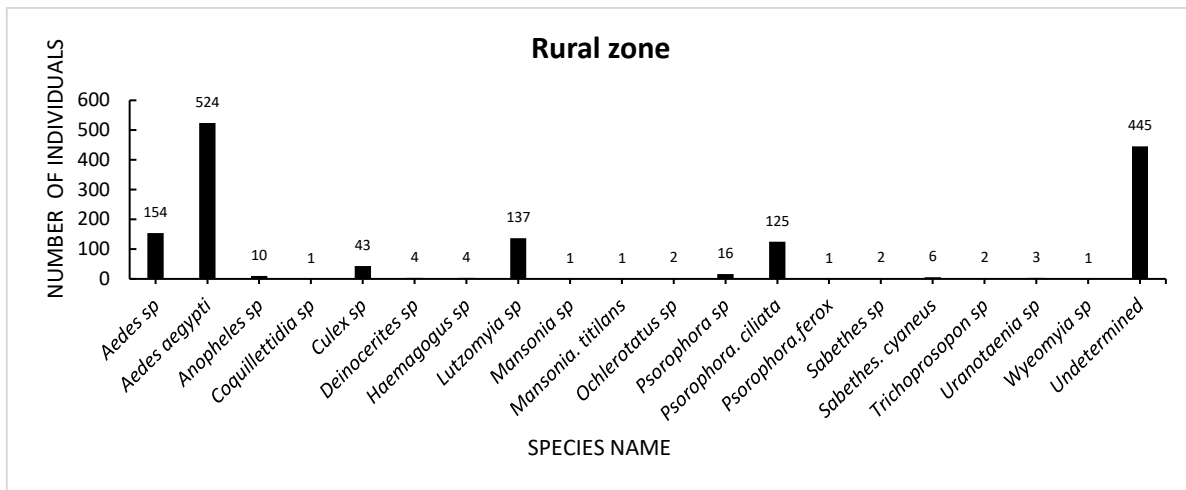
most of the specimens identified as *Ae. aegypti* (56%), *Culex* sp.(7.7%), *Aedes* sp. (4.9%)., *Psorophora ciliata* (4.2%), and *Lutzomyia* sp.(3.2%), as well as a high number of undetermined species from the family Culicidae (Figure 2).

There was a marked difference in the frequency of all species between settings. As it was expected, *Ae. aegypti* and *Culex* sp. were highly frequent in the urban area (Figure 2a)., while a major diversity of species was found in the rural area, including the species *Aedes* sp., *Ae. aegypti*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex* sp., *Deinocerites* sp, *Mansonia* sp, *Mansonia titilans*, *Ochlerotatus* sp, *Psorophora ciliata*, *Psorophora ferox*, *Sabethes* sp., *Sabethes cyaneus*, *Trichoprosopon* sp., *Uranataenia* sp., and *Wyeomyia* sp. For the rural area, the predominant species was *Ae. Aegypti*, followed by *Aedes* sp., and the genus *Psorophora* (Figure 2b). For the sylvatic area, the more frequent genus was *Sabethes* (Figure 2c), which was also found to be present in the rural area. The species *Ae. aegypti* and *Culex* spp. were also found in two zones, urban and rural (Figure 3).

a.



b.



C.

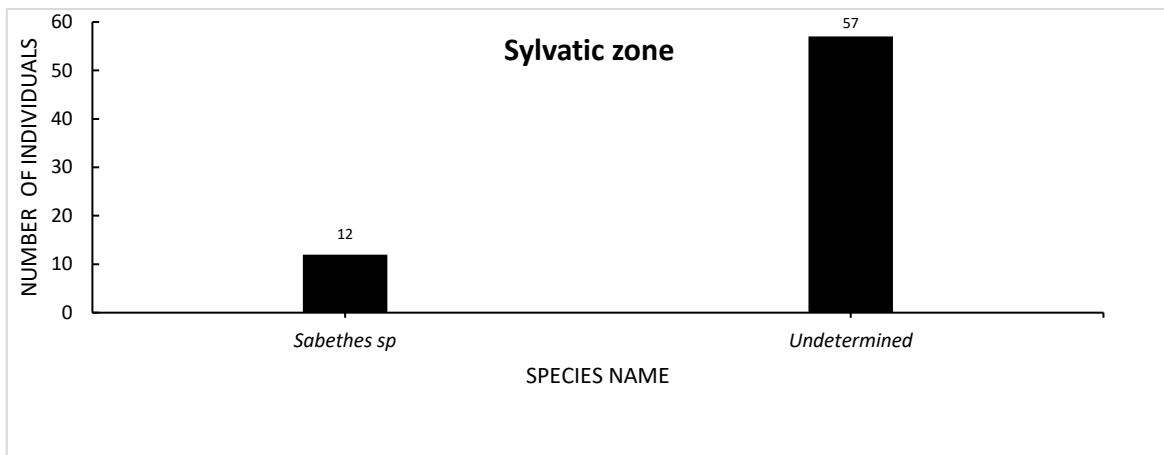


Figure 2. Number of individuals for species by zone. a. Represents the number of genera in the urban area, the genera *Aedes* and *Culex* are identified. b. The rural area was the most representative in various species, but it is also the area with the largest number of unidentified individuals. C. *Sabethes* sp., is identified in the sylvatic area, being the area with the lowest number of sampled individuals.

In total, 3,022 individuals of the family Culicidae were collected (Suppl. Table 1), 1,699 belong to the species *Ae. aegypti*. In addition, we collected 233 *Culex* spp., the second most abundant species of the sampled sites.

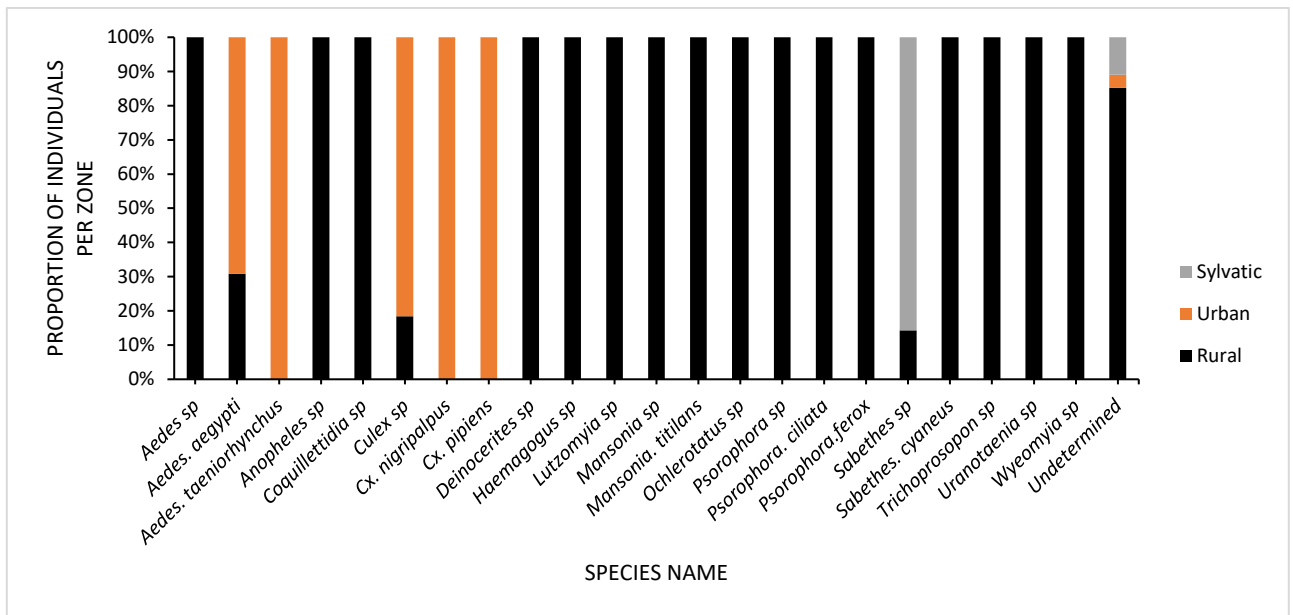


Figure 3. Distribution in percentage of the species by study area. The sylvatic area is represented in green, the urban area in red, and the rural area in black.

The most represented study area is the rural area, followed by the urban area and finally the jungle area. The district of Santa Marta is made up of 9 zones that group a certain number of neighborhoods; communal calls. The communes in their order are: Commune 1 Maria Eugenia, Commune 2 Central, Commune 3 Pescadito, Commune 4 Jardin, Commune 5 Santa Fe-Bastidas, Commune 6 Mamatoco, Commune 7 Gaira-Rodadero, Commune 8 Pozos colorados and Commune 9 Bureche.

The mean number of specimens collected per sampling point in the urban area was 62 individuals. with a minimum of 5 (Barrio Maria Eugenia) and a maximum of 151 (Barrio Las Manguitas/La Paz).

At the commune level, commune 6 (Mamatoco) is the commune that groups the largest number of species (11th November neighborhood, 20th October

neighborhood, Bolivariana neighborhood, Santa Ana neighborhood, Villa Sara neighborhood, Universidad Cooperativa), this commune as well to commune 7, they are located close to the rural area, which makes it an emerging area of high importance in the surveillance of arboviruses, because this can promote the barrier jump between an area absent of a human host and the population (Figure 4).

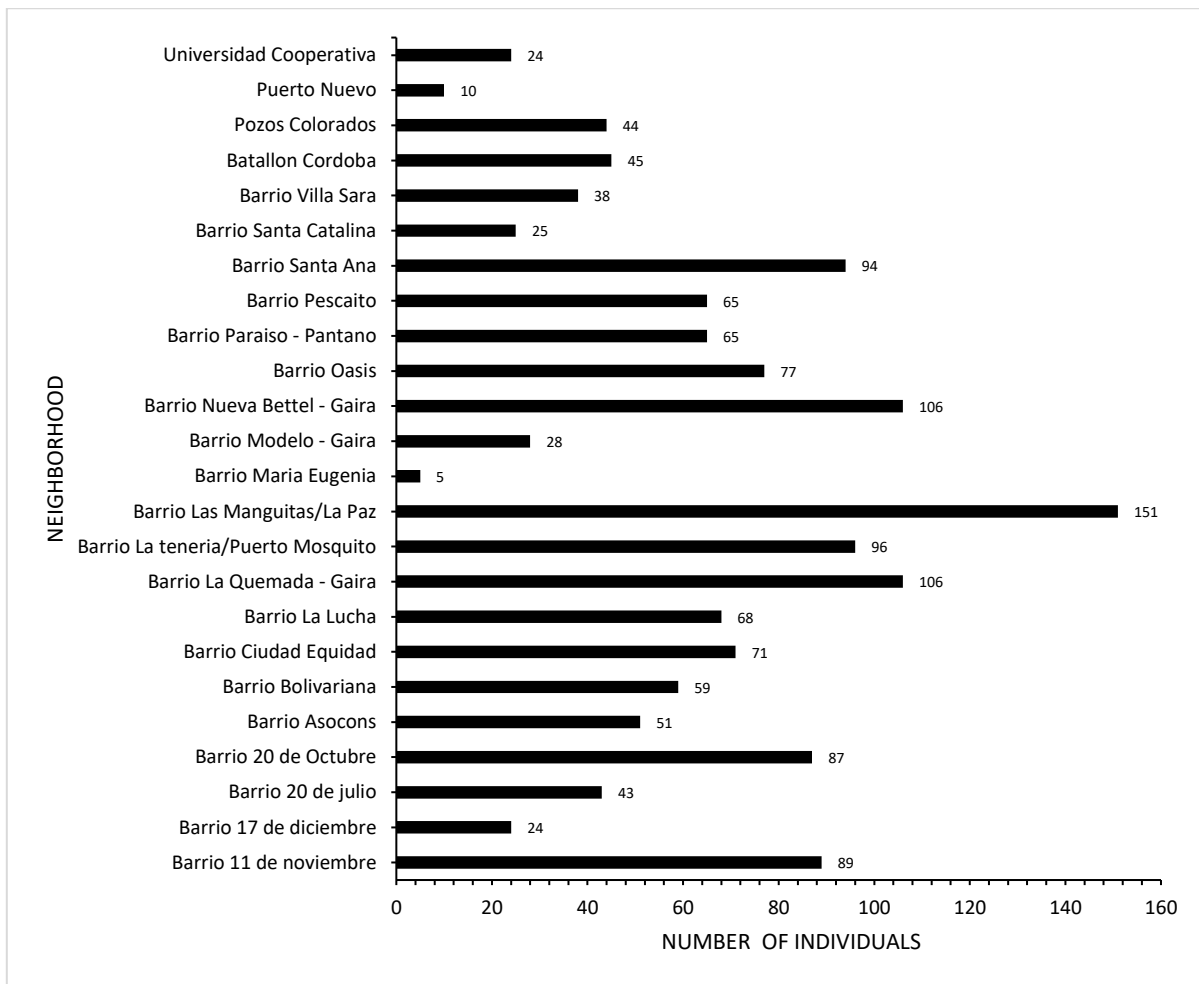


Figure 4. Number individuals for neighborhood of the urban area where the search for arboviruses was carried out, based on information from the Secretary of Health of Santa Marta of reported febrile cases.

Molecular detection of flaviviruses and alphaviruses

A total of 232 pools were processed for molecular detection as described above. The flavivirus sequence was detected in 51 pools, which were subsequently processed for the specific detection of DENV and ZIKV. Six pools collected in the urban area were positive for DENV. One pool of *Ae. aegypti* from the urban area was simultaneously positive for DENV and ZIKV. One pool of *Culex* sp. collected in the urban area was positive for the insect-specific *Culex flavivirus* (Table 1). The remaining flavivirus-positive pools were molecularly characterized and a Menghai flavivirus-like virus was identified by sequencing of a short fragment of the NS5 gene (Figure 5). Further genetic characterization allowed to demonstrate its presence as a NIRV (non-retroviral integrated RNA virus) in the genome of *Ae. aegypti*. No one of the sylvatic pools were positive for virus detection. All tested pools were negative for alphaviruses.

Table 1. Virus detection in mosquito and sandfly pools.

Species	Number of specimens	of Numbers of pools	of tested	Detected virus (Number of pools)
<i>Ae. aegypti</i>	1630	125		Generic flavivirus (41), DENV-1 (3), ZIKV (1), Menghai flavivirus-like virus (12)
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	7	1		Generic flavivirus (1), Menghai flavivirus-like virus (1)
<i>Aedes</i> sp.	112	9		Generic flavivirus (1)
<i>Anopheles</i> sp.	8	2		-
<i>Culex nigripalpus</i>	13	1		-
<i>Culex pipiens</i>	57	5		Generic flavivirus (1)
<i>Culex</i> sp.	199	26		Generic flavivirus (5), <i>Culex flavivirus</i> (1)
<i>Haemagogus</i> sp.	2	1		-

<i>Lutzomyia</i> sp.	99	7	-
<i>Psorophora ciliata</i>	89	7	-
<i>Psorophora</i> sp.	11	2	-
<i>Sabethes cyaneus</i>	3	1	-
<i>Trichoprosopon</i> sp.	1	1	-
Undetermined	443	44	Generic flavivirus (2)
TOTAL	2674	232	5 (69)

Different strains of DENV-1 are responsible for the 2018-2019 dengue epidemics in the city of Santa Marta

Phylogenetic analysis of the complete envelope gene of DENV-1 allowed to demonstrate the presence of two different strains with different recent phylogenetic origins (Figure 6). One of the strains detected in the mosquito population was closely related to the sample isolated from a clinical case of a febrile illness identified during the differential diagnosis in another study performed in the district during the same time frame. All DENV-1 strains characterized here belonged to the American-African genotype, in agreement with previous phylogenetic studies performed in the country (32)

Cryptic circulation of ZIKV during a dengue epidemic

One *Ae.aegypti* pool was positive for specific ZIKV detection (Suppl. Figure 1). The initial detection through RT-PCR was corroborated with a different set of primers covering the complete envelope. Both PCR amplifications showed specific bands of low intensity that impeded DNA sequencing and further molecular analysis. The positive pool was actively collected in boundaries to the house of a clinically

diagnosed dengue patient. No clinical or laboratory-confirmed cases of ZIKV infection were reported in the district during the period.

Molecular characterization of *Culex flavivirus*

Culex flavivirus was identified in a *Culex sp* pool which was positive for flavivirus-generic and negative for DENV and ZIKV-specific PCR protocols. Flavivirus-generic PCR amplicons were sequenced, and phylogenetic analysis demonstrated that the sequence formed a monophyletic group with other closely related sequences reported worldwide from the same species (Figure 7).

Tree scale: 0.1

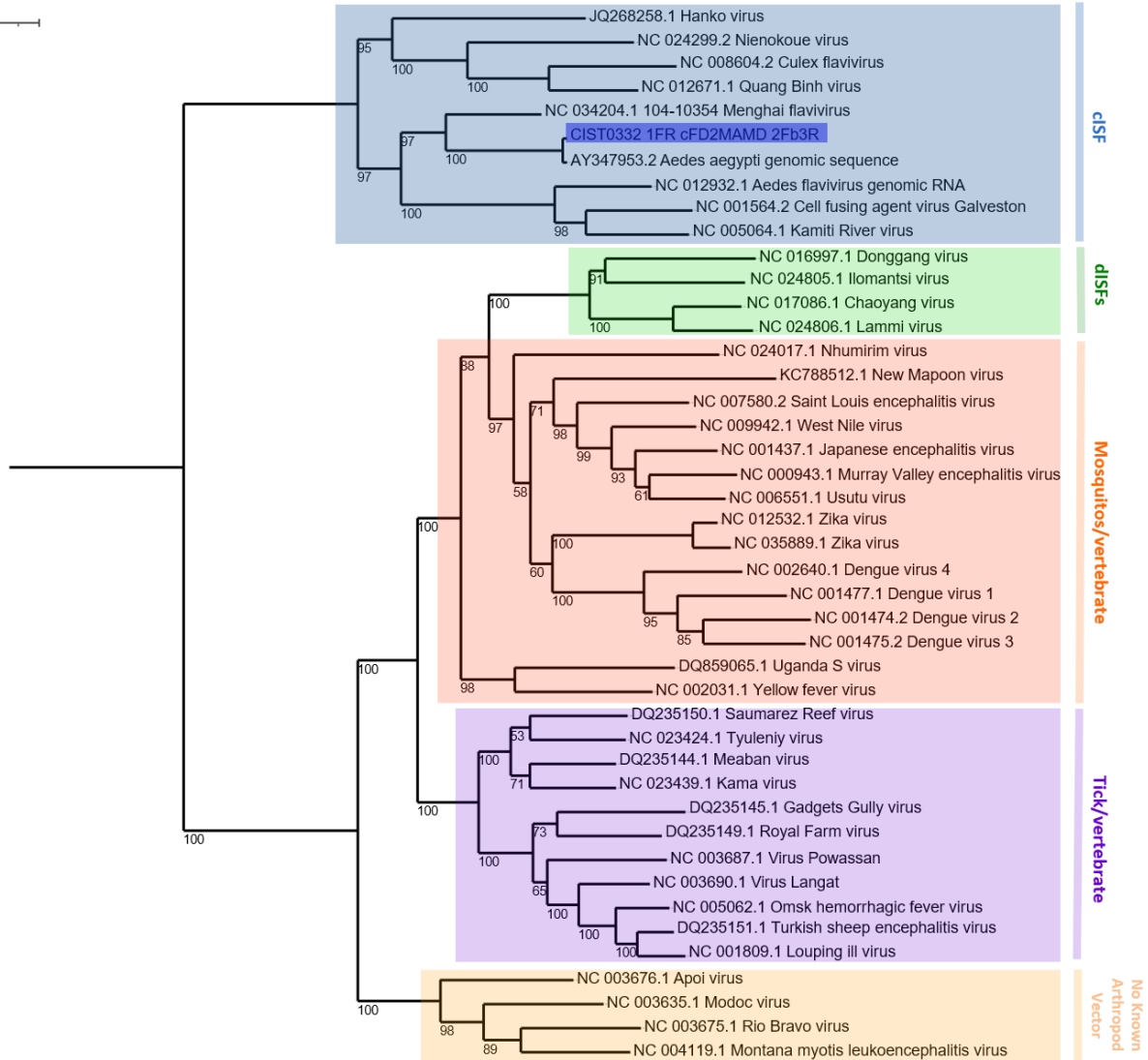


Figure 5. Phylogenetic reconstruction of the genus Flavivirus using the NS5 gene (1097nt). The maximum likelihood method was used, and the best nucleotide substitution model was GTR+F+I+G4, with ultrafast 1,000 bootstrap replicates. The sequence of this study is highlighted in a blue box, in the cISF group

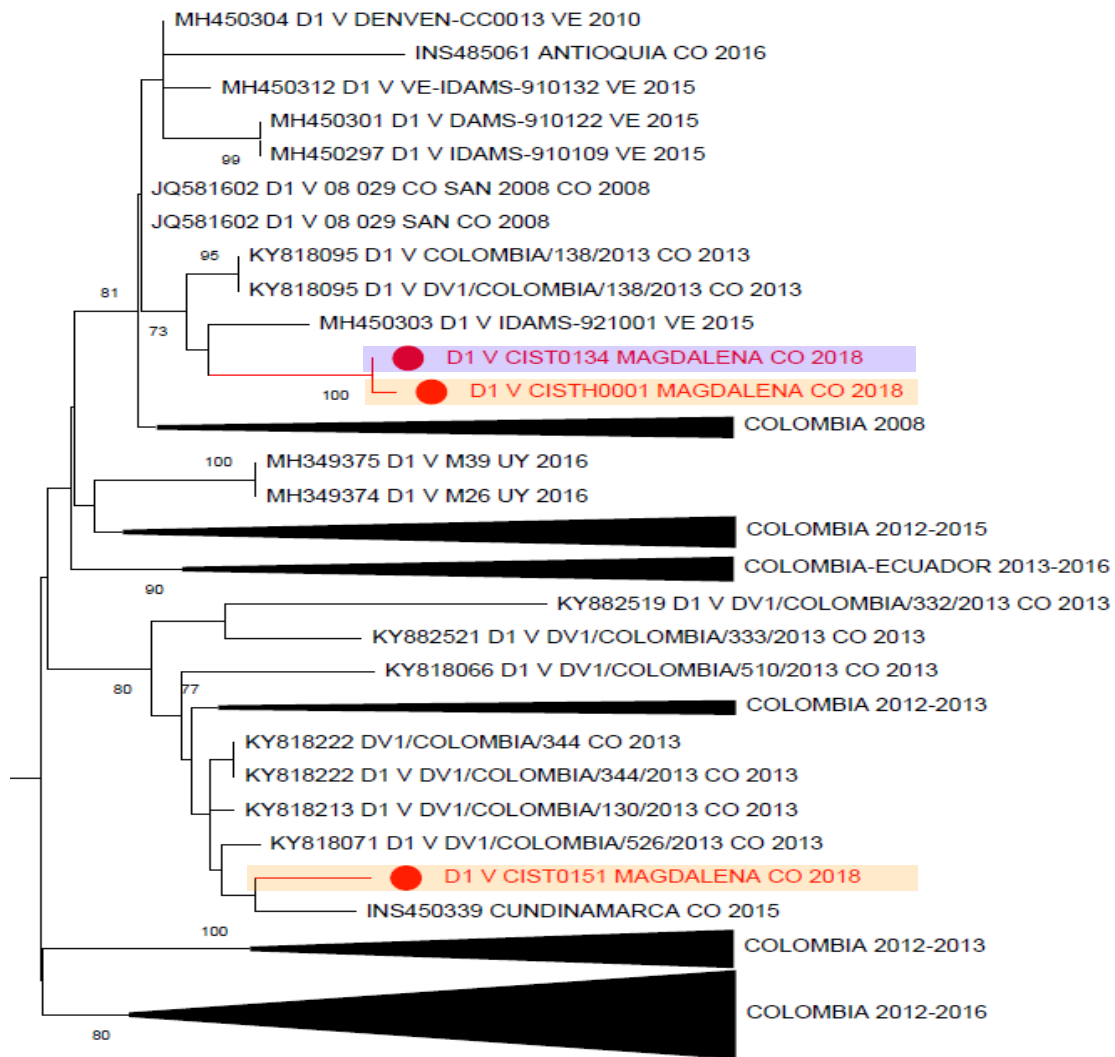


Figure 6. Phylogenetic reconstruction of the DENV using the NS5 gene 1458 pb The Neighbor-Joining method was used, and the best nucleotide substitution model was , GTR+G, with 1,000 bootstrap replicates. The sequences of this study are highlighted in blue for the sequence identified in the month of October 2018 and in yellow the sequences identified in November of the same year.

