

# **Evaluación de la localización y utilización del esperma en hembras *Aedes aegypti***

**Juliana Agudelo Ramírez<sup>a</sup>; Catalina Alfonso-Parra, PhD<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Estudiante Microbiología Industrial y Ambiental Universidad de Antioquia, Medellín.

<sup>b</sup> Investigadora Grupo Tándem Max Planck Biología Reproductiva del Mosquito, Universidad de Antioquia, Medellín.

## **Resumen**

*Aedes aegypti* es un vector de gran importancia médica dado que transmite patógenos causantes de enfermedades humanas; actualmente no existe una vacuna o tratamiento para algunas de estas enfermedades. Entre las herramientas más efectivas contra las enfermedades de transmisión vectorial están las que se basan en el control de las poblaciones del vector. Para el control de la población de *Ae. aegypti* es importante la manipulación de la reproducción del mosquito, para suprimir poblaciones silvestres o reemplazarlas por individuos que no transmitan enfermedades. Así pues, se hace necesario conocer los procesos moleculares implicados en el comportamiento del apareamiento del vector, los cuales aún, no se comprenden completamente. Entre los aspectos sobre los que hay poco conocimiento, están la localización y el uso que hacen las hembras *Ae. aegypti* del esperma transferido durante la cópula. Por esto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la localización del esperma en hembras *Ae. aegypti* en diferentes momentos de la vida del mosquito. Para lo cual usamos la cepa modificada DsRed, de *Ae. Aegypti*, en la cual el esperma está marcado con fluorescencia, lo que nos permitió observar la localización del esperma y el uso del mismo en diferentes instantes. Se encontró que el esperma transferido a las hembras se encuentra localizado hasta por 15 días en las espermatecas y en la bursa y no se observan cambios en la localización después uno o dos ciclos gonotróficos. Adicionalmente, determinamos la localización y el uso del esperma en la hembra después de aparearlas dos veces, primero con machos silvestres seguido por cópulas con machos modificados, revisamos el fenotipo de su progenie y diseccionamos las

hembras para verificar presencia o ausencia de fluorescencia. Observamos que la progenie resultante de hembras doblemente inseminadas, es mayor para el primer macho que insemina.

Los resultados de este estudio sugieren que el esperma queda en la bursa durante al menos 15 días y no es degradado ni expulsado. Además, al estudiar el uso del esperma después de la cópula, observamos que las hembras que cópulan dos veces, usan el esperma de machos diferentes para fecundar sus huevos.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, doble inseminación, localización esperma, fecundación.

## 1. Introducción

*Aedes aegypti* es un vector de gran importancia médica que transmite patógenos causantes de enfermedades tales como el Dengue, Zika, Chikunguña y fiebre amarilla (Gómez García, 2018). Según la OMS más del 80% de la población mundial está en riesgo de contraer una enfermedad de transmisión vectorial (*Enfermedades transmitidas por vectores*, n.d.). *Ae. aegypti* tiene un alto grado de antropofilia, amplia distribución geográfica, adaptabilidad a centros urbanos y capacidad intrínseca para infectarse con virus como el dengue, permitir su replicación y posteriormente transmitirlo a un huésped susceptible (Quintero Gil et al., 2010).

Actualmente, no hay vacuna o cura con licencia comercial contra algunas de las enfermedades transmitidas por mosquitos (Degner & Harrington, 2016b), por esto, las herramientas más efectivas contra las enfermedades de transmisión vectorial se basan en el control de las poblaciones del vector (Degner & Harrington, 2016b). Algunos esfuerzos para controlar la población de *Ae. aegypti* implican la manipulación de la reproducción del mosquito para suprimir poblaciones silvestres o reemplazarlas por individuos que no transmitan enfermedades. Entre las estrategias utilizadas están los mosquitos infectados con *Wolbachia*, mosquitos genéticamente modificados y mosquitos

estériles (Oliva et al., 2014); estas estrategias se basan en características reproductivas, así, se hace necesario conocer los procesos moleculares implicados en el comportamiento del apareamiento del vector, los cuales aún, no se comprenden completamente (Richardson et al., 2015).