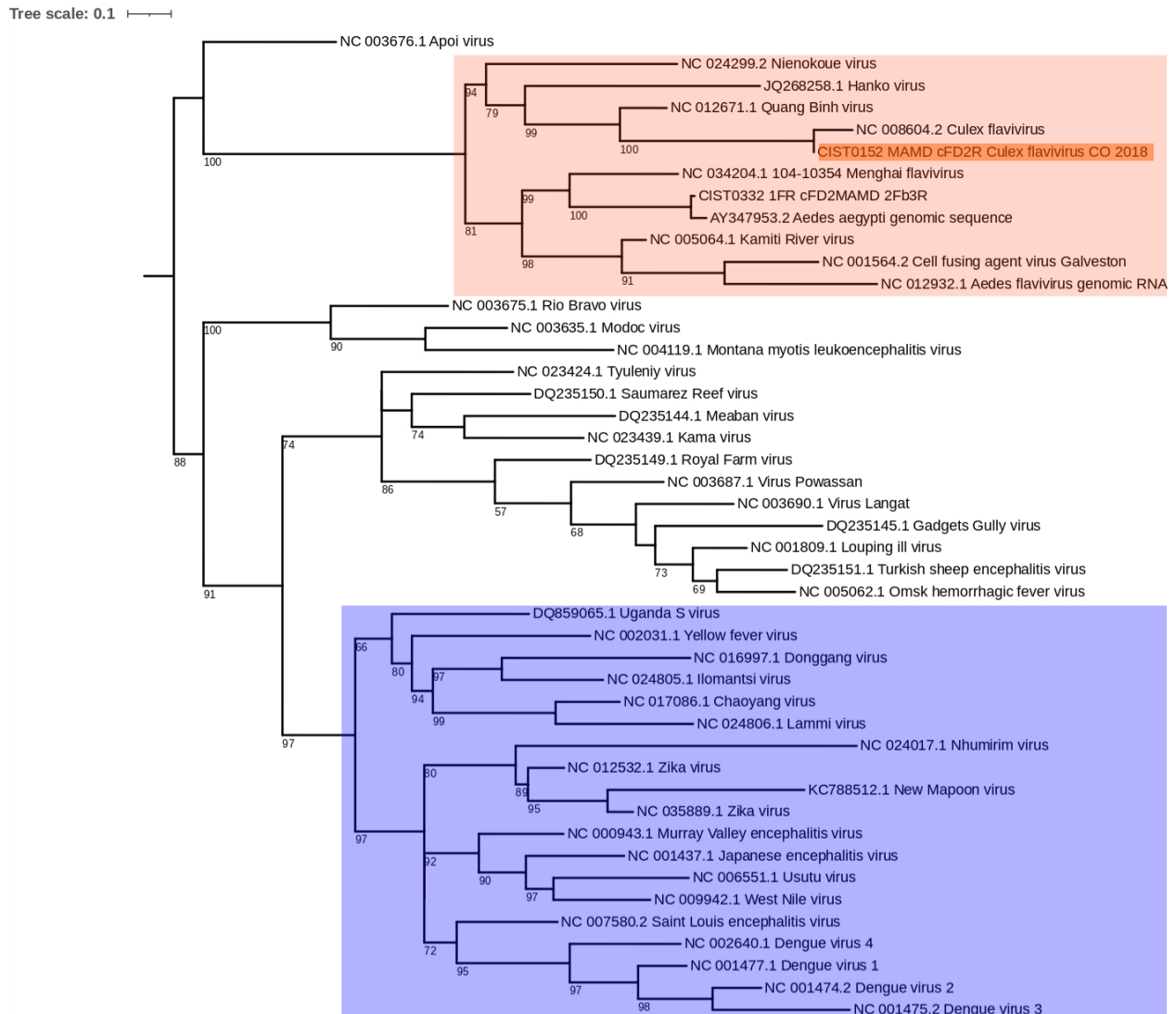


Figure 7. Phylogenetic reconstruction of the genus *Flavivirus* (186nt). The maximum likelihood method was used, and the best nucleotide substitution model was TIM2e+FQ+I+G4., with ultrafast 1,000 bootstrap replicates. The sequence of this study is in an orange box, forming a monophyletic group with the reference sequence NC 008604.2 for *Culex flavivirus*. In the purple box it refers to arboviruses of medical importance.

Discussion

Arbovirus dynamics is the result of complex ecological and evolutionary interactions. The major role of globalization in the rapid dispersion of vector-borne diseases is recognized as it is also the need for an intensified and sensitive surveillance. The results presented here constitute the first entomo-virologic surveillance of mosquito-borne viral diseases in the District of Santa Marta, allowing the identification of the DENV genetic variants responsible for the 2018-2019 epidemics (33). As it can be expected from a tourist destination, at least two strains of DENV-1 strains were identified in the mosquito population. DENV infection presents a cyclical behavior, which very possibly repeats itself every three or four years, this is due to social and climatic changes. DENV-1 and DENV-2 are currently the most detected serotypes detected in Colombia (34) suggesting at least two recent introduction events from other cities inside the country or indeed bordering countries.

The National Institute of Health of Colombia in their report of dengue events for the years 2018 and 2019 reported a total of 44,171 and 124,989 cases of dengue, respectively. From epidemiological week (EW) 42 of 2018 to EW 7 of 2019, the number of notifications of dengue cases increased, generating an alert situation at the national level (35,36).

According to the behavior of reported cases of dengue by territorial entities in Colombia, between epidemiological weeks 01 to 36 of 2022 an increase in the number of dengue cases was reported for Magdalena (640 cases) and Santa Marta (296 cases) (37). Therefore, this first study of entomo-virology in the department of

Magdalena is very important due to its high incidence of arboviruses circulating in the population. (38,39)

The absence of detection of CHIKV in the mosquito populations from the urban, rural, and sylvatic areas is of special interest and make it interesting to study the long-term virus-vector interaction. The magnitude of the 2014-2015 CHIKV epidemics in Colombia was never documented for an arboviral disease in Colombia (25). In the absence of a minimal susceptible population to maintain the transmission chain in humans, successful persistent infection, and vertical transmission of the virus in the mosquito are necessary for the virus maintenance. The absence of CHIKV detection during the 2018-2019 period, although affected by the sample size or the extended dry season during the 2016-2017, suggest an unsuccessful interaction with the mosquito vector leading to local extinction of the virus in short time (40).

Despite not being able to molecularly characterize the identified ZIKV strain, the evidence of its cryptic circulation is critical and justify an intensified and specific diagnosis in the more affected pregnant women population, for whose fetuses devastating effects are expected and its possible association with Gullian Barré syndrome. Between EW 1 and EW 38 of 2022, a total of 31,453 Zika cases were reported in the Americas Region, in 13 of 52 countries and territories

The Pan American Health Organization (PAHO) reported 19,642 cases of Zika between EW 1 and EW 28 in 2022 (41,42). For Colombia, as of EW 32 of 2022, 117 cases of infection by ZIKV, representing a 74.3% increase compared to the data of the same week in the previous year (34). Therefore, the circulation of the virus is

imminent and it is necessary to focus efforts on entomo-virological surveillance strategies.

One of the most relevant findings was the identification of a NIRV in the *Ae. aegypti* genome. It has become a hot topic in virus-host interaction research during the last few years because it could constitute an important mechanism of antiviral immunity in the mosquito (43–45) leading to silencing of viral genomes of the same or closely related species. In the present study, the identified NIRV was derived from the genome of an insect-specific flavivirus, closely related to Menghai flavivirus. Some pools of *Ae. aegypti* were negative for the NIRV, suggesting the presence of at least two population of the vector, with unknown consequences in vector competence and therefore affecting the disease dynamics.

Altogether, the results from the present study justify the routine entomo-virologic surveillance in areas with the presence of urban vectors and a high flow of tourists. The continuous introduction of viral strains could abruptly change the epidemiology of arboviral diseases.

Conclusions

DENV-1 genotype American/African were identified during the 2018-2019 dengue epidemics in the District of Santa Marta. The exclusive identification of the serotype 1 of DENV is of major importance for prevention and control measures during the next DENV epidemic in the district, when more severe cases are expected if DENV-2 is introduced and responsible of secondary infections. Cryptic circulation of ZIKV was demonstrated in the mosquito population, despite not being correlated to suspected or confirmed ZIKV infection cases in the district. There was no evidence

of CHIKV circulation. There was evidence of the circulation of *Culex flavivirus* in *Culex* sp., and the presence of a NIRV in *Ae. aegypti* mosquitoes was successfully demonstrated. More studies are needed to establish the effect of the identified NIRV in the vector competence for arbovirus transmission.

List of abbreviations

DENV: Dengue virus

RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction

WHO: World Health Organization

ZIKV: Zika virus

CHIKV

NIRV

Acknowledgments

The authors thank the team working with vector-borne diseases at the Secretaría de Salud del Distrito de Santa Marta, and the families living in the urban and rural area where the sampling was performed.

Funding

This work was supported by the Universidad Cooperativa de Colombia (CONADI INV1913) and Minciencias (210477757671).

Authors' contributions

JAU-C and GP-H conceived and designed the study. JPF, SP, AMG and JAU-C performed the molecular detection. EPB, JD, AD and GP-H participated in the field work. JPF and JAU-C wrote the manuscript. JAU-C and JPF analyzed the molecular data. All authors edited, read, and approved the final manuscript.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med* [Internet]. 2018 Jan 29 [cited 2020 May 19];69(1):395–408. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-050715-105122>
2. Campbell LP, Luther C, Moo-Llanes D, Ramsey JM, Danis-Lozano R, Peterson AT. Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2015 Apr 5;370(1665):20140135. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2014.0135>
3. Fischer D, Thomas SM, Niemitz F, Reineking B, Beierkuhnlein C. Projection of climatic suitability for *Aedes albopictus* Skuse (Culicidae) in Europe under climate change conditions. *Glob Planet Change* [Internet]. 2011 Jul;78(1–

2):54–64. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921818111000798>

4. Shragai T, Tesla B, Murdock C, Harrington LC. Zika and chikungunya: mosquito-borne viruses in a changing world. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2017 Jul;1399(1):61–77. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nyas.13306>
5. Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. Origins of major human infectious diseases. *Nature* [Internet]. 2007 May;447(7142):279–83. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nature05775>
6. Weaver SC, Barrett ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2004 Oct;2(10):789–801. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nrmicro1006>
7. Morrison TE. Reemergence of Chikungunya Virus. Pfeiffer J, editor. *J Virol* [Internet]. 2014 Oct 15;88(20):11644–7. Available from:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01432-14>
8. Christofferson RC. Zika Virus Emergence and Expansion: Lessons Learned from Dengue and Chikungunya May Not Provide All the Answers. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2016 Jul 6;95(1):15–8. Available from:
<https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.15-0866>
9. Boshell J, Groot H, Gacharna M, Márquez G, González M, Gaitán MO, et al. Dengue en Colombia. *Biomédica* [Internet]. 1986 Dec 1;6(3–4):101. Available from:
<http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1924>

10. Padilla JC, Rojas DP, Sáenz-Gómez R. DENGUE EN COLOMBIA: EPIDEMIOLOGÍA DE LA REEMERGENCIA A LA HIPERENDEMIA. In: Guías de impresión Ltda, editor. 1st ed. Bogota; 2012. p. 249.
11. Solórzano JO, Guzmán MG, Brathwaite O, Bouckennooghe A, Zambrano B, Dayan GH, et al. The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2010 Jan 1;82(1):128–35. Available from: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.2010.09-0346>
12. Cunha RV da, Trinta KS. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2017 Aug;112(8):523–31. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762017000800523&lng=en&tIng=en
13. Pérez-Vera LA, Herrera-García V, Pérez-Matos MC, Díaz-Martínez LA, Villar-Centeno LA, Pinilla-García LS, et al. Clinical Features and Neurodevelopmental Outcomes for Infants with Perinatal Vertical Transmission of Zika Virus, Colombia. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2022 Feb;28(2):453–6. Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/28/2/20-4551_article
14. Honein MA. Recognizing the Global Impact of Zika Virus Infection during Pregnancy. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Mar 15;378(11):1055–6. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMe1801398>
15. Öhlund P, Lundén H, Blomström AL. Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. *Virus Genes* [Internet].

2019;55(2):127–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-018-01629-9>

16. Suzuki Y, Baidaliuk A, Miesen P, Frangeul L, Crist AB, Merklings SH, et al. Non-retroviral Endogenous Viral Element Limits Cognate Virus Replication in *Aedes aegypti* Ovaries. *Curr Biol*. 2020 Sep 21;30(18):3495-3506.e6.
17. Miranda J, Mattar S, Gonzalez M, Hoyos-López R, Aleman A, Aponte J. First report of *Culex flavivirus* infection from *Culex coronator* (Diptera: Culicidae), Colombia. *Virol J*. 2019;16(1):1–6.
18. Goenaga S, Fabbri CM, García JB, Rondan JC, Gardenal CN, Calderón GE, et al. New Strains of *Culex flavivirus* Isolated in Argentina. *J Med Entomol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Jul 12];51(4):900–6. Available from: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/34517>
19. Scaramozzino N, Crance J-M, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of Flavivirus Universal Primer Pairs and Development of a Rapid, Highly Sensitive Heminested Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Flaviviruses Targeted to a Conserved Region of the NS5 Gene Sequences. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2001 May;39(5):1922–7. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.39.5.1922-1927.2001>
20. Sánchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J Virol Methods*. 2001;95(1–2):153–61.
21. Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific

- identification. *J Virol Methods*. 2005;126(1–2):101–9.
22. Laiton-Donato K, Alvarez DA, Peláez-Carvajal D, Mercado M, Ajami NJ, Bosch I, et al. Molecular characterization of dengue virus reveals regional diversification of serotype 2 in Colombia. *Virology* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jan 16];16:62. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1170-4>
 23. Usme-Ciro JA, Gómez-Castañeda AM, Gallego-Gómez JC. Detección molecular y tipificación del virus dengue por RT-PCR y PCR anidada usando oligonucleótidos mejorados. *Rev Salud Uninorte* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jan 16];28(1):1–15. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522012000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=es
 24. Usme-Ciro JA, Méndez JA, Laiton KD, Páez A. The relevance of dengue virus genotypes surveillance at country level before vaccine approval. <https://doi.org/10.4161/hv.29563> [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2022 Jan 16];10(9):2674–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/hv.29563>
 25. Laiton-Donato K, Usme-Ciro JA, Rico A, Pardo L, Martínez C, Salas D, et al. Análisis filogenético del virus del chikungunya en Colombia: evidencia de selección purificadora en el gen E1. *Biomédica* [Internet]. 2016 [cited 2022 Jan 16];36(2):25–34. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572016000600004&lng=en&nrm=iso&tlng=es
 26. Katoh K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2002 Jul

- 15;30(14):3059–66. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkf436>
27. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Teeling E, editor. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2020 May 1;37(5):1530–4. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/37/5/1530/5721363>
28. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2022 Jan 16];33(7):1870–4. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/33/7/1870/2579089>
29. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* [Internet]. 2010 Aug 26 [cited 2022 Jan 19];26(19):2462. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20478603/>
30. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* [Internet]. 1994 [cited 2022 Jan 16];3(5):294–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7881515/>
31. Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. DNA Barcodes Can Distinguish Species of Indian Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2022 Jan 16];44(1):01–7. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article/44/1/01/853346>

32. Mendez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sanchez JA, Tenorio A, et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virology J* [Internet]. 2010 Dec 14;7(1):226. Available from: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-7-226>
33. dos Reis IC, Gibson G, Ayllón T, de Medeiros Tavares A, de Araújo JMG, da Silva Monteiro E, et al. Entomo-virological surveillance strategy for dengue, Zika and chikungunya arboviruses in field-caught *Aedes* mosquitoes in an endemic urban area of the Northeast of Brazil. *Acta Trop*. 2019 Sep 1;197:105061.
34. Instituto Nacional de Salud de Colombia. INS. Semana epidemiológica 33. 2022;33.
35. Organization PAH. Epidemiological Update: Dengue, Chikungunya and Zika in the Context of COVID-19 (23 December 2021). 2021 Dec 23 [cited 2022 Jan 30]; Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55639>
36. Instituto Nacional de Salud de Colombia. INS. Boletín Epidemiológico Semanal [Internet]. [cited 2021 Apr 27]. Available from: <https://www.ins.gov.co/publicaciones/SitePages/BES.aspx?NID=130#>
37. Instituto Nacional de Salud de Colombia. INS. Boletín epidemiológico 36 semana epidemiológica 1 a 24 de 2022 Unidades de análisis y tableros de semana epidemiológica 1 a 24 de 2022 problemas, [Internet]. [cited 2022 Dec 6]. Available from: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2022_Boletín_epidemiologico_semana_36.pdf
38. Rodríguez AJ. INFORME DE EVENTO DENGUE, COLOMBIA, 2018. [cited

- 2022 Aug 4];1–21. Available from: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/DENGUE_2018.pdf
39. Rodriguez A, Gonzalez D, Pardo L. INFORME DE EVENTO DENGUE, COLOMBIA, 2019. [cited 2022 Aug 4]; Available from: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/DENGUE_2019.pdf
40. Freitas LP, Carabali M, Yuan M, Jaramillo-Ramirez GI, Balaguera CG, Restrepo BN, et al. Spatio-temporal clusters and patterns of spread of dengue, chikungunya, and Zika in Colombia. medRxiv [Internet]. 2022 Mar 21 [cited 2022 Aug 6];2022.03.17.22272536. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.03.17.22272536v2>
41. Mercado M, Daza M, Moore CA, Valencia D, Rico A, Álvarez-Díaz DA, et al. Discordant Clinical Outcomes in a Monozygotic Dichorionic-Diamniotic Twin Pregnancy with Probable Zika Virus Exposure. Case Report. Trop Med Infect Dis 2020, Vol 5, Page 188 [Internet]. 2020 Dec 19 [cited 2022 Jan 22];5(4):188. Available from: <https://www.mdpi.com/2414-6366/5/4/188/html>
42. Ospina ML, Tong VT, Gonzalez M, Valencia D, Mercado M, Gilboa SM, et al. Zika Virus Disease and Pregnancy Outcomes in Colombia. N Engl J Med [Internet]. 2020 Aug 6 [cited 2022 Jan 22];383(6):537–45. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1911023>
43. Houé V, Bonizzoni M, Failloux AB. Endogenous non-retroviral elements in genomes of Aedes mosquitoes and vector competence. Emerg Microbes Infect. 2019;8(1):542–55.
44. Houé V, Gabiane G, Dauga C, Suez M, Madec Y, Mousson L, et al.

Evolution and biological significance of flaviviral elements in the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Emerg Microbes Infect.*

2019;8(1):1265–79.

45. Blair CD, Olson KE, Bonizzoni M. The Widespread Occurrence and Potential Biological Roles of Endogenous Viral Elements in Insect Genomes [Internet]. Vol. 34, Current issues in molecular biology. NLM (Medline); 2020 [cited 2021 Feb 4]. p. 13–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31167954/>

Supplementary table 1. Study areas with coordinates

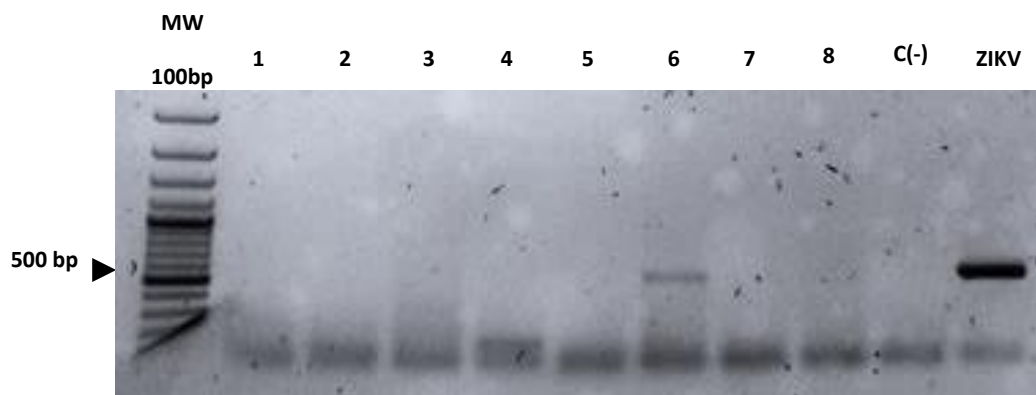
Area	Municipality	Locality	Neighborhood	Latitude	Longitude
Sylvatic	Santa Marta	Guachaca	Quebrada Valencia/La	11,239611110	-
			Piedra	0	73,800000000
Rural	Santa Marta	Santa Marta	Barrio Villa del Campo	11,207649000	-
				0	74,160998000
					0
	Santa Marta	Guachaca	Marquetalia	11,246056000	-
				0	73,575805560
					0
	Santa Marta	Minca	Minca	11,138990000	-
				0	74,120900000
					0
	Santa Marta	Guachaca	Quebrada Valencia	11,243000000	-
			0	73,805111110	
				0	
Santa Marta	Taganga	Taganga	11,267464000	-	
			0	74,189001000	
				0	
Santa Marta	Guachaca	Vereda La Union	11,932257000	73,818063000	
			0	0	
				0	
Santa Marta	Guachaca	Vereda Quebrada Maria	11,238833330	-	
			0	73,788472220	
				0	
Santa Marta	Guachaca	Via al Encanto	11,247462000	-	
			0	73,838933000	
				0	
Urban	Santa Marta	Santa Marta	Barrio 11 de noviembre	11,224416670	-
				0	74,151666670
					0

Santa Marta	Santa Marta	Barrio 17 de diciembre	11,245303000	-
			0	74,180498000
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio 20 de julio	11,251083330	-
			0	74,195861110
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio 20 de Octubre	11,229449000	-
			0	74,143770000
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Asocons	11,215555560	-
			0	74,173500000
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Bolivariana	11,224178000	-
			0	74,170181000
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Ciudad Equidad	11,198861110	-
			0	74,164083330
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio La Lucha	11,217500000	-
			0	74,191694440
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio La Quemada -	12,862583330	-
		Gaira	0	74,217722220
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio La teneria/Puerto	11,235472220	-
		Mosquito	0	74,218833330
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Las Manguitas/La	11,149833330	-
		Paz	0	74,219472220
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Maria Eugenia	11,219911000	-
			0	74,207970000
				0

Santa Marta	Santa Marta	Barrio Modelo - Gaira	11,194611110	-
			0	74,221861110
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Nueva Bettel - Gaira	11,190361110	-
			0	74,214611110
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Oasis	11,238833330	-
			0	74,163944440
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Paraiso - Pantano	11,237194440	-
			0	74,171055560
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Pescaito	11,253194440	-
			0	74,207611110
				0
Santa Marta	Bonda	Barrio Santa Ana	11,233416670	-
			0	74,122777780
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Santa Catalina	11,234502000	-
			0	74,198181000
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Villa Sara	11,238434000	-
			0	74,175709000
				0
Santa Marta	Santa Marta	Barrio Villa Sara	11,238434000	-
			0	74,175709000
				0
Santa Marta	Santa Marta	Batallon Cordoba	11,232217000	-
			0	74,218435000
				0
Santa Marta	Santa Marta	Pozos Colorados	11,169538000	-
			0	74,232477000
				0

Santa Marta	Guachaca	Puerto Nuevo	11,247527780	-
			0	73,830166670
				0
Santa Marta	Santa Marta	Universidad Cooperativa	11,224334000	-
			0	74,171096000
				0

Mosquito samples *Zika virus*-specific PCR assay



Supplementary figure 1. Agarose Gel Electrophoresis of mosquito pools using primers targeting ZIKV

4. INTEGRACIÓN ANCESTRAL DE FRAGMENTOS VIRALES EN EL GENOMA DE LOS ARTRÓPODOS Y SU PAPEL EN LA DINÁMICA ACTUAL DE LOS ARBOVIRUS

Juan Pablo Franco-Salazar¹, Paula Quintero-Cortés¹, Eric Perdomo³, Katherine Laiton-Donato^{1,2}, Gabriel Parra-Henao¹, Winston Rojas Montoya⁴, José Aldemar Usme-Ciro^{1,*}.

¹Centro de Investigación en Salud para el Trópico – CIST, Universidad Cooperativa de Colombia, Santa Marta. ²Unidad de Secuenciación y Genómica, Instituto Nacional de Salud, Bogotá. ³Grupo de Enfermedades Transmitidas por Vectores – ETVs, Secretaría de Salud Distrital, Alcaldía Distrital, Santa Marta. ⁴Grupo de Genética Molecular – GENMOL, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín.

*Autor para correspondencia: Centro de Investigación en Salud para el Trópico - CIST, Universidad Cooperativa de Colombia, Santa Marta, Colombia. Tel: +571 3146289435. Email: jose.usmec@ucc.edu.co

Este estudio fue financiado por MINCIENCIAS (Código 210477757671) y la convocatoria interna CONADI (Código INV1913) de la Universidad Cooperativa de Colombia

Resumen

Los elementos virales endógenos (EVE, del inglés *Endogenous Viral Elements*) derivan de retrovirus y de virus no retrovirales, siendo el resultado de la endogenización de copias del material genético del virus en los cromosomas del hospedero. Al ocurrir esto en células de la línea germinal, los EVE han podido ser transmitidos a las siguientes generaciones.

Dentro de los EVE se ha descrito un subgrupo de elementos de virus no retrovirales denominados NIRV (del inglés *Non-retroviral Integrated RNA Virus*). Estos elementos, derivados de diversas familias y géneros de virus, constituyen un hallazgo de gran interés, debido a que se integran al genoma del hospedero a pesar de no derivar de virus que posean mecanismos de retrotranscripción. Recientemente se ha descrito que durante la infección con virus dengue (DENV), virus Sindbis y virus chikungunya (CHIKV), los fragmentos de ARN se convierten en ADN viral (ADNv) mediante la acción de la actividad retrotranscriptasa propia de las células.

El género *Flavivirus* ha sido reconocido históricamente por incluir un gran número de arbovirus de importancia médica distribuidos alrededor del mundo. Un subgrupo de flavivirus basal a nivel filogenético está constituido por virus que sólo han sido identificados en insectos (ISF, del inglés *Insect-Specific Flavivirus*). Asimismo, se han descrito NIRV derivados de los genomas de ISF, y más crucial aún, estos NIRV han sido sugeridos como parte de un importante mecanismo antiviral del mosquito vector a través la vía de piARN. En la presente revisión se discuten las evidencias de la presencia de NIRV en especies de vectores de importancia médica, como

Aedes (Ae) aegypti y su potencial impacto en la competencia vectorial en zonas endémicas para arbovirus.

Palabras clave : Elementos virales endógenos; artrópodos; inmunidad innata; arbovirus.

Introducción

La interacción ancestral entre los genomas de los virus y sus huéspedes ha sido evidenciada desde hace al menos 5 décadas (1,2). Múltiples estudios han demostrado la aparición espontánea o inducida de genomas del género *Gammaretrovirus* (anteriormente denominados retrovirus tipo C) (3), a partir del cultivo o co-cultivo de células de diferentes especies de mamíferos y aves (4–6).

En 1974, *Benveniste & Todaro* reportaron la presencia de elementos virales endógenos (EVE, por sus siglas en inglés) en el ADN de células de primate, relacionados con el ácido nucleico de un retrovirus similar al virus de la leucemia felina (FeLV) (7). Utilizando ensayos *in vitro* de infección con diferentes retrovirus, se evidenció que FeLV podía generar progenie viral en cultivos celulares de primates, por esto los nombraron retrovirus endógenos (ERV, por sus siglas en inglés). Más recientemente, se han evidenciado inserciones de secuencias de virus no retrovirales (NIRV, del inglés *Non-retroviral Integrated RNA Virus*) adquiridas a lo largo de la evolución en diferentes especies (8).

La capacidad de estos elementos para transmitirse verticalmente depende de su presencia en células de la línea germinal y que su integración no afecte la viabilidad o supervivencia del huésped. Asimismo, su impacto en la evolución de los

huéspedes dependerá del tiempo transcurrido desde que el evento de integración haya ocurrido en los antepasados (9) y del papel funcional que estos elementos adquieran en la respuesta a las presiones selectivas impuestas por el ambiente (10).

Relaciones coevolutivas entre los virus y sus hospederos

Mediante el estudio por microscopía electrónica e hibridación de ácidos nucleicos en tejido placentario de babuino, se observó la producción de ARN similar al virus tipo C, el cual se denominó virus M7 (11). Además de este gammaretrovirus endógeno transmitido verticalmente en primates, experimentos similares demostraron la presencia y transmisión vertical de ERV en diversas especies (7).

Estos hallazgos, sumados a las observaciones de expresión diferencial, condujeron al descubrimiento del papel de los retrovirus endógenos en la formación de la placenta de los primates, roedores, rumiantes y carnívoros (12). El gen codificante para la proteína de envoltura (*env*) de retrovirus ancestrales que infectaron y alcanzaron la línea germinal de los antepasados de los mamíferos placentarios, habría derivado luego de la evolución de millones de años, en el origen de las proteínas denominadas sincitinas, cuyo papel en la fusión de células, origen y complejidad del sincitiotrofoblasto que forma la interfaz materno-fetal, habría determinado el establecimiento de los mamíferos placentarios (13,14).

Una estructura similar a la placenta surgió como convergencia evolutiva en un grupo de reptiles (familia Scincidae), distante filogenéticamente de los mamíferos, alcanzando un máximo nivel de complejidad en los lagartos vivíparos del género *Mabuia* que se distribuyen ampliamente a nivel mundial (15). La identificación del gen *Sincitin-Mab1*, que codifica para una sincitina de origen retroviral con actividad

fusogénica, conservada en todas las especies que comprenden este género, evidencia el impacto de las infecciones virales en el destino evolutivo y radiación adaptativa de las especies biológicas.

De igual forma, se ha demostrado que la proteína *Arc* es fundamental para la plasticidad sináptica, y que está evolutivamente relacionada con la proteína viral *gag* y la formación de estructuras similares a las cápsides de los virus, lo que le permite transferir los ARNm entre las células del sistema nervioso, sirviendo como mediador del tráfico intercelular (16). *Arc* se originó a partir de retrotransposones Ty3/ Gypsy y se adaptó en vertebrados superiores para funciones sinápticas. Además, la eliminación genética de *Arc* en modelos experimentales *in vivo* produce déficit de memoria sin alterar los comportamientos de aprendizaje (17).

Por otro lado, se ha sugerido un papel protector de los ERV frente a las infecciones virales, como resultado de la activación de genes estimulados por interferón (ISG, por sus siglas en inglés), que generan un estado antiviral (18).

La biogénesis de los EVE aún no ha sido totalmente dilucidada, pero se han propuesto algunas vías que podrían explicar el proceso. Los retrovirus son los virus que por excelencia se integran en el genoma hospedero. Debido a su estrategia de replicación realizan un paso obligatorio en el núcleo, la infección de células de la línea germinal se convierte en una oportunidad para generar alteraciones heredables que trascienden a las generaciones posteriores (8)(19). Para los virus no retrovirales que se integran al genoma del hospedero, se han descrito estrategias que ayudan a entender su inserción. La integración se produce a través de la

interacción con secuencias móviles LINE (del inglés: *Long Interspersed Nuclear Elements*), lo que se explicará más adelante en este texto.

Los EVE revelan complejas interacciones coevolutivas entre los virus y su hospedero. Por ejemplo, los ERV interactúan como elementos móviles o retrotransposones (20), con la capacidad de integrarse de manera repetida en diferentes regiones del genoma del hospedero.

Hay dos tipos principales de retrotransposones. Los retrotransposones de repeticiones terminales largas (LTR), que son similares a los retrovirus en sus regiones 5' y 3' no traducidas (5'UTR y 3'UTR) (21). Estos retrotransposones sintetizan un intermediario de ADN bicatenario a partir de un molde de ARN que posteriormente se integra en los cromosomas, utilizando un mecanismo similar al de los transposones (22,23). Los retrotransposones LTR codifican una proteína similar a la polimerasa (*pol*), que contiene dominios de: transcriptasa reversa (RT), ribonucleasa H (RNasa H), proteasa (PR) e integrasa (IN) (24,25). Análisis de secuencias de genomas disponibles dan como resultado que las familias virales de EVE denominadas *Metaviridae* y *Pseudoviridae* se encuentran mayormente representadas por los retrotransposones LTR, estrechamente relacionadas a la familia *Retroviridae* (21). Asimismo, al interior de la familia *Retroviridae*, existen evidencias de ERV derivados de virus de los géneros *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus* y *Epsilonretrovirus* (26,27)

Por otra parte, los retrotransposones no-LTR se dividen en dos grupos: elementos largos intercalados (LINE, del inglés *Long Interspersed Elements*) y elementos cortos intercalados (SINE, del inglés *Short Interspersed Elements*).

Los LINE están conformados por secuencias de aproximadamente 6 kb. En la 5'UTR se ubica la región promotora, la cual da inicio a la expresión de los retrotransposones. También se ubica una región intermedia de longitud variable que contiene los marcos de lectura abierta (ORF) para la expresión de las proteínas. Finalmente, en el 3'UTR se encuentra una secuencia rica en adeninas y timinas encargada de dirigir la poliadenilación (20,28), diferenciándose de los retrovirus y retrotransposones como se explica en la figura 1.

Los no-LTR LINE presentan características particulares para cada elemento, por ejemplo, el elemento LINE-1 humano (L1) tiene alta variación en sitios donde se integra; contrario a los elementos R1 y R2 de insecto que solo se insertan en secuencias muy precisas de los genes de ARN ribosomal (29)

Por su parte, los SINE son elementos de aproximadamente 300 pb, no codifican para una proteína funcional de RT y dependen de los elementos móviles. Los no-LTR SINE no pueden transponerse por sí mismos, por lo cual secuestran la maquinaria de los retrotransposones LINE, como es el caso del elemento Alu en humanos (30).

Los retrotransposones son altamente repetitivos y en algún momento se consideraron ADN basura, por el gran desconocimiento que existe sobre su papel funcional.

La evolución del genoma de los vertebrados ha estado intervenida por múltiples eventos como las mutaciones, duplicaciones, traslocaciones, recombinaciones, etc,

y se ha evidenciado que los retrotransposones no-LTR han cumplido un rol importante en el aumento de la variación del genoma (31,32).

Uno de los retrotransposones no-LTR más estudiados es el elemento L1. La inserción de L1 en el genoma humano representa aproximadamente 1 de cada 1200 mutaciones y algunas de ellas pueden causar enfermedades (33,34). Normalmente, este retrotransposon permanece inactivo por marcas epigenéticas impidiendo que se transcriba y posteriormente se inserte. En 2019 *Sultán y col*, clonaron en una línea celular humana, un plásmido que expresaba L1, eliminando las marcas epigenéticas. Así pudieron evidenciar que los elementos se insertaron en el genoma del hospedero con aproximadamente 1500 inserciones, concluyendo que este retrotransposon se puede copiar a sí mismo y, dependiendo de la región de integración generar mutagénesis insercional, causando enfermedades como la hemofilia y el cáncer (35). Este trabajo ayudó a ilustrar las trayectorias coadaptativas de elementos transponibles (ET), los cuales tienen la capacidad de moverse y/o multiplicarse a nuevas posiciones en el genoma, generando inestabilidad genómica (35) La abundancia de los retrotransposones varía significativamente entre especies (3% al 20%) (36–40)

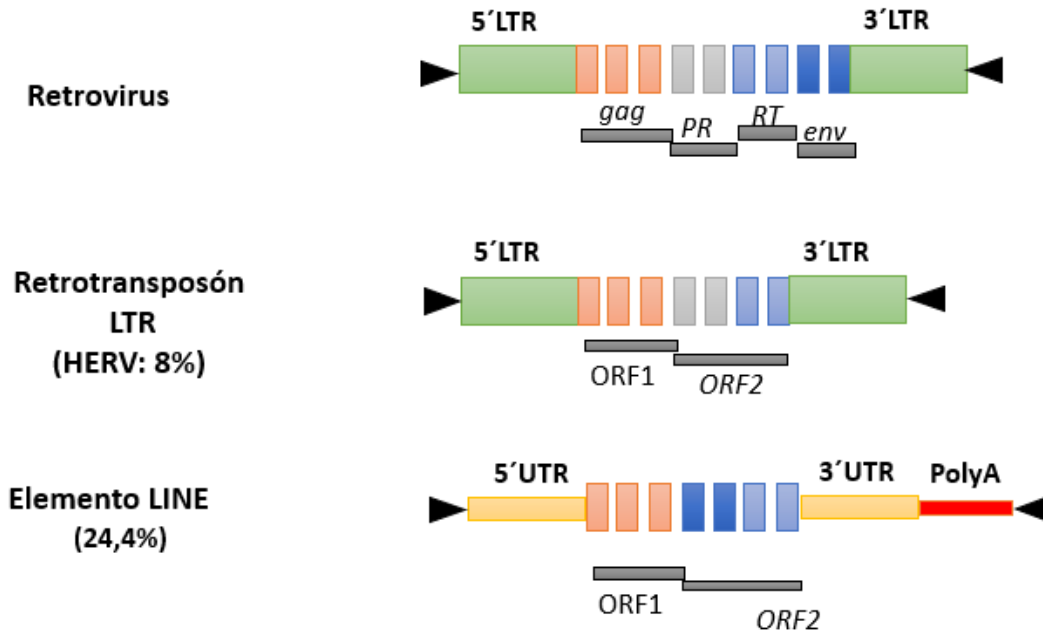


Figura 1. Esquema comparativo de la estructura de retrovirus, retrotransposon LTR y elementos LINE con el porcentaje que se encuentra en el genoma humano. Las cabezas de flecha horizontales representan la duplicación en los blancos de inserción, TSD (*Target Site Duplication*), gag: proteína de la cápside, PR: proteasa, RT: transcriptasa inversa, env: proteína de envoltura.

Endogenización de fragmentos virales a partir de virus de ARN no retrovirales

Ensayos experimentales de infecciones persistentes individuales con diversos virus ARN no retrovirales, realizados en 1975 por *Zhdanov y cols*, sugieren que la actividad de transcriptasas reversas (RT) de la célula huésped permite copiar fragmentos de ARN viral que son posteriormente integrados como ADN en el genoma del huésped (41). Este estudio permitió demostrar la integración de ADN derivado del genoma de virus ARN como el sarampión, el virus Sindbis (SINV) y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) en células de aves,

mamíferos e incluso humanas, luego de la infección persistente. Estudios más recientes han permitido la identificación de fósiles virales similares a bornavirus y ebolavirus en el genoma de los mamíferos (4,42).

La generación de especies de ADN viral (ADNv) a partir de virus ARN no retrovirales es un requisito indispensable para su posterior integración, dependiente de la actividad transcriptasa inversa de la célula, presumiblemente derivada de los retrotransposones (43).

Los EVE de virus no retrovirales, también conocidos como NIRV se consideran raros, ya que en general se trata de virus citoplasmáticos cuyo ciclo de replicación natural no involucra la síntesis de ADN. Sin embargo, NIRV derivados de virus vegetales han demostrado ser frecuentes en el genoma de una gran diversidad de insectos (44) y en la actualidad se consideran una ventaja evolutiva como fuente de memoria inmune ante infecciones virales (10).

Aún no existe evidencia de un mecanismo preciso para la endogenización de los NIRV. Se sugiere que ésta podría ser el resultado de la unión al ADN no homólogo en los sitios de daño del ADN (45).

Después de 30 años de los ensayos realizados por Zhdanov, *Crochu* y *cols* fue confirmada la existencia y transferencia de los NIRV en células eucariotas. Se reportó la presencia de más de 30 secuencias de flavivirus transmitidos por artrópodos y flavivirus insecto específicos (ISF, del inglés *Insect-Specific Flavivirus*) en líneas celulares derivadas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (46–48). Además, se pudo identificar secuencias de ADN relacionadas con la proteína no estructural NS3

en las líneas celulares no infectadas. Las inserciones se encontraban en tres puntos diferentes del genoma de la línea celular, una inserción principal que incluye un ORF que corresponde aproximadamente al 50% de la poliproteína de flavivirus. Se observó también la presencia del virus CSA (del inglés: *Cell silent agent*) en el genoma de los mosquitos evaluados. Este hallazgo, así como las regiones ricas en transposones en el genoma de mosquitos sugieren un papel importante de los NIRV en la relación virus-hospedero (49).

Belyi y cols, en el 2010, identificaron NIRV en vertebrados, comparando 5666 secuencias de genes virales de todas las familias no retrovirales reportadas con 48 secuencias genómicas de vertebrados. Se identificaron aproximadamente 80 secuencias de ADN genómico viral en 19 especies de vertebrados, que probablemente se insertaron hace alrededor de 40 millones de años. La mayoría de los NIRV encontrados son de virus similares a virus ébola, Marburg y bornavirus (4,42).

Al aumentar el número de nuevos NIRV descritos, se hace importante dilucidar el mecanismo de integración, debido a que estos virus no retrovirales no codifican para ninguna enzima con actividad RT e integrasa.

Se ha reportado la integración de secuencias parciales del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) *in vitro* e *in vivo* en modelos murinos y la participación de la partícula A intracisternal (IAP) (retrotransposon LTR fundamental para la integración eficiente) (50).

Para el virus de la enfermedad Borna (BDV), el cual es también un virus de ARN de sentido negativo cuyo ciclo exógeno de replicación se realiza en el núcleo, se demostró que BDV en su ciclo endógeno al integrarse al cromosoma está delimitado por una cola poli-A y por un TSD (del inglés: *Target Site Duplication*) (42). Se establece que LINE-1 está participando de la transcripción inversa e integración del NIRV de BDV, sugiriendo que la integración de los NIRV está mediada por retrotransposones LTR o no- LTR (51).

Los NIRV son altamente importantes debido a que algunos se originaron a partir de virus patógenos exógenos de gran importancia en salud pública (52,53). De igual modo, la relación entre los NIRV y los arbovirus es importante para la salud pública debido a que se conoce poco de la interacción virus-mosquito y del impacto de los NIRV en la transmisión de arbovirus estrechamente relacionados al virus responsable de la integración.

Palatini y col, utilizando una batería de 424 virus ARN, buscados en 22 genomas de mosquitos publicados hasta la fecha, identificaron una alta abundancia de NIRV, 81% de los cuales se presentaron en el género *Aedes*. De estos, el 63% se identificaron en *Ae. aegypti*, y el 37% en *Ae. albopictus* (43,53).

Nag y cols evaluaron e identificaron formas de ADNv producidas por las infecciones persistentes de los arbovirus *West Nile virus*, *Dengue virus* y *La Crosse virus* en líneas celulares de mosquito (54) . Las secuencias de ADNv identificadas representan regiones aleatorias del genoma viral, característica que denominaron “parches”. Posteriormente, dando continuidad a los resultados encontrados, se evaluó la presencia de formas de ADNv a partir de otros virus ARN (virus Zika-ZIKV)

en líneas celulares de mosquito y en mosquitos, obteniendo como resultado la presencia de secuencias virales distribuidas en el genoma (45,55). La formación de ADNv estaría estrechamente relacionada con la transcriptasa reversa de los retrotransposones celulares (45,55,56). Estas secuencias de ADNv son el primer paso para la integración en el genoma del hospedero, como se evidencia en la figura 2. Hasta la fecha no se ha descrito una vía clara para la inserción del ADNv, se presume que podría ser por recombinación no homóloga mediante el mecanismo de reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ del inglés *Non-homologous DNA end joining*) (46).

Recientemente, Z. Whitfield y cols realizaron hallazgos importantes sobre la organización de los NIRV presentes en la línea celular Aag2 de *Ae. aegypti* (55). Utilizando la contigüidad de los NIRV, asociada a las lecturas de secuencias largas del genoma, se identificaron 472 NIRV en el genoma de Aag2 con un total de 8 familias presentes. Las familias de mayor prevalencia son Rhabdoviridae, Flaviviridae y Chuviridae. Los NIRV encontrados se relacionan con gran variedad de ISF como: *Aedes flavivirus*, *Kamiti River virus*, *Mosquito flavivirus*, *Culex flavivirus* y *Cell fusing agent virus* para el genoma de *Ae. aegypti*. Además, se pudo establecer que los NIRV se adquieren mediante recombinación con retrotransposones LTR específicos (familia Ty3, gyps y Pao Bell) y que se organizan en loci de aproximadamente 50 kb. En los loci se encuentran LTR y NIRV, obteniendo mayor densidad de ARN asociado con la proteína PIWI (piARN), proponiendo que los NIRV generan piARN, y que pueden establecer una respuesta antiviral o tolerancia a la infección viral, sugiriendo un efecto directo en la

competencia vectorial, lo que será de utilidad para la vigilancia entomo-virológica en la salud pública de las arbovirosis (57).

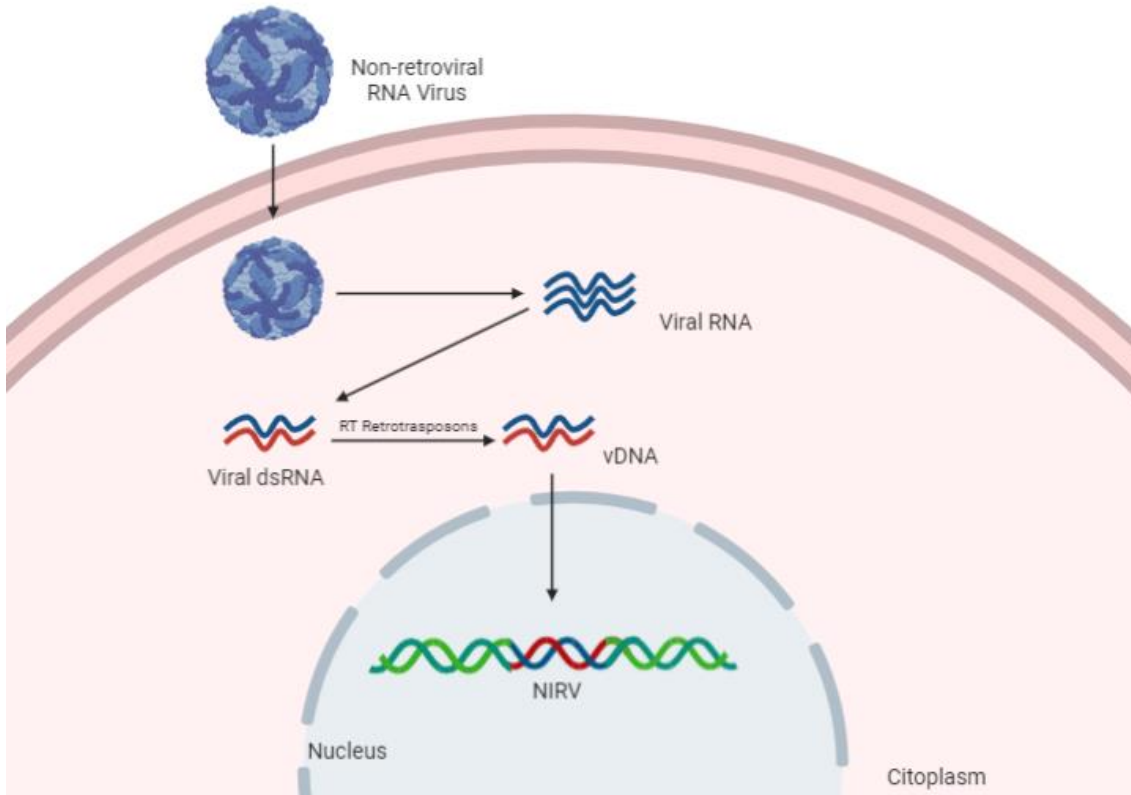


Figura 2. Formación de NIRV en una célula infectada por un virus ARN no retroviral. El virus ARN no retroviral infecta la célula liberando el ARN viral en el citoplasma para la replicación y producción de progenie viral. En este punto se inicia un paso alternativo a la biogénesis canónica del virus. El ARN viral es transcrito a ADNv mediante el uso de las RT de los retrotransposones. Así ingresa al núcleo y se inserta al genoma del hospedero. Diagrama creado en BioRender.com.

La vía de ARN que interactúa con PIWI es un potente mecanismo antiviral en insectos

Virus transmitidos por artrópodos como el dengue, Zika, CHIKV, fiebre amarilla, entre otros, se replican en su vector sin causarle patogénesis aparente. Se ha

sugerido su capacidad para tolerar altos niveles de proliferación del virus sin sufrir una patología significativa. Las células de insectos y los mosquitos infectados con arbovirus, producen fragmentos de ADN viral (ADNv) que se integran en los genomas de los mosquitos (45,54,58), La síntesis de ADNv está mediada por la actividad transcriptasa inversa de los transposones del mosquito, utilizando genomas virales defectuosos como plantillas y está modulada por Dicer-2 (59) Las transcripciones derivadas de EVE insertadas en grupos de piARN activan la ruta de piARN, que se expande en los mosquitos, para generar piARN derivados de virus (piARNv) que contribuyen a la resistencia antiviral del mosquito (60,61) Esto se demostró cuando mosquitos *Ae. albopictus* se infectaron CHIKV tratados con AZT, un inhibidor de la transcriptasa inversa, esto redujo los niveles de ADNv y aumentó la mortalidad del vector después de la infección sin alteraciones en las cargas virales, lo que sugiere que la tolerancia a la enfermedad por arbovirus depende de la formación de ADNv (62,63)

Este mecanismo se ha descrito ampliamente para *Drosophila (D.) melanogaster* como un sistema antiviral que utiliza vías de ARN interferente (ARNi) a partir de NIRV (64–67). De igual forma sucede en *Ae. aegypti*, uno de los vectores más importantes de arbovirosis, con una alta importancia en salud pública.

Goic y cols dilucidaron la presencia de mecanismos similares a los de *D. melanogaster* en vectores de enfermedades humanas (56). Evaluando CHIKV de linaje Índico en mosquitos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, comprobaron la producción de pequeños ARN a partir de NIRV como posible respuesta inmune antiviral. Estos pequeños ARN serían procesados a través de la vía de piARN, siendo encontrados

en alta densidad en cultivos celulares de mosquitos, mientras que en mosquitos son apenas detectables. Al aumentar las evidencias sobre los NIRV como plantilla para generar pequeños ARN interferentes, aumenta el interés en dilucidar su biogénesis, implicados en la respuesta inmune viral de los mosquitos y/o su papel en la tolerancia a la infección. Relacionados principalmente con la regulación epigenética y postranscripcionales de los retrotransposones.

Los ARNs de interferencia (ARNi) son secuencias pequeñas de ARN que, al unirse al ARN mensajero (ARNm) por complementariedad, provocan el silenciamiento génico post-transcripcional mediante la degradación de ARNm o bloqueo de la traducción. Se han descrito tres vías para los ARNi donde cada clase de ARN difiere en su tamaño y biogénesis. La primera vía es la de los pequeños ARN interferentes (siARN, del inglés *Small Interfering RNA*) que se generan a partir de ARN exógeno de doble cadena (dsARN) o a partir de transcritos celulares. Los siARN se asocian con proteínas Argonauta-2 (Ago2) y el complejo de silenciamiento por ARN (RISC), dando como resultado la escisión endonucleolítica del ARN blanco.

Por otro lado, la vía de los microARN (miARN) altamente conservada, consiste en pequeños ARN independientes que median la regulación de genes del hospedero, se procesan a partir de estructuras "tallo-bucle" de ARN, dependientes de Dicer-1 y Ago1, que inhiben la traducción mediante una complementariedad parcial o total entre el miARN y el ARNm (70).

Por último, la vía de los ARN que se asocian con la proteína PIWI (piARN), es mediada por secuencias de ARN de aproximadamente 23-36 nucleótidos, las cuales son procesadas mediante precursores de ARN monocatenarios que se transcriben a

partir de grupos de piARN y transposones activos. Al estar maduros los piARN se asocian con la proteína PIWI para formar los complejos de silenciamiento mediante el apareamiento de bases de ARN-ARN.

Los piARN tienen como función canónica la protección de la integridad del genoma de las células germinales, mediante el silenciamiento e inactivación de transposones, siendo la vía encargada de controlar los elementos transponibles.

La biogénesis piARN se ha descrito principalmente para *D. melanogaster*, en la que se conocen dos vías de procesamiento de piARN. El procesamiento primario que se lleva a cabo en las células germinales y somáticas de *Drosophila* procesando piARN de aproximadamente 23-29 nucleótidos, denominada como una vía genéticamente codificada para producir silenciamiento primario, detectando y manteniendo los transposones bajo control o apagando la transcripción después de la meiosis. Por otro lado, la vía de procesamiento de piARN secundarios (amplificación ping-pong), la cual es exclusiva de células de la vía germinal donde los piARN se amplifican en un bucle con la participación de las proteínas Aubergine (Aub) y Argonaute3 (AGO3), localizados en el nuge (compartimiento perinuclear de las células germinales de animales) o también llamado “cuerpos Yb”, siendo una vía adaptativa para amplificar piARN y reprimir transposones activos (71–73).

Ante esto, se estimó que aproximadamente 30 de 48 especies de artrópodos presentan piARN relacionados con NIRV descritos (69). Los mecanismos de inmunidad antiviral están mediados por la transcripción y la producción de piARN primarios y secundarios en mosquitos, usando los NIRV como plantilla.

El procesamiento de los piARN primarios se genera a partir de regiones enriquecidas con remanentes de transposones, los cuales interactúan con la endonucleasa Zucchini (Zuc) (74), cortando intermediarios de piARN, produciendo piARN con una uridina en la primera posición de nucleótidos (1U) que se carga a las proteínas PIWI y Aub. El piARN completa su proceso de maduración cuando en el extremo 3' se localiza un 2'- O- metilo; siendo el paso final en el ensamblaje del complejo piARN-enzima (75–77), como se puede observar en la Figura 3. Los piARN maduros antisentido (capaces de actuar como oligonucleótidos para reprimir elementos de ADN móviles complementarios) se translocan al núcleo e interactúan con las proteínas Asterix y Panoramix realizando el silenciamiento transcripcional de los transposones (78,79).

Posteriormente, los piARN primarios antisentido (piARN maduros) son cargados en Aub en el citoplasma para el reconocimiento y corte del mRNA y la producción de piARN secundarios asociados con Ago3, ciclo denominado ping-pong. Es así como a partir del corte en el ARNm de transposones de piARN antisentido se genera piARN sentido, complementario a los elementos blanco (73), permitiendo que los piARN sentido y antisentido aumenten la producción de ARN capaces de silenciar la respuesta activa de los transposones (80,81). Los piARN sentido asociados a Ago3 se caracterizan por tener residuos de adenosina en su décimo nucleótido (10A), por lo cual el hallazgo de un piARN con 1U y 10A, se considera producto del procesamiento secundario ping-pong, confiriendo especificidad en la vía piARN, ya que la amplificación de piARN primarios es diversa y solo los piARN que realicen amplificación secundaria son los que reconocen transposones activos (Fig. 2) (82).

Finalmente, los piARN antisentido primario y el piARN sentido recién producido tienen una superposición de aproximadamente 10 nucleótidos (nt).

Se han denominado clústeres de piARN a regiones del genoma del mosquito conformadas por secuencias de elementos transponibles que generan ARN monocatenario de aproximadamente entre 24-30 nt, los cuales son nombrados piARN, y demuestran que la interacción de los retrotransposones y los piARN es suficiente para generar una nueva ubicación en el genoma, formando un nuevo locus (77). Cualquier secuencia que se inserte en los clústeres de piARN será fuente de nuevos piARN (83).

En *Aedes spp.*, la vía de piARN se detecta en el tejido somático de los mosquitos y tiene algunas diferencias con la descrita para *D. melanogaster*. En *Ae. aegypti* intervienen un número mayor de proteínas PIWI (Piwi 1 -7 y Ago3). Piwi5 y Ago3 se unen al piARN viral (piARNv) antisentido. Piwi5 se une a los piARN marcado con 1U y Ago3 se une a piARN 10A Los precursores de los piARN de *Ae. aegypti* son: ARN viral, secuencias de transposones y ARNm (Fig.3) (80–82).

La importancia de los mosquitos del género *Aedes* está relacionada con su impacto en salud pública como vectores de virus transmisibles a los humanos, por lo cual se ha descrito la presencia de pequeños ARN producto de infecciones con arbovirus y su interacción con los transposones del vector (84).

Se ha sugerido que esta vía antiviral en mosquitos no elimina el patógeno por completo, relacionándose así con una infección persistente que ayuda a que el mosquito pueda tener en su organismo al virus, pero sin verse afectado por éste.

Tal evento se ha nombrado como tolerancia viral, ya que se controla la replicación del virus y se reduce la carga viral (57,85).

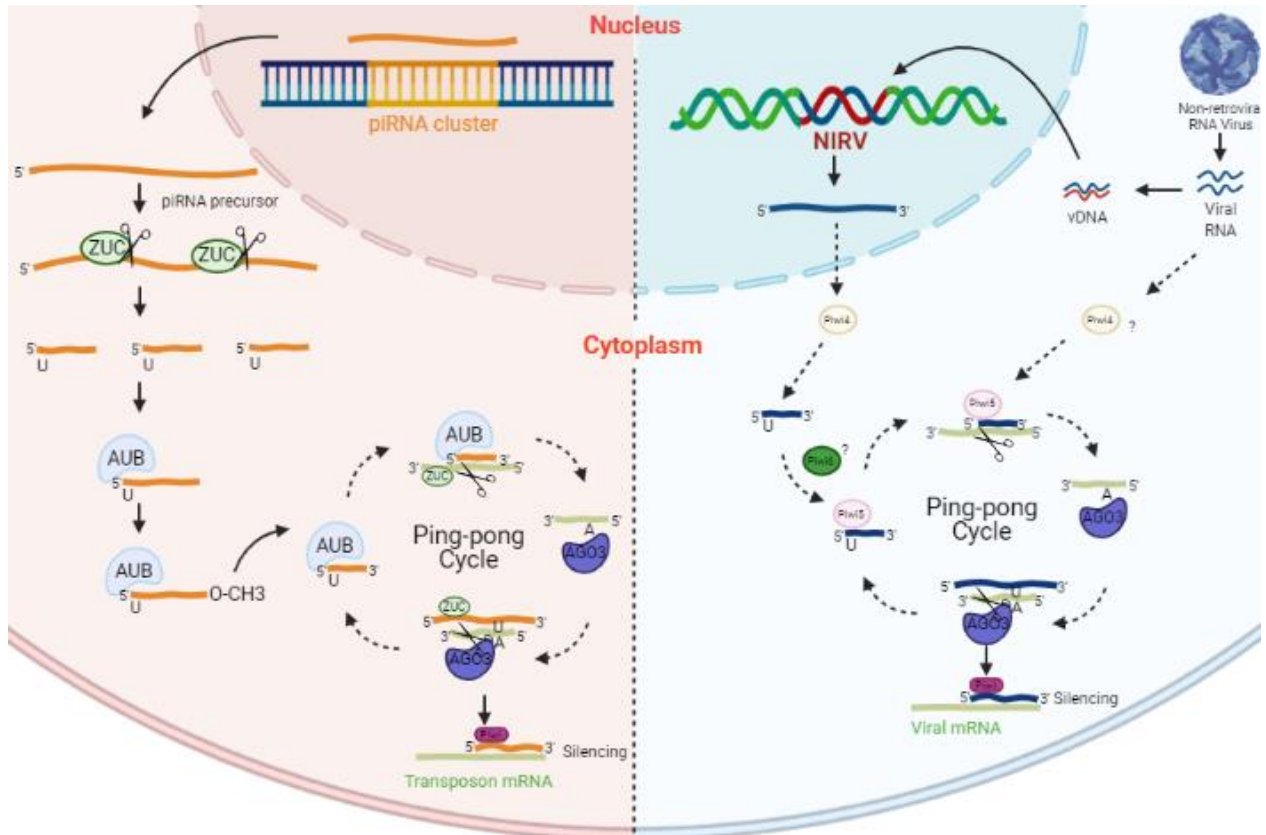


Figura 3. Modelo de biogénesis de piARN en *D. melanogaster* (Izquierda) y *Ae. aegypti* (Derecha). Diagrama creado en BioRender.com.

En las células de la línea germinal de ovario de *Drosophila*, la vía piARN se inicia a partir de un ARNi precursor (pre-piARN) en el núcleo. Cuando se conduce al citoplasma donde tiene lugar la biogénesis del piARN primario, los pre-piARN son guiados por la endonucleasa Zuc que corta el pre-piARN y produce secuencias con la característica 1U en el extremo 5' del piARN. Los piARN (1U) se guían a Aub para que el bucle de amplificación de Ping-Pong (biogénesis de piARN secundario) inicie.

La biogénesis secundaria de piARN -1U se unen a Aub guiando la transcripción de transposones complementarios con la participación de Zuc. Los productos de piARN cortados y maduros se reconocen por tener la firma del ciclo ping-pong; 1U y 10A. La biogénesis de piARN en el mosquito *Ae. aegypti*, se ha estado dilucidando recientemente. Se presume que inicia a partir de precursores de piARN (pre-piARN), producto de la transcripción de los NIRV que se hayan integrado producto de infecciones pasadas persistentes (72,78). El pre-piARN en el citoplasma es cargado por la proteína Piwi4. El ciclo ping-pong inicia el bucle de amplificación y el complejo 1U-piARN / Piwi5 (Piwi6) el cual busca transcritos complementarias para iniciar la hibridación y el corte. Los productos de piARN cortados con la característica 10A se unen luego a Ago3 y de manera similar a Piwi5. El transcrito final y maduro tiene homología con el ARNm viral generando una regulación sobre éste (57,71,86).

Recientemente se han publicado dos estudios experimentales que relacionan la interacción de ISF, NIRV y arbovirus. El primer estudio evaluó *in vitro* e *in vivo* el comportamiento entre arbovirus y la cepa del virus del agente de fusión celular (CFAV), apoyando la hipótesis de que los ISF pueden reducir la transmisión de arbovirus, en cultivos celulares y mosquitos previamente infectados con CFAV, y posteriormente infectados con virus dengue o virus Zika, dando como resultado menor propagación de la infección arboviral y estableciendo que la reducción de la infección por arbovirus fue más drástica cuando la infección de CFAV se estableció durante un período de tiempo más largo, antes de la inoculación de arbovirus.

El segundo estudio investigó el papel del NIRV del CFAV que se encuentra naturalmente en las poblaciones de *Ae. aegypti*. Usando CRISPR- Cas9 crearon

mosquitos *Ae. aegypti* sin el NIRV del CFAV, los cuales fueron infectados posteriormente con CFAV. En ausencia del NIRV de CFAV se obtuvo como resultado mayor replicación de CFAV y la evidencia de que los piARN cumplen una función antiviral al ser producidos en presencia de un NIRV y su virus afín (48,87,88)

La mayoría de los NIRV descritos hasta la fecha en vectores de importancia médica difieren de los arbovirus que circulan en la actualidad, por lo cual, urge la necesidad de establecer su impacto real en la competencia vectorial y dinámica de circulación de las arbovirosis en zonas endémicas. Asimismo, se hace necesario avanzar en la comprensión de los mecanismos de inmunidad antiviral de los artrópodos de importancia médica, que puedan aportar al desarrollo de nuevas estrategias de control.

Conclusiones

El estudio de elementos endógenos virales ha cobrado mayor importancia en la última década, esto debido al aporte de la tecnología con mayor resolución y al enriquecimiento de las bases de datos de secuencias genómicas, lo que ha aumentado el número de nuevos EVE reportados en vertebrados e invertebrados.

El mecanismo que se ha descrito para los retrotransposones ha sido propuesto para explicar la endogenización de los EVE y la participación específica de cada clase de retrotransposones (LTR y no-LTR).

Los EVE se originan por infecciones persistentes durante la línea de tiempo, y la mayoría de NIRV son provenientes de ISF, probablemente por la presión de selección que actúa sobre ellos. Esto contribuye a la evolución de los hospederos y

aporta a la carrera armamentista virus-hospedero que se lleva a cabo desde hace millones de años. Al caracterizar los NIRV, se ha podido establecer su ubicación específica en el genoma, cómo los “grupos de piARN” en mosquitos, son importantes para la tolerancia a la infección viral y la inmunidad antiviral a partir del mecanismo de ARNi. Basados en las evidencias presentadas, los NIRV modulan la competencia vectorial mediante la asociación de retrotransposones para su endogenización y posterior producción de piARN. Entender este mecanismo aporta al desarrollo de nuevas estrategias de vigilancia entomo-viológica.

Las evidencias presentadas en este escrito nos brindan una nueva perspectiva sobre la virología, biología evolutiva y biología celular de la relación virus-hospedero, para arbovirosis de alto impacto en salud pública.

Referencias

1. Aaronson SA, Hartley JW, Todaro GJ. Mouse leukemia virus: «spontaneous» release by mouse embryo cells after long-term in vitro cultivation. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1969 [citado 26 de septiembre de 2020];64(1):87-94. Disponible en: [/pmc/articles/PMC286130/?report=abstract](#)
2. Baluda MA. Widespread Presence, in Chickens, of DNA Complementary to the RNA Genome of Avian Leukosis Viruses. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 1 de marzo de 1972 [citado 26 de septiembre de 2020];69(3):576-80. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.69.3.576>
3. Pringle CR. Virus taxonomy--San Diego 1998. Arch Virol [Internet]. 7 de abril de 1998 [citado 26 de septiembre de 2020];143(7):1449-59. Disponible en:

<https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2430/article/10.1007/s007050050389>

4. Belyi VA, Levine AJ, Skalka AM. Unexpected inheritance: Multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate Genomes. PLoS Pathog [Internet]. julio de 2010 [citado 19 de julio de 2020];6(7):1-13. Disponible en: </pmc/articles/PMC2912400/?report=abstract>
5. Anderssen S, Sjøttem E, Svineng G, Johansen T. Comparative analyses of LTRs of the ERV-H family of primate-specific retrovirus-like elements isolated from marmoset, African green monkey, and man. Virology [Internet]. 21 de julio de 1997 [citado 24 de julio de 2020];234(1):14-30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9234943/>
6. Benveniste RE, Todaro GJ. Evolution of C-type viral genes: Inheritance of exogenously acquired viral genes. Nature [Internet]. 1974 [citado 27 de septiembre de 2020];252(5483):456-9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/252456a0>
7. Benveniste RE, Lieber MM, Livingston DM, Sherr CJ, Todaro GJ, Kalter SS. Infectious C-type virus isolated from a baboon placenta. Nature [Internet]. 1974 [citado 1 de julio de 2020];248(5443):17-20. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4131937/>
8. Katzourakis A, Gifford RJ. Endogenous viral elements in animal genomes. Malik HS, editor. PLoS Genet [Internet]. 18 de noviembre de 2010 [citado 1 de agosto de 2020];6(11):e1001191. Disponible en:

<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1001191>

9. Benveniste RE, Todaro GJ. Homology between type C viruses of various species as determined by molecular hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1973 [citado 23 de junio de 2020];70(12 (I)):3316-20. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4357865/>
10. ter Horst AM, Nigg JC, Dekker FM, Falk BW. Endogenous Viral Elements Are Widespread in Arthropod Genomes and Commonly Give Rise to PIWI-Interacting RNAs. *J Virol* [Internet]. 19 de diciembre de 2018 [citado 21 de julio de 2020];93(6):2124-42. Disponible en: <http://jvi.asm.org/>
11. Benveniste RE, Todaro GJ. Evolution of type C viral genes: preservation of ancestral murine type C viral sequences in pig cellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1975 [citado 9 de marzo de 2022];72(10):4090. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1011144/>
12. Griffith OW, Wagner GP. The placenta as a model for understanding the origin and evolution of vertebrate organs [Internet]. Vol. 1, *Nature Ecology and Evolution*. Nature Publishing Group; 2017 [citado 29 de septiembre de 2020]. p. 1-10. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41559-017-0072>
13. Funk M, Cornelis G, Vernochet C, Heidmann O, Dupressoir A, Conley A, et al. Capture of a Hyena-Specific Retroviral Envelope Gene with Placental Expression Associated in Evolution with the Unique Emergence among Carnivorans of Hemochorial Placentation in Hyaenidae. *J Virol* [Internet]. 21 de noviembre de 2018 [citado 29 de septiembre de 2020];93(4). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30411111/>

en: <https://doi.org/10.1128/JVI>

14. Sha M, Lee X, Li X ping, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* [Internet]. 17 de febrero de 2000 [citado 14 de julio de 2020];403(6771):785-9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/35001608>
15. Cornelis G, Funk M, Vernochet C, Leal F, Tarazona OA, Meurice G, et al. An endogenous retroviral envelope syncytin and its cognate receptor identified in the viviparous placental Mabuya lizard. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 19 de diciembre de 2017 [citado 4 de julio de 2020];114(51):E10991-1000. Disponible en: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1714590114
16. Tristem M. Identification and Characterization of Novel Human Endogenous Retrovirus Families by Phylogenetic Screening of the Human Genome Mapping Project Database. *J Virol* [Internet]. 15 de abril de 2000 [citado 24 de julio de 2020];74(8):3715-30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10729147/>
17. Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, et al. Arc/Arg3.1 Is Essential for the Consolidation of Synaptic Plasticity and Memories. *Neuron*. 9 de noviembre de 2006;52(3):437-44.
18. Srinivasachar Badarinarayan S, Sauter D. Switching Sides: How Endogenous Retroviruses Protect Us from Viral Infections. Gack MU, editor. *J Virol* [Internet]. 24 de mayo de 2021;95(12). Disponible en:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02299-20>

19. Gifford R, Tristem M. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses [Internet]. Vol. 26, *Virus Genes*. Springer Netherlands; 2003 [citado 14 de julio de 2020]. p. 291-315. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1024455415443>
20. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [Internet]. 15 de febrero de 2001 [citado 5 de julio de 2020];409(6822):860-921. Disponible en: www.nature.com
21. Boeke JD, Corces VG. Transcription and Reverse Transcription of Retrotransposons. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 28 de octubre de 1989 [citado 5 de julio de 2020];43(1):403-34. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.43.100189.002155>
22. Kennedy N, Knedlitschek G, Groner B, Hynes NE, Herrlich P, Michalides R, et al. Long terminal repeats of endogenous mouse mammary tumour virus contain a long open reading frame which extends into adjacent sequences. *Nature* [Internet]. 1982 [citado 21 de julio de 2020];295(5850):622-4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6276778/>
23. Crouse CA, Pauley RJ. Molecular cloning and sequencing of the Mtv-1 LTR: Evidence for a LTR sequence alteration. *Virus Res*. 1 de febrero de 1989;12(2):123-37.
24. Eickbush TH, Malik HS. Origins and Evolution of Retrotransposons. En: *Mobile*

- DNA II. American Society of Microbiology; 2014. p. 1111-44.
25. Pseudoviridae. *Virus Taxon*. 1 de enero de 2012;467-76.
 26. Weiss RA. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* [Internet]. 3 de octubre de 2006 [citado 10 de marzo de 2022];3(1):1-11. Disponible en: <https://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4690-3-67>
 27. Meyer TJ, Rosenkrantz JL, Carbone L, Chavez SL. Endogenous retroviruses: With us and against us [Internet]. Vol. 5, *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S. A; 2017 [citado 24 de julio de 2020]. p. 23. Disponible en: www.frontiersin.org
 28. Kazazian HH. Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution [Internet]. Vol. 303, *Science*. Science; 2004 [citado 4 de julio de 2020]. p. 1626-32. Disponible en: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/15016989/>
 29. Papel del elemento Line-1 en la patología humana anemia de Fanconi [Internet]. [citado 21 de julio de 2020]. Disponible en: <https://digibug.ugr.es/handle/10481/35185>
 30. Babushok D V., Kazazian HH. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1 [Internet]. Vol. 28, *Human Mutation*. Hum Mutat; 2007 [citado 21 de julio de 2020]. p. 527-39. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17309057/>
 31. Grandi FC, An W. Non-LTR retrotransposons and microsatellites. <http://dx.doi.org/104161/mge25674> [Internet]. 8 de julio de 2013 [citado 7 de agosto de 2022];3(4):e25674. Disponible en:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/mge.25674>

32. Konkel MK, Batzer MA. A mobile threat to genome stability: The impact of non-LTR retrotransposons upon the human genome. *Semin Cancer Biol.* 1 de agosto de 2010;20(4):211-21.
33. Ostertag EM, Kazazian Jr HH. Biology of Mammalian L1 Retrotransposons. *Annu Rev Genet* [Internet]. 28 de diciembre de 2001 [citado 21 de julio de 2020];35(1):501-38. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genet.35.102401.091032>
34. Viollet S, Monot C, Cristofari G. L1 retrotransposition: The snap-velcro model and its consequences. *Mob Genet Elements* [Internet]. marzo de 2014 [citado 10 de marzo de 2022];4(2):e28907. Disponible en: </pmc/articles/PMC4014453/>
35. Sultana T, van Essen D, Siol O, Bailly-Bechet M, Philippe C, Zine El Aabidine A, et al. The Landscape of L1 Retrotransposons in the Human Genome Is Shaped by Pre-insertion Sequence Biases and Post-insertion Selection. *Mol Cell* [Internet]. 2 de mayo de 2019 [citado 10 de julio de 2020];74(3):555-570.e7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.036>
36. Charlesworth B, Langley CH. The Population Genetics of *Drosophila* Transposable Elements. *Annu Rev Genet* [Internet]. diciembre de 1989 [citado 21 de julio de 2020];23(1):251-87. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2559652/>
37. Kim JM, Vanguri S, Boeke JD, Gabriel A, Voytas DF. Transposable elements

and genome organization: A comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res* [Internet]. 1998 [citado 21 de julio de 2020];8(5):464-78. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9582191/>

38. SanMiguel P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y, Bennetzen JL. The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genet* [Internet]. 1998 [citado 21 de julio de 2020];20(1):43-5. Disponible en: https://www.nature.com/articles/ng0998_43
39. Deininger PL, Batzer MA. Mammalian retroelements. *Genome Res*. 1 de octubre de 2002;12(10):1455-65.
40. Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 5 de octubre de 2004 [citado 10 de marzo de 2022];101(SUPPL. 2):14572-9. Disponible en: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0404838101
41. Zhdanov V.M. Integration of viral genomes. 1975;256:471-3.
42. Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, et al. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* [Internet]. 7 de enero de 2010 [citado 19 de julio de 2020];463(7277):84-7. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature08695>
43. Palatini U, Miesen P, Carballar-Lejarazu R, Ometto L, Rizzo E, Tu Z, et al. Comparative genomics shows that viral integrations are abundant and express

- piRNAs in the arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *BMC Genomics*. 2017;18(1):1-15.
44. Cui J, Holmes EC. Endogenous RNA viruses of plants in insect genomes. *Virology*. 5 de junio de 2012;427(2):77-9.
 45. Nag DK, Kramer LD. Patchy DNA forms of the Zika virus RNA genome are generated following infection in mosquito cell cultures and in mosquitoes. *J Gen Virol*. 1 de noviembre de 2017;98(11):2731-7.
 46. Houé V, Bonizzoni M, Failloux AB. Endogenous non-retroviral elements in genomes of *Aedes* mosquitoes and vector competence. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):542-55.
 47. Palatini U, Contreras CA, Gasmi L, Bonizzoni M. Endogenous viral elements in mosquito genomes: current knowledge and outstanding questions. *Curr Opin Insect Sci*. 1 de febrero de 2022;49:22-30.
 48. Suzuki Y, Baidaliuk A, Miesen P, Frangeul L, Crist AB, Merklings SH, et al. Non-retroviral Endogenous Viral Element Limits Cognate Virus Replication in *Aedes aegypti* Ovaries. *Curr Biol* [Internet]. 16 de septiembre de 2020 [citado 23 de julio de 2020];30(18):3495-3506.e6. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096098222030909X>
 49. Crochu S, Cook S, Attoui H, Charrel RN, De Chesse R, Belhouchet M, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol*. 2004;85(7):1971-80.
 50. Geuking MB, Weber J, Dewannieux M, Gorelik E, Heidmann T, Hengartner H,

et al. Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. *Science* (80-) [Internet]. 16 de enero de 2009 [citado 20 de julio de 2020];323(5912):393-6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19150848/>

51. Horie M, Tomonaga K. Non-Retroviral Fossils in Vertebrate Genomes. *Viruses* [Internet]. 2011 [citado 20 de julio de 2020];3(10):1836. Disponible en: </pmc/articles/PMC3205384/?report=abstract>
52. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. Vol. 85, *Antiviral Research*. Elsevier; 2010. p. 328-45.
53. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife* [Internet]. 30 de junio de 2015 [citado 20 de febrero de 2022];4(JUNE2015). Disponible en: </pmc/articles/PMC4493616/>
54. Nag DK, Brecher M, Kramer LD. DNA forms of arboviral RNA genomes are generated following infection in mosquito cell cultures. *Virology*. 1 de noviembre de 2016;498:164-71.
55. Tassetto M, Kunitomi M, Whitfield ZJ, Dolan PT, Sánchez-Vargas I, Garcia-Knight M, et al. Control of RNA viruses in mosquito cells through the acquisition of vDNA and endogenous viral elements. *Elife* [Internet]. 1 de octubre de 2019 [citado 20 de julio de 2020];8. Disponible en: </pmc/articles/PMC6797480/?report=abstract>
56. Goic B, Vodovar N, Mondotte JA, Monot C, Frangeul L, Blanc H, et al. RNA-

mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*. *Nat Immunol* [Internet]. 24 de abril de 2013 [citado 20 de enero de 2021];14(4):396-403. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ni.2542>

57. Whitfield ZJ, Dolan PT, Kunitomi M, Tassetto M, Seetin MG, Oh S, et al. The Diversity, Structure, and Function of Heritable Adaptive Immunity Sequences in the *Aedes aegypti* Genome. *Curr Biol* [Internet]. 2017;27(22):3511-3519.e7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.067>
58. Crochu S, Cook S, Attoui H, Charrel RN, De Chesse R, Belhouchet M, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol* [Internet]. 1 de julio de 2004 [citado 19 de julio de 2020];85(7):1971-80. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.79850-0>
59. Poirier EZ, Goic B, Tomé-Poderti L, Frangeul L, Boussier J, Gausson V, et al. Dicer-2-Dependent Generation of Viral DNA from Defective Genomes of RNA Viruses Modulates Antiviral Immunity in Insects. *Cell Host Microbe*. 2018;23(3):353-365.e8.
60. Agboli E, Leggewie M, Altinli M, Schnettler E. Mosquito-specific viruses—transmission and interaction. *Viruses*. 2019;11(9):1-26.
61. Miesen P, Joosten J, van Rij RP. PIWIs Go Viral: Arbovirus-Derived piRNAs in Vector Mosquitoes [Internet]. Vol. 12, *PLoS Pathogens*. Public Library of

- Science; 2016 [citado 18 de febrero de 2021]. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5198996/](#)
62. Goic B, Stapleford KA, Frangeul L, Doucet AJ, Gausson V, Blanc H, et al. Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. *Nat Commun* [Internet]. 1 de septiembre de 2016 [citado 8 de enero de 2021];7(1):1-10. Disponible en: www.nature.com/naturecommunications
63. Goic B, Vodovar N, Mondotte JA, Monot C, Frangeul L, Blanc H, et al. RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*. *Nat Immunol* [Internet]. abril de 2013 [citado 20 de enero de 2021];14(4):396-403. Disponible en: <https://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2598/23435119/>
64. Gammon DB, Mello CC. RNA interference-mediated antiviral defense in insects [Internet]. Vol. 8, *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc.; 2015 [citado 21 de julio de 2020]. p. 111-20. Disponible en: [/pmc/articles/PMC4448697/?report=abstract](#)
65. Xu J, Cherry S. Viruses and antiviral immunity in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol* [Internet]. enero de 2014 [citado 21 de julio de 2020];42(1):67-84. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23680639/>
66. Kemp C, Mueller S, Goto A, Barbier V, Paro S, Bonnay F, et al. Broad RNA Interference-Mediated Antiviral Immunity and Virus-Specific Inducible Responses in *Drosophila*. *J Immunol* [Internet]. 15 de enero de 2013 [citado 21 de julio de 2020];190(2):650-8. Disponible en:

/pmc/articles/PMC3538939/?report=abstract

67. Bronkhorst AW, Van Rij RP. The long and short of antiviral defense: Small RNA-based immunity in insects [Internet]. Vol. 7, Current Opinion in Virology. Elsevier; 2014 [citado 21 de julio de 2020]. p. 19-28. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24732439/>
68. Goic B, Stapleford KA, Frangeul L, Doucet AJ, Gausson V, Blanc H, et al. Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. Nat Commun. 1 de septiembre de 2016;7.
69. Oliveira JH, Bahia AC, Vale PF. How are arbovirus vectors able to tolerate infection? Dev Comp Immunol [Internet]. 2020;103(September 2019):103514. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103514>
70. Obbard DJ, Gordon KHJ, Buck AH, Jiggins FM. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. Philos Trans R Soc B Biol Sci [Internet]. 2009 [citado 21 de julio de 2020];364(1513):99-115. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18926973/>
71. Czech B, Hannon GJ. One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing [Internet]. Vol. 41, Trends in Biochemical Sciences. Elsevier Ltd; 2016 [citado 22 de julio de 2020]. p. 324-37. Disponible en: </pmc/articles/PMC4819955/?report=abstract>
72. Pek JW, Patil VS, Kai T. piRNA pathway and the potential processing site, the nuage, in the Drosophila germline. Dev Growth Differ [Internet]. 1 de enero de 2012 [citado 4 de febrero de 2021];54(1):66-77. Disponible en:

<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-169X.2011.01316.x>

73. Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, et al. Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell* [Internet]. 23 de marzo de 2007 [citado 25 de enero de 2021];128(6):1089-103. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17346786/>
74. Han BW, Wang W, Li C, Weng Z, Zamore PD. PiRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production. *Science* (80-) [Internet]. 15 de mayo de 2015 [citado 11 de febrero de 2021];348(6236):817-21. Disponible en: </pmc/articles/PMC4545291/>
75. Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, et al. The *Drosophila* RNA Methyltransferase, DmHen1, Modifies Germline piRNAs and Single-Stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol*. 17 de julio de 2007;17(14):1265-72.
76. Muller S, Raman Pandey R, Pillai RS. Les piARN forgent un système immunitaire pour le génome. *médecine/sciences* [Internet]. 28 de mayo de 2013 [citado 31 de enero de 2021];29(5):487-94. Disponible en: <http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/2013295011>
77. Olovnikov I, Ryazansky S, Shpiz S, Lavrov S, Abramov Y, Vaury C, et al. De novo piRNA cluster formation in the *Drosophila* germ line triggered by transgenes containing a transcribed transposon fragment. *Nucleic Acids Res* [Internet]. junio de 2013 [citado 22 de julio de 2020];41(11):5757-68.

Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23620285/>

78. Sienski G, Dönertas D, Brennecke J. Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell* [Internet]. 21 de noviembre de 2012 [citado 2 de febrero de 2021];151(5):964-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23159368/>
79. Dönertas D, Sienski G, Brennecke J. *Drosophila* Gtsf1 is an essential component of the Piwi-mediated transcriptional silencing complex. *Genes Dev* [Internet]. 1 de agosto de 2013 [citado 2 de febrero de 2021];27(15):1693-705. Disponible en: [/pmc/articles/PMC3744727/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23744727/)
80. Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu Rev Biochem*. 2015;84(1):405-33.
81. Hirakata S, Siomi MC. piRNA biogenesis in the germline: From transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation [Internet]. Vol. 1859, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier; 2016 [citado 22 de julio de 2020]. p. 82-92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26348412/>
82. Miesen P, Joosten J, van Rij RP. PIWIs Go Viral: Arbovirus-Derived piRNAs in Vector Mosquitoes. *PLoS Pathog*. 2016;12(12):1-17.
83. Muerdter F, Olovnikov I, Molaro A, Rozhkov N V., Czech B, Gordon A, et al. Production of artificial piRNAs in flies and mice. *RNA* [Internet]. enero de 2012 [citado 14 de febrero de 2021];18(1):42-52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22000000/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22096018/>

84. Vodovar N, Bronkhorst AW, van Cleef KWR, Miesen P, Blanc H, van Rij RP, et al. Arbovirus-Derived piRNAs Exhibit a Ping-Pong Signature in Mosquito Cells. Pfeffer S, editor. PLoS One [Internet]. 24 de enero de 2012 [citado 19 de febrero de 2021];7(1):e30861. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0030861>
85. Houé V, Gabiane G, Dauga C, Suez M, Madec Y, Mousson L, et al. Evolution and biological significance of flaviviral elements in the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1265-79.
86. Crava CM, Varghese FS, Pischedda E, Halbach R, Palatini U, Marconcini M, et al. Population genomics in the arboviral vector *Aedes aegypti* reveals the genomic architecture and evolution of endogenous viral elements. *Mol Ecol* [Internet]. 1 de abril de 2021 [citado 25 de enero de 2022];30(7):1594-611. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mec.15798>
87. Baidaliuk A, Miot EF, Lequime S, Moltini-Conclois I, Delaigue F, Dabo S, et al. Cell-Fusing Agent Virus Reduces Arbovirus Dissemination in *Aedes aegypti* Mosquitoes In Vivo . *J Virol* [Internet]. 26 de junio de 2019 [citado 21 de julio de 2020];93(18). Disponible en: <http://jvi.asm.org/>
88. Bonica MB, Balcazar DE, Chuchuy A, Barneche JA, Torres C, Micieli M V. Detection of Flaviviral-Like DNA Sequences in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Collected From Argentina. *J Med Entomol* [Internet]. 9 de noviembre de 2021 [citado 7 de marzo de 2022];58(6):2406-11. Disponible en:

<https://academic.oup.com/jme/article/58/6/2406/6262556>

5. EVIDENCIA MOLECULAR DE LA PRESENCIA DE UN ELEMENTO VIRAL ENDÓGENO (EVE) SIMILAR A MENGHAI FLAVIVIRUS EN MOSQUITOS *Aedes Aegypti* DE LA CIUDAD DE SANTA MARTA, COLOMBIA

Juan P. Franco¹, Eric Perdomo^{1,2}, Andrew Muñoz¹, Adalberto Duica², Juan Domínguez², Sharon Pérez¹, Paula Quintero¹, Gabriel J. Parra-Henao¹, José A. Usme-Ciro^{1,*}

Institución: ¹ Centro de Investigación en salud para el Trópico – CIST, Universidad Cooperativa de Colombia, Santa Marta, Colombia; ² Secretaría de Salud del Distrito de Santa Marta, Santa Marta, Colombia

Resumen

Introducción: La familia Culicidae está conformada por los géneros : *Anopheles*, *Culex*, *Psorophora*, *Sabethes*, *Haemagogus*, *Aedes*, entre otros. La mayoría de estos géneros son de gran importancia médica por su capacidad de transmitir virus y otros agentes patógenos a los humanos. Recientemente se han descrito elementos virales endógenos (EVE), que consisten en secuencias virales insertadas en el genoma de los artrópodos, cumpliendo funciones en la inmunidad innata mediante las vías de pequeños ARN de interferencia (siRNA) y los PIWI ARN (piRNA). Los EVE específicos de virus no retrovirales son nombrados NIRV (del inglés *Non-retroviral Integrated RNA Virus*). **Objetivo:** Determinar la presencia de un NIRV en las poblaciones de mosquitos analizadas. **Metodología:** Especímenes capturados en áreas urbana, rural y selvática del distrito de Santa Marta, fueron clasificados por taxonomía clásica y molecular. Criopreservadas en grupos de aproximadamente 10 individuos y procesados por métodos molecular en la detección de virus con cebadores genéricos y específicos para flavivirus y alfavirus. **Resultados:** En este estudio y en el marco de la vigilancia entomo-virológica realizada en el distrito de Santa Marta, Colombia, se logró identificar un NIRV similar al virus insecto específico Menghai flavivirus en el genoma de *Aedes aegypti*. La presencia de NIRV podría ser determinante en la interacción virus-vector por su papel en la inmunidad innata del mosquito, así como en la capacidad vectorial de replicación de arbovirus de interés en salud pública.

Introducción

Los arbovirus (virus transmitidos por artrópodos, del inglés *Arthropod-Borne Viruses*) son agentes que se transmiten entre artrópodos hematófagos y vertebrados de los cuales se alimentan. El artrópodo actúa como vector biológico, permitiendo la replicación del virus y diseminación a los diferentes tejidos. Los artrópodos de mayor importancia médica son los mosquitos, siendo los responsables de la transmisión de más del 70% de los agentes infecciosos emergentes y reemergentes (1). Asimismo, los arbovirus de mayor importancia en salud pública son aquellos que han logrado establecerse en el ciclo urbano, pertenecientes principalmente a los géneros *Flavivirus* (Familia Flaviviridae) y *Alphavirus* (Familia Togaviridae) (2).

El género *Flavivirus* incluye más de 70 virus que a su vez se dividen en virus transmitidos por mosquitos, virus transmitidos por garrapatas, virus insecto específicos y otros sin un vector conocido (2). El virus de la fiebre amarilla (YFV), presente desde la época de la colonia y controlado su ciclo urbano a través de la administración de una vacuna efectiva en población a riesgo, continúa siendo un problema por el frecuente contacto entre el humano y los vectores propios del ciclo selvático en zonas con circulación del virus, como ha ocurrido recientemente en Brasil (3). El virus dengue (DENV) por su parte, ha sido un problema de salud pública por décadas y de mayor importancia en los últimos años, cuando se han registrado epidemias de mayor magnitud y un incremento progresivo en la letalidad por dengue grave (4). Importantes arbovirus como el virus chikungunya (CHIKV) y virus Zika (ZIKV) han reemergido recientemente con un incremento significativo de

su rango de distribución (5,6). Todos estos virus tienen en común su habilidad para ser transmitidos por el mosquito *Ae. aegypti*, su principal vector, garantizando su máximo impacto a nivel epidemiológico.

Existe una amplia lista de arbovirus de los géneros *Flavivirus* y *Alphavirus* que son mantenidos en ciclos enzoóticos, en vectores y hospederos propios de la zona selvática y que, esporádicamente, logran mantener ciclos epizoóticos que involucran animales domésticos como equinos y aves, aumentando el riesgo de zoonosis (7). Otros arbovirus han sido postulados recientemente como potenciales amenazas para la salud pública, entre ellos el virus Oropouche (OROV), transmitido principalmente por dípteros de la familia Culicidae (géneros *Culex*, *Ochlerotatus*, *Coquillettidia*, en el ciclo selvático (8) y de la familia Ceratopogonidae (género *Culicoides*) en la zona urbana (9)

Los ciclos de transmisión y dinámicas de las arbovirosis son el resultado de interacciones multifactoriales entre la tríada mosquito-arbovirus-hospedero y un sinnúmero de factores externos (sociales, ambientales, demográficos, etc.) (10).

Recientemente, la dinámica de las arbovirosis ha tomado mayor relevancia por el impacto de las interacciones en la competencia vectorial e inmunidad innata de los mosquitos, en especial de la especie *Ae. aegypti* y virus de la familia Flaviviridae (11–14).

Al interior del género *Flavivirus* se ha descrito un grupo diverso y basal a nivel filogenético, constituido por virus que solo han sido identificados en insectos (ISF, del inglés *Insect-Specific Flaviviruses*) y cuyos estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran

su incapacidad para infectar células de vertebrados (1). La infección persistente por flavivirus en células de insecto conlleva a la generación rápida de especies de DNA viral (15,16), producto de la retrotranscripción mediada por proteínas celulares (17). Asimismo, la presencia de DNA es determinante para la integración al genoma del hospedero, como los NIRV (del inglés *Non-retroviral Integrated RNA Viruses*) recientemente descritos (18–21). Los NIRV han sido asociados con la vía de biogénesis de piARN (PIWI ARNs), que constituye un importante mecanismo antiviral del hospedero (22–24).

La integración de fragmentos del genoma viral en el genoma del hospedero podría tener un impacto negativo en el desempeño de pruebas moleculares y un impacto por determinar para la competencia vectorial del mosquito, razón por la cual se hace decisivo su estudio.

Materiales y métodos

Muestreo

Se capturaron especímenes de mosquitos adultos mediante tres metodologías diferentes. En la zona urbana se realizó captura manual con redes entomológicas y aspiradores en el interior de las viviendas entre las 8:00 horas y las 11:00 horas. En la zona rural se instalaron trampas de luz CDC cebadas con CO₂ en el exterior de las viviendas entre las 18:00 y las 6:00 horas del día siguiente, entre las 19:00 y las 23:00 horas se instaló una trampa Shannon con captura activa mediante aspiradores, y la captura manual se realizó dentro y fuera de las casas en transectos definidos entre las 7:00 y las 11:00 horas. En la zona selvática se instalaron trampas de luz CDC cebadas con CO₂ en el bosque a 1,5 m del suelo, se instaló una trampa

Shannon entre las 19:00 y las 23:00 horas, y se realizó captura manual en transectos definidos entre las 7:00 y las 11:00 horas.

Identificación de especímenes

Los especímenes de mosquitos capturados se separaron rápidamente en campo (o en el Laboratorio de Entomología si las muestras se recolectaron en el área urbana) según el morfotipo con la ayuda de un estereomicroscopio y una placa fría, se agruparon y se almacenaron a -196 °C en nitrógeno líquido para la detección virológica.

Extracción de ARN total

Grupos de mosquitos entre 10 a 15 individuos se homogenizaron en buffer RLT con perlas de circonio libres de ARNasas en un homogeneizador BeadBug (BenchMark Inc.) durante 25 segundos y 4000 rpm, y el ARN total de las muestras de mosquitos completos se extrajo con el estuche RNeasy mini (QIAGEN Inc.) siguiendo recomendaciones del fabricante. Alternativamente, los grupos de mosquitos se homogenizaron en PBS al 1% de penicilina/estreptomicina y se usaron alícuotas de 140 µl para la extracción de ARN usando el estuche de ARN viral QIAamp mini (QIAGEN Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN fue almacenado a -80°C.

Síntesis de ADNc y ensayos PCR genéricos y específicos

Las extracciones de ARN se usaron para la síntesis de ADNc de primera cadena con la transcriptasa inversa SuperScript IV (Invitrogen), siguiendo indicaciones del fabricante.

Se realizaron PCR genéricas para la detección de miembros de los géneros *Flavivirus* y *Alphavirus* (10,11), como se describió en el capítulo 3. A partir del

resultado positivo para flavivirus obtenido para el grupo con código CIST0332, se llevó a cabo la identificación específica de DENV y ZIKV. Posteriormente, se diseñaron cebadores para la caracterización de regiones adyacentes al fragmento de flavivirus identificado en muestras negativas para DENV y ZIKV (Figura 1), con el fin de determinar su existencia como genoma viral o como fragmento subgenómico integrado en el genoma del vector *Ae. aegypti*.

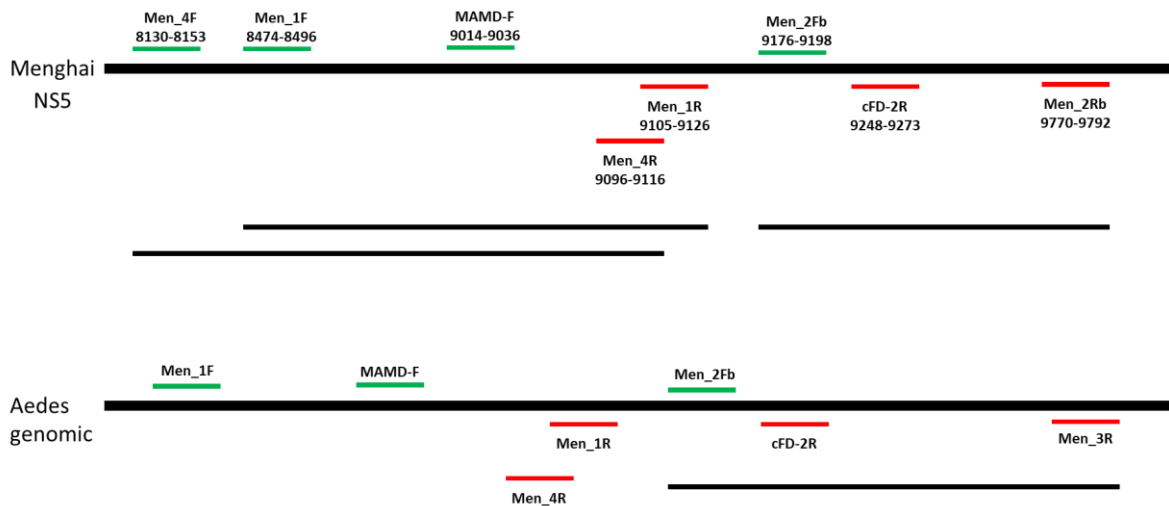


Figura 1. Estrategia de amplificación a partir del genoma de Menghai flavivirus y de *Ae. aegypti*. Se diseñaron parejas de cebadores que se extienden corriente arriba y corriente debajo de la región amplificada por la RT-PCR genérica de flavivirus (MAMD-F-cFD-2R), tanto en el genoma del virus identificado, como en el genoma del vector, teniendo en cuenta el antecedente de una región quimérica reportado en GenBank (AY347953.2).

Secuenciación y manejo de secuencias

Los amplicones fueron purificados y secuenciados con cebadores directos e inversos espaciados cada 250 pb aproximadamente, mediante servicio de secuenciación directa (Macrogen Inc., Corea del Sur). La visualización de

electroferogramas, el ensamblaje de contigs y el recorte para eliminar las secuencias de orientación de los cebadores se realizó a través del software Geneious V9.1.8 (Biomatters Ltd). Las matrices de secuencias de ADN alineadas, incluidas las secuencias obtenidas en el presente estudio, se generaron a través del algoritmo ClustalW implementado en el software Mega7 (16).

Análisis filogenético

Se prepararon conjuntos de secuencias de cepas representativas de flavivirus insecto específicos para alineación e inferencia filogenética. La matriz para flavivirus específicos de insectos contenía 55 secuencias de 250 pb de especies representativas. Las matrices de secuencia se alinearon mediante el software ClustalX2.1 (25). Las estimaciones de distancias genéticas y diversidad se obtuvieron mediante el software Mega 7 (26). La inferencia filogenética se realizó a través de los algoritmos *Neighbor Joining* y *Maximum Likelihood* implementados en el software Mega 7 y IQ-TREE, utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos estimado para los datos y 1000 réplicas de bootstrap.

Resultados

En total se analizaron 232 grupos de mosquitos, se obtuvo un resultado positivo para los cebadores dirigidos a flavivirus genéricos (51), DENV (3), ZIKV (1), Menghai flavivirus (13) y *Culex flavivirus* (1) A partir del resultado positivo para flavivirus mediante RT-PCR utilizando cebadores genéricos (MAMD-F y cFD-2R), se realizaron pruebas específicas para la detección de DENV y ZIKV, las cuales resultaron negativas (resultados no mostrados). Por lo tanto, se procedió a la secuenciación del fragmento de 258 pb correspondiente a una porción del gen NS5

de flavivirus de un grupo de *Ae. aegypti* (CIST0332) positivo para flavivirus. La búsqueda mediante la herramienta BLASTN permitió la identificación de una firma viral similar a flavivirus específicos de insecto, así como a una región quimérica de *Ae. aegypti* reportada previamente (AY347953.2), que a su vez contiene un fragmento de *Kamiti River virus* (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación de secuencias estrechamente relacionadas a la secuencia de flavivirus CIST0332, mediante la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local BLASTN.

Organism	Blast Name	Max score	Total score	Query score	E value	Per. Ident	Accession
<i>Aedes aegypti</i>	mosquito	357	357	100%	1,00E-94	97.16%	AY347953.2
Mosquito flavivirus	viruses	278	278	75%	8,00E-71	98.11%	HQ676625.1
Mosquito flavivirus	viruses	272	272	75%	4,00E-69	97.48%	HQ676624.1
Phlebotomus flavivirus	viruses	263	263	71%	2,00E-66	98.01%	FJ817075.1
Alg_F19							
Phlebotomus flavivirus	viruses	257	257	71%	1,00E-64	97.35%	FJ817076.1
Alg_F8							
<i>Kamiti River virus</i>	viruses	171	171	46%	1,00E-38	38 97.98%	DQ335465.1
Flavivirus CbaAr4001	viruses	161	161	41%	9,00E-36	100.00%	DQ232622.1

Se realizó análisis filogenético a partir del alineamiento de la región de flavivirus secuenciada, con secuencias de otros ISF disponibles en GenBank, permitiendo

demostrar que esta secuencia tiene una relación filogenética más cercana con la región quimérica de *Ae. aegypti* (AY347953.2) seguida de Menghai flavivirus (Figura 1).

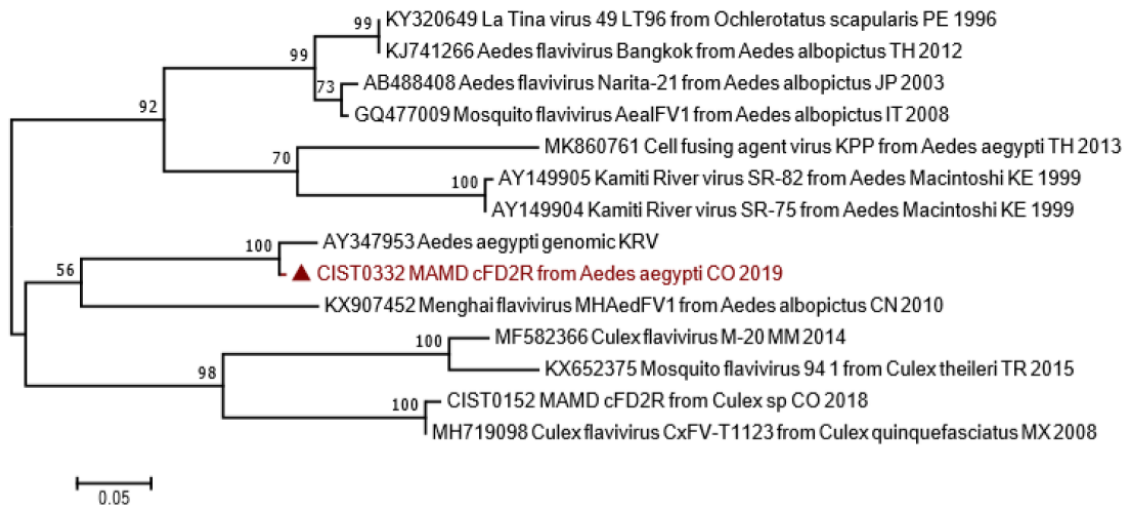


Figura 2. Análisis filogenético de flavivirus insecto-específicos, a partir del análisis de 211 pb del gen NS5. El análisis se llevó a cabo mediante Máxima Verosimilitud, con 1000 réplicas Bootstrap y fue enraizado en el punto medio para favorecer la visualización.

Se diseñó estrategia *in silico* para la amplificación de la región del gen NS5 del flavivirus identificado, con el fin de demostrar si la secuencia amplificada se encuentra haciendo parte del genoma de un virus *per se* o en el contexto del genoma del *Ae. aegypti* (Figura 1). Se obtuvo amplificación exitosa con las parejas de cebadores dirigidos a la región quimérica del vector (Men_2F-Men_3R) (Figura 2), así como ausencia de amplificación de la región exclusiva del genoma de flavivirus (Men_4F-Men_4R) (datos no mostrados), demostrándose así que la región parcial del gen NS5 de flavivirus se encuentra flanqueada por ADN

cromosómico de *Ae. aegypti*, resultante de la integración de un NIRV similar a Menghai flavivirus.

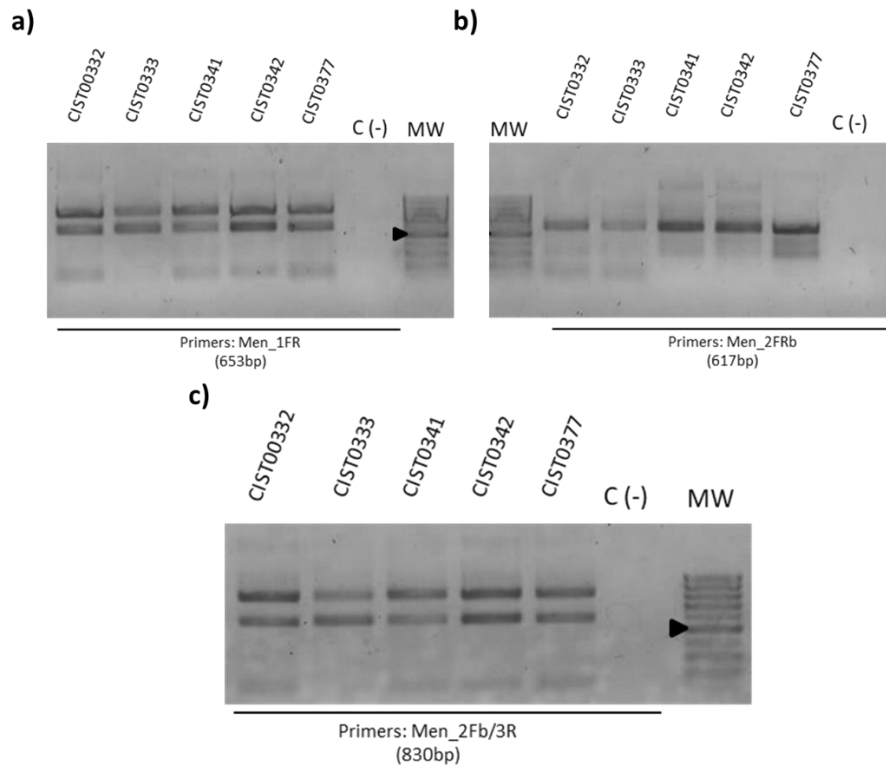


Figura 3. Amplificación de regiones genómicas adyacentes al gen NS5 de flavivirus. a y b) Amplificación exitosa de las regiones Men_1F-Men1R de 653 pb y Men_2Fb_Men_2Rb de 617 pb, presentes en el genoma de flavivirus y en la región quimérica del vector. c) Amplificación exitosa de la región Men_2Fb-Men_3R, presente exclusivamente en la región quimérica del vector.

De un total de 1630 mosquitos de la especie *Ae. aegypti* analizados por biología molecular, 131 (8%) fueron positivos para el NIRV similar a Menghai flavivirus mediante amplificación de la región Men_2Fb-Men_3R.

Tabla 2. Identificación de NIRV en secuencias de ARN de virus no retroviral en *Aedes aegypti*, en zona urbana y rural de Santa Marta, Colombia

Zona	Barrio	Número de grupos	Número de grupos positivos mosquitos
Urbana	Barrio Villa Sara	3	3/3
Urbana	Batallón Córdoba	4	1/4
Urbana	Pozos Colorados	6	5/6
Rural	Taganga	8	2/8
Rural	Marquetalia	32	2/32
Rural	Quebrada Valencia	49	1/49

Discusión

Algunos artrópodos son clasificados como vectores debido a su capacidad de transmisión activa de un microorganismo patógeno (virus, bacteria o parásito) de un vertebrado a otro. Los mosquitos son los principales vectores de las enfermedades en los humanos y en los países tropicales causan numerosas muertes anuales debido a la malaria y al dengue principalmente (27). Además, en la última década los brotes de virus como el CHIKV, ZIKV, *Mayaro virus* (MAYV) y OROV han encendido las alarmas en salud pública, ya que esto significa la expansión de enfermedades infecciosas por vectores en el mundo y su real o potencial establecimiento en ciclo urbano (28,29).

La familia Flaviviridae, incluye cuatro géneros (*Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* y *Pegivirus*) y una alta diversidad de especies. El género *Flavivirus*, reconocido históricamente como un importante grupo de arbovirus, está conformado por un gran número de especies de importancia médica distribuidas alrededor del mundo, en una extensa variedad de ecosistemas e interacciones ecológicas (30–32). Los ISF son virus causantes de infecciones persistentes en insectos, cuyas evidencias *in vitro* e *in vivo* demuestran su incapacidad para infectar células de vertebrados (33).

La infección persistente por flavivirus en células de insecto conlleva la generación rápida de especies de ADNv (15,16), lo cual facilitaría su posterior inserción como elementos de virus no retrovirales, mejor conocidos como NIRV (20,34). Los NIRV han sido recientemente asociados con la vía de biogénesis de piARN (PIWI ARN), que constituye un importante mecanismo antiviral del hospedero (35).

La integración de NIRV en el genoma del hospedero podría tener un impacto significativo en la competencia vectorial de especies como *Ae. aegypti* en zonas endémicas para arbovirus, como el Distrito de Santa Marta, Colombia.

Durante el reciente estudio, desarrollado entre los meses de agosto del 2018 y septiembre de 2019, en zonas sugeridas por la Secretaría de Salud del Distrito de Santa Marta, teniendo como criterio los reportes de casos de arbovirosis, se recolectaron un total de 232 grupos, representativos de tres zonas (selvática, rural y urbana) del Distrito de Santa Marta, Colombia, de los cuales 135 grupos pertenecen al género *Aedes* con un total de 1826 individuos. Del total de grupos

procesados de *Aedes spp.*, aproximadamente el 10 % de los grupos fueron positivos para un NIRV similar a Menghai flavivirus.

Estos elementos han sido descritos en diversas regiones geográficas (21,34–36), y podrían estar asociados diferencialmente a linajes de *Aedes spp* que se han reportado en el mundo, al igual que sucede en Colombia, donde se ha documentado la circulación de diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* (37–41)

Teniendo en cuenta la identificación del NIRV en mosquitos recolectados en diferentes puntos de muestreo y tanto en zona rural como urbana, se infiere que dicha integración no es un evento reciente, y que debió haber comprometido células de la línea germinal del mosquito que le permitiera mantenerse en la progenie por medio de trasmisión vertical a través de las siguientes generaciones (35,42,43).

El presente reporte de un elemento viral endógeno tipo NIRV similar a Menghai flavivirus en vectores como *Ae. aegypti* ha permitido plantear hipótesis sobre su efecto en la tolerancia a la infección (12,13,48) y la inmunidad innata de los mosquitos frente a infecciones por arbovirus (18,49–51), además de dar luces sobre un nuevo mecanismo de control de arbovirus que a futuro podría ser implementado como parte de las medidas en salud pública.

En el presente estudio, la frecuencia máxima del NIRV fue de aproximadamente el 10% de los mosquitos *Aedes sp* capturados, resultado obtenido a partir de los análisis moleculares sobre grupos de mosquitos. En una siguiente fase de la investigación, se propone el análisis a partir de mosquitos individuales, para

determinar con mayor precisión la frecuencia del NIRV similar a Menghai flavivirus en las poblaciones de mosquitos *Ae. aegypti* del distrito de Santa Marta, Colombia.

Conclusiones

Se comprobó por métodos moleculares la presencia de un NIRV en mosquitos *Ae.aegypti* de la zona rural y urbana del distrito de Santa Marta, Colombia entre los años 2018 – 2019. Por lo cual es importante comprender la parición e integración de secuencias virales en los genomas de los vectores de importancia médica. Y determinara si están delimitadas a una población de *Ae.aegypti* que circulan en territorio Colombiano

Referencias

1. Agboli E, Leggewie M, Altinli M, Schnettler E. Mosquito-specific viruses— transmission and interaction. *Viruses*. 2019;11(9):1-26.
2. Weaver SC. Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Arch Virol Suppl [Internet]*. 2005 [citado 30 de enero de 2022];(19):33-44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16358422/>
3. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, De Jesus JG, Aguiar RS, Iani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science [Internet]*. 31 de agosto de 2018 [citado 1 de marzo de 2022];361(6405):894. Disponible en: </pmc/articles/PMC6874500/>
4. Laiton-Donato K, Alvarez DA, Peláez-Carvajal D, Mercado M, Ajami NJ, Bosch I, et al. Molecular characterization of dengue virus reveals regional diversification of serotype 2 in Colombia. *Virol J [Internet]*. 2019 [citado 16 de

enero de 2022];16:62. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1170-4>

5. Tan Y, Pickett BE, Shrivastava S, Gresh L, Balmaseda A, Amedeo P, et al. Differing epidemiological dynamics of Chikungunya virus in the Americas during the 2014-2015 epidemic. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 30 de julio de 2018 [citado 1 de marzo de 2022];12(7). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30059496/>
6. Faria NR, Quick J, Claro IM, Thézé J, De Jesus JG, Giovanetti M, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nat* 2017 5467658 [Internet]. 24 de mayo de 2017 [citado 1 de marzo de 2022];546(7658):406-10. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature22401>
7. Ramírez AL, van den Hurk AF, Meyer DB, Ritchie SA. Searching for the proverbial needle in a haystack: advances in mosquito-borne arbovirus surveillance. *Parasit Vectors* [Internet]. 29 de diciembre de 2018 [citado 13 de agosto de 2022];11(1):320. Disponible en: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2901-x>
8. Sakkas H, Bozidis P, Franks A, Papadopoulou C. Oropouche Fever: A Review. *Viruses* 2018, Vol 10, Page 175 [Internet]. 4 de abril de 2018 [citado 1 de marzo de 2022];10(4):175. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/4/175/htm>

9. Romero-Alvarez D, Escobar LE. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. *Microbes Infect* [Internet]. marzo de 2018;20(3):135-46. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457917302204>
10. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 25 de marzo de 2015 [citado 1 de marzo de 2022];4(3):e18. Disponible en: [/pmc/articles/PMC4395659/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25711111/)
11. Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-specific virus discovery: Significance for the arbovirus community. Vol. 7, *Viruses*. MDPI AG; 2015. p. 4911-28.
12. Oliveira JH, Bahia AC, Vale PF. How are arbovirus vectors able to tolerate infection? *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2020;103(September 2019):103514. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103514>
13. Goic B, Stapleford KA, Frangeul L, Doucet AJ, Gausson V, Blanc H, et al. Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. *Nat Commun* [Internet]. 1 de septiembre de 2016 [citado 8 de enero de 2021];7(1):1-10. Disponible en: www.nature.com/naturecommunications
14. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infect Genet Evol*. 1 de enero de 2019;67:191-209.
15. Nag DK, Kramer LD. Patchy DNA forms of the Zika virus RNA genome are generated following infection in mosquito cell cultures and in mosquitoes. *J*

Gen Virol. 1 de noviembre de 2017;98(11):2731-7.

16. Nag DK, Brecher M, Kramer LD. DNA forms of arboviral RNA genomes are generated following infection in mosquito cell cultures. *Virology*. 1 de noviembre de 2016;498:164-71.
17. SanMiguel P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y, Bennetzen JL. The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genet* [Internet]. 1998 [citado 21 de julio de 2020];20(1):43-5. Disponible en: https://www.nature.com/articles/ng0998_43
18. Houé V, Gabiane G, Dauga C, Suez M, Madec Y, Mousson L, et al. Evolution and biological significance of flaviviral elements in the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):1265-79.
19. Pischedda E, Scolari F, Valerio F, Carballar-Lejarazú R, Catapano PL, Waterhouse RM, et al. Insights into an unexplored component of the mosquito repeatome: Distribution and variability of viral sequences integrated into the genome of the arboviral vector *aedes albopictus*. *Front Genet*. 2019;10(FEB):1-15.
20. Houé V, Bonizzoni M, Failloux AB. Endogenous non-retroviral elements in genomes of *Aedes* mosquitoes and vector competence. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):542-55.
21. Bonica MB, Balcazar DE, Chuchuy A, Barneche JA, Torres C, Micieli M V. Detection of Flaviviral-Like DNA Sequences in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Collected From Argentina. *J Med Entomol* [Internet]. 9 de

- noviembre de 2021 [citado 7 de marzo de 2022];58(6):2406-11. Disponible en: <https://academic.oup.com/jme/article/58/6/2406/6262556>
22. Obbard DJ, Gordon KHJ, Buck AH, Jiggins FM. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2009 [citado 21 de julio de 2020];364(1513):99-115. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18926973/>
 23. Palatini U, Contreras CA, Gasmi L, Bonizzoni M. Endogenous viral elements in mosquito genomes: current knowledge and outstanding questions. *Curr Opin Insect Sci*. 1 de febrero de 2022;49:22-30.
 24. Suzuki Y, Baidaliuk A, Miesen P, Frangeul L, Crist AB, Merkl SH, et al. Non-retroviral Endogenous Viral Element Limits Cognate Virus Replication in *Aedes aegypti* Ovaries. *Curr Biol* [Internet]. 16 de septiembre de 2020 [citado 23 de julio de 2020];30(18):3495-3506.e6. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096098222030909X>
 25. Edgar RC. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 19 de agosto de 2004;5.
 26. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* [Internet]. 1 de julio de 2016 [citado 16 de enero de 2022];33(7):1870-4. Disponible en: <https://academic.oup.com/mbe/article/33/7/1870/2579089>
 27. World Health Organization. Vector-borne diseases [Internet]. 2020 [citado 14 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact->

sheets/detail/vector-borne-diseases

28. Chala B, Hamde F. Emerging and Re-emerging Vector-Borne Infectious Diseases and the Challenges for Control: A Review. *Front Public Heal.* 5 de octubre de 2021;9:1466.
29. Savić S, Vidić B, Grgić Z, Potkonjak A, Spasojevic L. Emerging vector-borne diseases - Incidence through vectors. *Front Public Heal.* 2 de diciembre de 2014;2(DEC).
30. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. Vol. 85, *Antiviral Research.* Elsevier; 2010. p. 328-45.
31. Blitvich BJ, Firth AE. A Review of Flaviviruses that Have No Known Arthropod Vector. *Viruses* 2017, Vol 9, Page 154 [Internet]. 21 de junio de 2017 [citado 14 de febrero de 2022];9(6):154. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4915/9/6/154/htm>
32. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med* [Internet]. 29 de enero de 2018 [citado 19 de mayo de 2020];69(1):395-408. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-050715-105122>
33. Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-specific virus discovery: Significance for the arbovirus community. *Viruses.* 2015;7(9):4911-28.
34. Suzuki Y, Frangeul L, Dickson LB, Blanc H, Verdier Y, Vinh J, et al. Uncovering the Repertoire of Endogenous Flaviviral Elements in Aedes Mosquito Genomes. *J Virol.* 2017;91(15):1-20.

35. ter Horst AM, Nigg JC, Dekker FM, Falk BW. Endogenous Viral Elements Are Widespread in Arthropod Genomes and Commonly Give Rise to PIWI-Interacting RNAs. *J Virol*. 2018;93(6).
36. Crochu S, Cook S, Attoui H, Charrel RN, De Chesse R, Belhouchet M, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol*. 2004;85(7):1971-80.
37. Urdaneta-Marquez L, Failloux A-B. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infect Genet Evol* [Internet]. 1 de marzo de 2011 [citado 18 de marzo de 2022];11(2):253-61. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134810003229>
38. Caldera SM, Jaramillo MC, Cochero S, Pérez-Doria A, Bejarano EE. Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomedica* [Internet]. septiembre de 2013 [citado 18 de marzo de 2022];33(SUPPL.1):89-98. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572013000500011&lng=en&nrm=iso&tlng=es
39. Paduan KDS, Ribolla PEM. Mitochondrial DNA Polymorphism and Heteroplasmy in Populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *J Med Entomol* [Internet]. 1 de enero de 2008 [citado 18 de marzo de 2022];45(1):59-67. Disponible en: <https://academic.oup.com/jme/article/45/1/59/873874>
40. Lima RS, Scarpassa VM. Evidence of two lineages of the dengue vector

Aedes aegypti in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2009 [citado 18 de marzo de 2022];32(2):414-22. Disponible en: www.sbg.org.br

41. Jaimes-Dueñez J, Arboleda S, Triana-Chávez O, Gómez-Palacio A. Spatio-Temporal Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Mitochondrial Lineages in Cities with Distinct Dengue Incidence Rates Suggests Complex Population Dynamics of the Dengue Vector in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 20 de abril de 2015 [citado 18 de marzo de 2022];9(4):e0003553. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003553>
42. Whitfield ZJ, Dolan PT, Kunitomi M, Tassetto M, Seetin MG, Oh S, et al. The Diversity, Structure, and Function of Heritable Adaptive Immunity Sequences in the *Aedes aegypti* Genome. *Curr Biol*. 20 de noviembre de 2017;27(22):3511-3519.e7.
43. Katzourakis A, Gifford RJ. Endogenous viral elements in animal genomes. Malik HS, editor. *PLoS Genet* [Internet]. 18 de noviembre de 2010 [citado 1 de agosto de 2020];6(11):e1001191. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1001191>
44. Miranda J, Mattar S, Gonzalez M, Hoyos-López R, Aleman A, Aponte J. First report of *Culex flavivirus* infection from *Culex coronator* (Diptera: Culicidae), Colombia. *Virol J*. 2019;16(1):1-6.
45. Fish D, Widen SG, Oliveira H, Nunes Neto JP, da Silva Lemos P, Vasconcelos

- PFC, et al. Genetic characterization, molecular epidemiology, and phylogenetic relationships of insect-specific viruses in the taxon Negevirus. *Virology*. 1 de abril de 2017;504:152-67.
46. Contreras-Gutiérrez MA, Nunes MRT, Guzman H, Uribe S, Gallego Gómez JC, Suaza Vasco JD, et al. Sinu virus, a novel and divergent orthomyxovirus related to members of the genus Thogotovirus isolated from mosquitoes in Colombia. *Virology*. 15 de enero de 2017;501:166-75.
47. Salim Mattar V, Marco González T. Insect microbiomes and insect-specific viruses a new key for understanding the arboviruses diseases? [Internet]. Vol. 23, *Revista MVZ Cordoba*. Universidad de Cordoba; 2018 [citado 14 de marzo de 2022]. p. 6595-7. Disponible en: <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/1359/html>
48. Larouche JD, Trofimov A, Hesnard L, Ehx G, Zhao Q, Vincent K, et al. Widespread and tissue-specific expression of endogenous retroelements in human somatic tissues. *Genome Med* [Internet]. 28 de abril de 2020 [citado 10 de marzo de 2022];12(1):1-16. Disponible en: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-020-00740-7>
49. Suzuki Y, Baidaliuk A, Miesen P, Frangeul L, Crist AB, Merklings SH, et al. Non-retroviral Endogenous Viral Element Limits Cognate Virus Replication in *Aedes aegypti* Ovaries. *Curr Biol*. 21 de septiembre de 2020;30(18):3495-3506.e6.

50. Honda T, Tomonaga K. Endogenous non-retroviral RNA virus elements evidence a novel type of antiviral immunity [Internet]. Vol. 6, Mobile Genetic Elements. Taylor and Francis Inc.; 2016 [citado 19 de julio de 2020]. Disponible en: [/pmc/articles/PMC4964890/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32414441/)
51. ter Horst AM, Nigg JC, Dekker FM, Falk BW. Endogenous Viral Elements Are Widespread in Arthropod Genomes and Commonly Give Rise to PIWI-Interacting RNAs. *J Virol*. 19 de diciembre de 2018;93(6).

6. DISCUSIÓN GENERAL

La vigilancia entomo-virológica tiene como objetivo detectar los virus circundantes en culícidos de una región por medio de una vigilancia anticipatoria con el fin de intentar predecir la transmisión de la ETV y así poder focalizar las medidas de control vectorial.

Actualmente la vigilancia entomológica, basada en índices aélicos tradicionales que se realiza de manera rutinaria por las secretarías de salud, ha fallado en establecer con certeza las zonas de riesgo y solo algunas secretarías de salud tienen la capacidad instalada para realizar vigilancia entomo-virológica, con mayor poder para la detección de zonas de riesgo de transmisión de arbovirus. La vigilancia entomo-virológica es un sistema eficiente que contribuye a la toma de decisiones, permitiendo disminuir el efecto negativo asociado a enfermedades virales de los seres humanos.

La presente investigación describe la vigilancia entomo-virológica realizada en el Distrito de Santa Marta, Colombia, como nueva estrategia de búsqueda de vectores y virus de importancia médica e interés en salud pública. Se recopiló información entomológica y virológica en tres zonas de estudio (urbana, rural y selvática) evidenciando la circulación de arbovirus, virus insecto específicos y un elemento viral endógeno en las zonas rural y urbana. Se estableció la relación filogenética entre los virus DENV que se encontraron en las muestras positivas; asimismo, se identificó la circulación del virus insecto-específico denominado *Culex flavivirus* que a la fecha no se había descrito en esta zona del territorio colombiano y, por último,

se caracterizó parcialmente un elemento viral endógeno similar a Menghai flavivirus, integrado en el genoma de mosquitos *Ae. aegypti* presentes en las zonas muestreadas. Los resultados constituyen un aporte al conocimiento de las especies de vectores y virus circulantes en el distrito, de la interacción virus-vector e interacción virus-virus en el contexto de coinfecciones del vector con arbovirus e ISF, y finalmente, de la dinámica de los arbovirus.

La identificación de los arbovirus DENV y ZIKV en mosquitos recolectados entre el 2018 y 2019 en zona urbana, a pesar de reportes de casos exclusivamente de dengue, demuestra la importancia de este tipo de estudios, pues permiten reconocer la naturaleza de agentes infecciosos que circulan de manera críptica.

Por otro lado, la serotipificación de DENV es la mejor estrategia disponible para la caracterización epidemiológica de brotes y epidemias, debido al papel mayoritario que juegan las infecciones secundarias por serotipos heterólogos como factor de riesgo para el desarrollo de dengue grave. El conocimiento de la historia de retos inmunológicos de la población a nivel local es decisivo para anticipar el riesgo de dengue grave en futuras epidemias.

Los arbovirus en estado natural pueden causar la infección de los artrópodos hematófagos en el momento en que estos ingieren sangre de vertebrados infectados, los virus son capaces de multiplicarse en los tejidos del artrópodo que actúa como vector biológico y permite su transmisión a través de la picadura a los vertebrados susceptibles, en el caso de los mosquitos, éstos transmiten diferentes virus a una variedad de huéspedes y su mantenimiento en las zonas de influencia se debe al resultado de interacciones complejas entre mosquito, arbovirus y

hospedero, determinados por variaciones genéticas y aspectos ecológicos y ambientales.

La actualización epidemiológica anual para arbovirus de la Organización Panamericana de Salud (OPS) reporta para dengue entre la semana epidemiológica 1 (SE 1) y la SE 28 del 2022 un total de 2.011.031 casos en la Región de las Américas, comparado con la SE 1 y 53 del 2020, donde se notificó un total de 2,333,43 casos, teniendo en cuenta que el 2020 inicio con una alta transmisión hasta que la tendencia del número de casos coincidió con el inicio de las medidas de distanciamiento social por el COVID-19, lo cual generó una disminución importante en los reportes (59). Colombia, reportó 32.327 casos de dengue hasta la SE 28 del 2022, superado por países como Brasil con 1.827.617 casos y Perú con 56.021 casos, primero y segundo en mayor número de casos en la región de las Américas.

En Colombia, las arbovirosis de mayor incidencia son el dengue, la fiebre chikungunya y la infección por virus Zika, debido a las características físicas que favorecen la presencia del vector (*Ae. aegypti*) en el 90% del territorio nacional. Los reportes de casos se realizan en el Sistema Nacional de Vigilancia (Sivigila) según el cual, en la semana epidemiológica 52 del 2021, se reportaron 53.515 casos entre los tres virus, 53.334 casos de dengue, 110 casos de fiebre chikungunya y 71 casos de infección por virus Zika.

El departamento del Amazonas seguido por las ciudades Barranquilla y Cartagena, son los territorios de mayor preocupación por el número de casos en aumento, datos que no serían muy exactos si se tiene en cuenta el subregistro para este tipo de

enfermedades en la mayor parte del territorio nacional. Barranquilla y Cartagena poseen una geografía similar al Distrito de Santa Marta, siendo relevante la mayor circulación de turistas que frecuentan zonas de transición entre ambientes selvático, rural y urbano, como son el Parque Nacional Natural Tayrona y el Parque Natural Sierra Nevada de Santa Marta, lugares que además albergan diferentes comunidades indígenas.

El distrito de Santa Marta a agosto del 2022, reportó 217 casos entre dengue y dengue grave. Para chikungunya y Zika no se reportaron casos en el mismo periodo. Por esto es de suma importancia una vigilancia entomo-viológica permanente para detectar y anticipar posibles brotes en la población susceptible y comunidades vulnerables.

Con técnicas de biología molecular utilizadas en el presente estudio se determinó la circulación de DENV del serotipo 1, en la zona urbana en los barrios La lucha, 11 de noviembre y Ciudad equidad en el año 2018.

Los géneros y especies más abundantes según el presente estudio fueron *Ae. aegypti* (59.2%) y *Culex* spp. (11.2%), lo cual guarda coherencia con un mayor esfuerzo de muestreo en zonas urbana y rural, así como con el comportamiento antropofílico de estas especies.

El 21.9% de los grupos de mosquitos analizados por biología molecular fueron positivos para Flavivirus genérico y el 0.43% de los grupos fueron positivos para *Culex flavivirus*, dato similar reportado en el 2019 en Córdoba, Colombia por Miranda et al (28), donde los grupos positivos para *Culex flavivirus* fueron del 0.6%. Al realizar la filogenia de los flavivirus, basada en la región conservada de NS5 de la muestra CIST0152 MAMD cFD2R *Culex flavivirus* CO 2018, se observa que se

forma un grupo monofilético con otras secuencias estrechamente relacionadas reportadas en todo el mundo de la misma especie siendo cercana a la secuencia de referencia NC_008604 de *Culex flavivirus*. Es importante tener presente esta variable, ya que puede llegar a tener un efecto significativo en la competencia vectorial.

Los estudios robustos realizados recientemente nos muestran la secuenciación de próxima generación como una nueva tecnología que participa en la búsqueda de virus que incluso han llevado al descubrimiento de ISV, los cuales se pueden replicar en células de insecto, pero no en vertebrados.(60). En el caso de los flavivirus, los ISF no solo se han descrito infectando los vectores, también se han encontrado fragmentos de estos virus insertados en el genoma de los vectores como elementos virales endógenos, denominados NIRV luego de los hallazgos realizados en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en el 2004 por Crochu et al (61).

Se han reportado EVE que han alcanzado la fijación y cumplen funciones en sus hospederos (descritas en el capítulo 4), por ejemplo, el ERV derivado de gag (gag-ERV), el cual bloquea la infección por MLV (62). Asimismo, el gen codificante para la proteína de envoltura (env) de retrovirus que infectaron y alcanzaron la línea germinal de los antepasados de los mamíferos placentarios, habría derivado luego de la evolución de millones de años, en el origen de las proteínas denominadas sincitinas, cuyo papel en la fusión de células, origen y complejidad del sincitiotrofoblasto que forma la interfaz materno-fetal, habría determinado la radiación de los mamíferos placentarios (15,63).

Los EVE se han relacionado con la inmunidad antiviral de los artrópodos. ter Horst et al en el 2018 realizaron un estudio en el que se identificaron aproximadamente

4.061 EVE en 48 genomas de artrópodos. Estos fueron clasificados como EVE enriquecidos por piARN y EVE no enriquecidos por piARN. En general los dos grupos no tuvieron diferencias significativas en longitud o identidad (64).

Los mecanismos de formación de EVE se desconocen a la fecha con precisión, pero se ha propuesto que se debe a quimeras de ADN entre secuencias virales de infecciones persistentes y parte de una secuencia de elementos transponible que se forman durante la transcripción inversa de retrotransposones del hospedero, siendo así capaces de integrarse al genoma.

Olovnikov et al en el 2013 estudiaron la integración de un retrotransposon en una nueva ubicación del genoma de *Drosophila* y su reconocimiento por los piARN unidos a proteínas PIWI. Esto fue suficiente para la formación de un nuevo locus generador de piARN en la ubicación de la integración (65). El enriquecimiento de EVE en grupos de piARN podría deberse a la asociación con los retrotransposones y la generación de nuevos grupos piARN en los sitios de integración de quimeras virus-transposón. Para *Drosophila* no se ha descrito funciones antivirales, pero en artrópodos del género *Aedes* sí se ha descrito esta función (65,66)

En la presente investigación se pudo identificar la presencia de un NIRV en la población de *Ae. aegypti* estudiada en el distrito de Santa Marta. La demostración de la integración de este elemento se sustentó en el diseño de una estrategia de amplificación, algunos de cuyos cebadores hibridaron de manera específica en el genoma viral o en el genoma del mosquito.

La presencia de virus insecto-específicos y NIRV podría tener un efecto sobre la competencia vectorial, ya que se ha demostrado que la presencia de estos puede aumentar o disminuir la replicación de algunos arbovirus (33,67–69). En zonas

endémicas de arbovirus y podría explicar el mantenimiento del DENV, la baja circulación de ZIKV y CHIKV, y la no incriminación de *Culex* spp. como vectores de arbovirus propios del ciclo urbano en Colombia.

7. CONCLUSIONES

La presente investigación aporta información relevante sobre la vigilancia entomoviológica en el distrito de Santa Marta, Colombia y la primera descripción de un elemento endógeno viral similar a un virus insecto-específico en el genoma de un *Ae. aegypti*.

Se demostró la circulación de DENV-1 y ZIKV en las poblaciones de vectores de la zona urbana del distrito de Santa Marta, lo cual aporta información relevante en la toma de decisiones por parte de los programas de vigilancia epidemiológica y control de vectores.

También se evidenció la circulación de *Culex flavivirus* en mosquitos del género *Culex*, el cual se suma a los ya reportados en el territorio nacional.

Se reportó la primera evidencia de la presencia de un NIRV en mosquitos *Ae. aegypti*, hallazgo que promueve preguntas tales como: ¿Qué relación tiene el NIRV descrito y los arbovirus en circulación? ¿Participa el NIRV en la respuesta inmune innata del mosquito frente a infecciones por virus relacionados, tales como los flavivirus de importancia en salud pública? ¿Podría tener algún impacto el ISF y el NIRV en la competencia vectorial de los mosquitos para los arbovirus presentes en ciclo urbano?

La vigilancia entomo-virológica permite ampliar la capacidad de predecir la transmisión de las enfermedades donde se involucran a los vectores, y a su vez proporcionar una herramienta para la implementación e intervenciones oportunas como medidas de control y esto solo es posible por medio de supervisión constante.

8. PERSPECTIVAS

La vigilancia en Colombia de las enfermedades transmitidas por vectores se realiza a través de índices entomológicos y con la notificación de casos, que lastimosamente en el país se realizan de manera tardía, lo cual se traduce en intervenciones no efectivas a las poblaciones en riesgo. La detección viral en los mosquitos mediante pruebas moleculares supone información precisa para la toma de decisiones que permitan mitigar las consecuencias en salud pública de la población del distrito de Santa Marta y el país (54).

Este trabajo de investigación pretende ser el precursor de nuevos protocolos que permitan la detección de arbovirus y NIRV mediante la realización de pruebas moleculares y secuenciación de próxima generación.

Es importante encontrar los sitios de integración en cada genoma y si estos se conservan o no, lo cual sería útil para realizar ensayos de funcionalidad de las integraciones.

Con la evidencia que se tiene hasta el momento se ha planteado la hipótesis de que los NIRV actúan expresando piARNs derivados del genoma del virus en el vector para generar degradación total o parcial del ARN viral de arbovirus estrechamente relacionados, bloqueando la infección o disminuyendo los niveles de virus y

favoreciendo la inmunidad innata del mosquito. En este contexto, los NIRV podrían ser explotados como una alternativa de control biológico de brotes de arbovirus de importancia médica.

9. REFERENCIAS GENERALES

1. Hanley KA, Weaver SC. Arbovirus Evolution. En: Origin and Evolution of Viruses [Internet]. Elsevier; 2008. p. 351-91. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123741530000163>
2. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *J Virol* [Internet]. diciembre de 2006;80(23):11418-31. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01257-06>
3. Sangiambut S, Suphatrakul A, Sriburi R, Keelapang P, Puttikhunt C, Kasinrerak W, et al. Sustained replication of dengue pseudoinfectious virus lacking the capsid gene by trans-complementation in capsid-producing mosquito cells. *Virus Res* [Internet]. junio de 2013;174(1-2):37-46. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170213000592>
4. Pan American Health Organization. OPS/OMS | Dengue [Internet]. 2015 [citado 7 de agosto de 2022]. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9469:dengue&Itemid=40721&lang=es
5. Laiton-Donato K, Alvarez DA, Peláez-Carvajal D, Mercado M, Ajami NJ, Bosch I, et al. Molecular characterization of dengue virus reveals regional diversification of serotype 2 in Colombia. *Virol J* [Internet]. 2019 [citado 16 de enero de 2022];16:62. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1170-4>
6. Zhang C, Mammen MP, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, et al. Clade Replacements in Dengue Virus Serotypes 1 and 3 Are Associated with Changing Serotype Prevalence. *J Virol* [Internet]. 15 de diciembre de 2005 [citado 24 de agosto de 2022];79(24):15123-30. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.79.24.15123-15130.2005>
7. De Paula Freitas B, De Oliveira Dias JR, Prazeres J, Sacramento GA, Ko AI, Maia M, et al. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol* [Internet]. 1 de mayo de 2016 [citado 14 de febrero de 2022];134(5):529-35. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26865554/>
8. Leparç-Goffart I, Nougairède A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet* [Internet]. febrero de 2014;383(9916):514. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614601859>
9. Higuera A, Ramírez JD. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta Trop* [Internet]. febrero de 2019;190:99-111. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X18311446>
10. Bryant JE, Holmes EC, Barrett ADT. Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. *PLOS Pathog* [Internet]. 2007 [citado 14 de febrero de 2022];3(5):e75. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0030075>

11. De La Hoz F, Enrique M, Duran M, Pacheco García OE. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública FIEBRE AMARILLA Hernán Quijada Bonilla.
12. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med* [Internet]. 29 de enero de 2018 [citado 19 de mayo de 2020];69(1):395-408. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-050715-105122>
13. Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-specific virus discovery: Significance for the arbovirus community. *Viruses*. 2015;7(9):4911-28.
14. Keita H, Harunhik I, Yoshio T, Kazuhiko Y, Toshinori S, Masao Y, et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* [Internet]. 15 de marzo de 2007 [citado 11 de julio de 2021];359(2):405-14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17070886/>
15. Stollar V, Thomas VL. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology* [Internet]. 1975 [citado 14 de febrero de 2022];64(2):367-77. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/806166/>
16. Espinoza-Gómez F, López-Lemus AU, Rodríguez-Sánchez IP, Martínez-Fierro ML, Newton-Sánchez OA, Chávez-Flores E, et al. Detection of sequences from a potentially novel strain of cell fusing agent virus in Mexican *Stegomyia (Aedes) aegypti* mosquitoes. *Arch Virol* [Internet]. 2011 [citado 14 de febrero de 2022];156(7):1263-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21409444/>
17. Cook S, Bennett SN, Holmes EC, De Chesse R, Moureau G, de Lamballerie X. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol* [Internet]. abril de 2006 [citado 14 de febrero de 2022];87(Pt 4):735-48. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16528021/>
18. Blitvich BJ, Firth AE. Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. Vol. 7, *Viruses*. 2015. 1927-1959 p.
19. Gravina HD, Suzukawa AA, Zanluca C, Cardozo Segovia FM, Tschá MK, Martins da Silva A, et al. Identification of insect-specific flaviviruses in areas of Brazil and Paraguay experiencing endemic arbovirus transmission and the description of a novel flavivirus infecting *Sabethes belisarioi*. *Virology*. 15 de enero de 2019;527:98-106.
20. Kolodziejek J, Pachler K, Bin H, Mendelson E, Shulman L, Orshan L, et al. Barkedji virus, a novel mosquito-borne flavivirus identified in *Culex perexiguus* mosquitoes, Israel, 2011. *J Gen Virol* [Internet]. 1 de noviembre de 2013 [citado 14 de febrero de 2022];94(PART 11):2449-57. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.056200-0>
21. Lee JS, Grubaugh ND, Kondig JP, Turell MJ, Kim HC, Klein TA, et al. Isolation and genomic characterization of Chaoyang virus strain ROK144 from *Aedes vexans nipponii* from the Republic of Korea. *Virology*. 20 de enero de 2013;435(2):220-4.
22. Vázquez A, Sánchez-Seco MP, Palacios G, Molero F, Reyes N, Ruiz S, et al. Novel Flaviviruses Detected in Different Species of Mosquitoes in Spain. <https://home.liebertpub.com/vbz> [Internet]. 8 de marzo de 2012 [citado 14 de

febrero de 2022];12(3):223-9. Disponible en:
<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vbz.2011.0687>

23. Evangelista J, Cruz C, Guevara C, Astete H, Carey C, Kochel TJ, et al. Characterization of a novel flavivirus isolated from *Culex* (Melanoconion) ocosa mosquitoes from Iquitos, Peru. *J Gen Virol* [Internet]. 1 de junio de 2013 [citado 14 de febrero de 2022];94(PART 6):1266-72. Disponible en:
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.050575-0>
24. Pauvolid-Corrêa A, Solberg O, Couto-Lima D, Kenney J, Serra-Freire N, Brault A, et al. Nhumirim virus, a novel flavivirus isolated from mosquitoes from the Pantanal, Brazil. *Arch Virol* [Internet]. 1 de enero de 2015 [citado 14 de febrero de 2022];160(1):21. Disponible en: [/pmc/articles/PMC4785999/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2663380/)
25. Öhlund P, Lundén H, Blomström A-L. Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. *Virus Genes* [Internet]. 10 de abril de 2019;55(2):127-37. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11262-018-01629-9>
26. Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Garcia-Rejon JE, Hovav E, Powers AM, Lin M, et al. Detection of RNA from a Novel West Nile-like Virus and High Prevalence of an Insect-specific Flavivirus in Mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2009 [citado 11 de julio de 2021];80(1):85. Disponible en: [/pmc/articles/PMC2663380/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2663380/)
27. Obara-Nagoya M, Yamauchi T, Watanabe M, Hasegawa S, Iwai-Itamochi M, Horimoto E, et al. Ecological and genetic analyses of the complete genomes of *Culex* flavivirus strains isolated from *Culex tritaeniorhynchus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) group mosquitoes. *J Med Entomol* [Internet]. marzo de 2013 [citado 11 de julio de 2021];50(2):300-9. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23540117/>
28. Miranda J, Mattar S, Gonzalez M, Hoyos-López R, Aleman A, Aponte J. First report of *Culex* flavivirus infection from *Culex coronator* (Diptera: Culicidae), Colombia. *Virol J*. 2019;16(1):1-6.
29. Goenaga S, Fabbri CM, García JB, Rondan JC, Gardenal CN, Calderón GE, et al. New Strains of *Culex* flavivirus Isolated in Argentina. *J Med Entomol* [Internet]. 2018 [citado 12 de julio de 2021];51(4):900-6. Disponible en:
<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/34517>
30. Wang H, Wang H, Fu S, Liu G, Liu H, Gao X, et al. Isolation and identification of a distinct strain of *Culex* Flavivirus from mosquitoes collected in Mainland China. *Virol J* [Internet]. 27 de marzo de 2012 [citado 14 de febrero de 2022];9(1):1-8. Disponible en: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-9-73>
31. Blitvich BJ, Lin M, Dorman KS, Soto V, Hovav E, Tucker BJ, et al. Genomic Sequence and Phylogenetic Analysis of *Culex* Flavivirus, an Insect-Specific Flavivirus, Isolated From *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Iowa. *J Med Entomol* [Internet]. julio de 2009 [citado 14 de febrero de 2022];46(4):934-41. Disponible en: <https://scite.ai/reports/genomic-sequence-and-phylogenetic-analysis-xErZZb>
32. MacHado DC, Mondini A, Dos Santos Santana V, Yonamine PTK, Chiaravalloti Neto F, De Andrade Zanotto PM, et al. First Identification of *Culex* flavivirus

- (Flaviviridae) in Brazil. *Intervirology* [Internet]. octubre de 2012 [citado 14 de febrero de 2022];55(6):475-83. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/FullText/337166>
33. Houé V, Gabiane G, Dauga C, Suez M, Madec Y, Mousson L, et al. Evolution and biological significance of flaviviral elements in the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1265-79.
 34. Nag DK, Brecher M, Kramer LD. DNA forms of arboviral RNA genomes are generated following infection in mosquito cell cultures. *Virology*. 1 de noviembre de 2016;498:164-71.
 35. Whitfield ZJ, Dolan PT, Kunitomi M, Tassetto M, Seetin MG, Oh S, et al. The Diversity, Structure, and Function of Heritable Adaptive Immunity Sequences in the *Aedes aegypti* Genome. *Curr Biol* [Internet]. 2017;27(22):3511-3519.e7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.067>
 36. Vodovar N, Bronkhorst AW, van Cleef KWR, Miesen P, Blanc H, van Rij RP, et al. Arbovirus-Derived piRNAs Exhibit a Ping-Pong Signature in Mosquito Cells. Pfeiffer S, editor. *PLoS One* [Internet]. 24 de enero de 2012 [citado 19 de febrero de 2021];7(1):e30861. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0030861>
 37. ter Horst AM, Nigg JC, Dekker FM, Falk BW. Endogenous Viral Elements Are Widespread in Arthropod Genomes and Commonly Give Rise to PIWI-Interacting RNAs. *J Virol* [Internet]. 19 de diciembre de 2018 [citado 21 de julio de 2020];93(6):2124-42. Disponible en: <http://jvi.asm.org/>
 38. Weaver SC. Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Arch Virol Suppl* [Internet]. 2005 [citado 30 de enero de 2022];(19):33-44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16358422/>
 39. Groot H, Morales A, Romero M, Ferro C, Prías E, Vidales H, et al. Estudios de arbovirosis en Colombia en la década de 1970. *Biomédica* [Internet]. 1 de diciembre de 1996 [citado 30 de enero de 2022];16(4):331-44. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/915>
 40. Papa A. Emerging arboviruses of medical importance in the Mediterranean region. *J Clin Virol.* 1 de junio de 2019;115:5-10.
 41. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 22 de enero de 2016;65(3):1-4.
 42. Brustolin M, Pujhari S, Henderson CA, Rasgon JL. Anopheles mosquitoes may drive invasion and transmission of Mayaro virus across geographically diverse regions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(11):1-11.
 43. Couto-Lima Di, Madec Y, Bersot MI, Campos SS, Motta MDA, Dos Santos FB, et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep* [Internet]. 1 de diciembre de 2017 [citado 20 de febrero de 2022];7(1). Disponible en: </pmc/articles/PMC5501812/>
 44. Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 2015, Vol 7, Pages 3741-3767 [Internet]. 8 de julio

de 2015 [citado 20 de febrero de 2022];7(7):3741-67. Disponible en:
<https://www.mdpi.com/1999-4915/7/7/2795/htm>

45. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife* [Internet]. 30 de junio de 2015 [citado 20 de febrero de 2022];4(JUNE2015). Disponible en: </pmc/articles/PMC4493616/>
46. Yang HM, Macoris MLG, Galvani KC, Andrighetti MTM, Wanderley DMV. Assessing the effects of temperature on the population of *Aedes aegypti*, the vector of dengue. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2009 [citado 20 de febrero de 2022];137(8):1188-202. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/assessing-the-effects-of-temperature-on-the-population-of-aedes-aegypti-the-vector-of-dengue/E2FE126FB84D0DE97A94E68343B4649C>
47. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infect Genet Evol*. 1 de enero de 2019;67:191-209.
48. Garcia-Luna SM, Weger-Lucarelli J, Rückert C, Murrieta RA, Young MC, Byas AD, et al. Variation in competence for ZIKV transmission by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2 de julio de 2018 [citado 20 de febrero de 2022];12(7). Disponible en: </pmc/articles/PMC6044546/>
49. Pereira-Silva J, ... VN-M do I, 2017 undefined. First evidence of Zika virus venereal transmission in *Aedes aegypti* mosquitoes. *SciELO Bras* [Internet]. [citado 20 de febrero de 2022]; Disponible en: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/4sgVDfrRgjbYVshNPW9hL6r/abstract/?lang=en>
50. Gubler DJ, Trent DW. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infect Agents Dis* [Internet]. 1 de diciembre de 1993 [citado 20 de febrero de 2022];2(6):383-93. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/8012739>
51. Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1 de febrero de 2009 [citado 20 de febrero de 2022];103(2):109-21. Disponible en: <https://academic.oup.com/trstmh/article/103/2/109/1904954>
52. WHO. Handbook for integrated vector management [Internet]. Vol. 24, Outlooks on Pest Management. 2013 [citado 7 de agosto de 2022]. 142-143 p. Disponible en: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1743-1026&volume=24&issue=3&spage=142>
53. Peña-García VH, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo AM, Díaz FJ, Gómez-Palacio A, Arboleda-Sánchez S. Infection Rates by Dengue Virus in Mosquitoes and the Influence of Temperature May Be Related to Different Endemicity Patterns in Three Colombian Cities. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 21 de julio de 2016 [citado 20 de febrero de 2022];13(7):734. Disponible en: </pmc/articles/PMC4962275/>
54. Pérez-Pérez J, Sanabria WH, Restrepo C, Rojo R, Henao E, Triana O, et al. Virological surveillance of *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* as support for decision making for dengue control in Medellín. *Biomédica* [Internet]. 29 de marzo de 2017 [citado 20 de febrero de 2022];37(2):155-66. Disponible en:

<https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3467/3735>

55. Méndez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Muñoz J, Mari´ M, et al. HUMAN AND MOSQUITO INFECTIONS BY DENGUE VIRUSES DURING AND AFTER EPIDEMICS IN A DENGUE-ENDEMIC REGION OF COLOMBIA. 2006 [citado 20 de febrero de 2022]; Disponible en: www.cdc.gov.co/
56. Pérez-Castro R, Castellanos JE, Olano VA, Matiz MI, Jaramillo JF, Vargas SL, et al. Detection of all four dengue serotypes in *Aedes aegypti* female mosquitoes collected in a rural area in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 1 de abril de 2016 [citado 20 de febrero de 2022];111(4):233-40. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/mioc/a/5Xmqv7c7mp4px6HKLgJZhSv/?format=html&lang=en>
57. dos Santos TP, Cruz OG, da Silva KAB, de Castro MG, de Brito AF, Maspero RC, et al. Dengue serotype circulation in natural populations of *Aedes aegypti*. Acta Trop. 1 de diciembre de 2017;176:140-3.
58. dos Reis IC, Gibson G, Ayllón T, de Medeiros Tavares A, de Araújo JMG, da Silva Monteiro E, et al. Entomo-virological surveillance strategy for dengue, Zika and chikungunya arboviruses in field-caught *Aedes* mosquitoes in an endemic urban area of the Northeast of Brazil. Acta Trop. 1 de septiembre de 2019;197:105061.
59. OPS. Actualización epidemiológica anual para dengue, chikunguña y zika en 2022. Organ Panam la Salud [Internet]. 2022 [citado 12 de junio de 2022]; Disponible en: <https://www.paho.org/plisa>
60. Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Weaver SC, Vasilakis N. Insect-Specific Viruses: A Historical Overview and Recent Developments. Adv Virus Res. 1 de enero de 2017;98:119-46.
61. Crochu S, Cook S, Attoui H, Charrel RN, De Chesse R, Belhouchet M, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. J Gen Virol [Internet]. 1 de julio de 2004 [citado 19 de julio de 2020];85(7):1971-80. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.79850-0>
62. Anderssen S, Sjøttem E, Svineng G, Johansen T. Comparative analyses of LTRs of the ERV-H family of primate-specific retrovirus-like elements isolated from marmoset, African green monkey, and man. Virology [Internet]. 21 de julio de 1997 [citado 24 de julio de 2020];234(1):14-30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9234943/>
63. Cornelis G, Funk M, Vernochet C, Leal F, Tarazona OA, Meurice G, et al. An endogenous retroviral envelope syncytin and its cognate receptor identified in the viviparous placental Mabuya lizard. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 19 de diciembre de 2017 [citado 4 de julio de 2020];114(51):E10991-1000. Disponible en: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1714590114
64. ter Horst AM, Nigg JC, Dekker FM, Falk BW. Endogenous Viral Elements Are Widespread in Arthropod Genomes and Commonly Give Rise to PIWI-Interacting RNAs. J Virol. 2018;93(6).
65. Olovnikov I, Ryazansky S, Shpiz S, Lavrov S, Abramov Y, Vaury C, et al. De novo piRNA cluster formation in the *Drosophila* germ line triggered by transgenes containing a transcribed transposon fragment. Nucleic Acids Res [Internet]. junio de

2013 [citado 22 de julio de 2020];41(11):5757-68. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23620285/>

66. Bronkhorst AW, Van Rij RP. The long and short of antiviral defense: Small RNA-based immunity in insects [Internet]. Vol. 7, *Current Opinion in Virology*. Elsevier; 2014 [citado 21 de julio de 2020]. p. 19-28. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24732439/>
67. Houé V, Bonizzoni M, Failloux AB. Endogenous non-retroviral elements in genomes of *Aedes* mosquitoes and vector competence. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):542-55.
68. Larouche JD, Trofimov A, Hesnard L, Ehx G, Zhao Q, Vincent K, et al. Widespread and tissue-specific expression of endogenous retroelements in human somatic tissues. *Genome Med* [Internet]. 28 de abril de 2020 [citado 10 de marzo de 2022];12(1):1-16. Disponible en:
<https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-020-00740-7>
69. Oliveira JH, Bahia AC, Vale PF. How are arbovirus vectors able to tolerate infection? *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2020;103(September 2019):103514. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103514>