Durante el apareamiento de mosquitos como *Ae. aegypti*, el macho transfiere a la hembra esperma, proteínas y otras moléculas en el líquido seminal (Avila et al., 2011). Estas proteínas del fluido seminal (SFP) inducen en la hembra una serie de cambios fisiológicos; incluyendo la disminución de la probabilidad de que las hembras vuelvan a aparearse, el aumento en la tasa de ovulación y puesta de huevos y la modulación de los parámetros de almacenamiento de esperma (Avila et al., 2011).

En *Ae. aegypti* la transferencia de SFP resulta en que las hembras presenten refractariedad a la cópula, es decir, que rechacen un segundo apareamiento posterior a una primera inseminación (Duvall et al., 2017). Sin embargo, estudios adicionales evidencian un 24% de probabilidad de que ocurra un segundo apareamiento (poliandria) inmediatamente después de la primera cópula (Degner & Harrington, 2016a). Así mismo, análisis de parentesco realizados en poblaciones silvestres demuestran que la progenie de una misma hembra puede presentar paternidad múltiple, dos o tres padres diferentes, lo que establece que la poliandria puede ocurrir en un entorno natural (Richardson et al., 2015). También se ha encontrado que es posible una progenie mixta en condiciones de laboratorio, cuando la cópula es interrumpida antes de 10 segundos; reportando un 8,6% de progenie perteneciente al segundo macho inseminador cuando hay interrupción de la primera cópula 7 segundos después de iniciada y un 72,2% de progenie del segundo macho cuando la primera cópula se interrumpe 3 segundos después de iniciada (Carvalho et al., 2018). Por otro lado, un 22% de hembras *Ae. aegypti* puede permitir transferencia de semen de un segundo macho a la bursa después del quinto ciclo gonotrófico (Oliva et al., 2014); y aunque se puede observar en

la bursa esperma del macho, no es claro si es usado por la hembra para fecundar (Degner & Harrington, 2016a).

En la especie *Anopheles albimanus*, se han observado múltiples inseminaciones en condiciones de laboratorio, donde el 0,6% de progenie producida en el segundo ciclo de oviposición proviene del segundo macho que inseminó la hembra (Villarreal et al., 1994), al igual que un 4% de la progenie de las hembras que completaron un tercer ciclo gonotrófico (Villarreal et al., 1994).

En *Ae. aegypti* después de la cópula los espermatozoides ingresan primero a la bursa y luego se desplazan a las espermatecas, tejido principal de almacenamiento (Degner & Harrington, 2016b). Pasados cinco minutos dos de las tres espermatecas se encuentran llenas (Degner & Harrington, 2016b) y la transferencia de espermatozoides desde la bursa se detiene (Degner & Harrington, 2016b). Se estima que solo el 62% de los espermatozoides se transfieren a las espermatecas en *Ae. aegypti* (Oliva et al., 2013). Con el esperma también ingresan en la bursa las secreciones de las glándulas accesorias del macho (MAG), que contienen un material granular que se agrupa y se solidifica gradualmente (Oliva et al., 2013). El esperma que no se desplaza hacia las espermatecas pierden su movilidad quedando atrapado entre las secreciones MAG dentro de la bursa después del segundo día de la cópula (Oliva et al., 2014); se cree que el esperma de *Ae. aegypti* es digerido y absorbido junto con el contenido de las glándulas accesorias dentro de la bursa (Oliva et al., 2014). En especies como *Aedes albopictus* las secreciones del macho transferidas en el fluido seminal (MAG) durante la cópula, terminan solidificándose e impidiendo la movilidad del esperma dentro de la bursa (Oliva et al., 2013), este esperma atrapado finalmente se disuelve en la bursa después de un día junto con las secreciones (MAG) (Oliva et al., 2013). A pesar de estos resultados, no está claro cuáles son las implicaciones para las hembras *Ae. aegypti* la cantidad de esperma que no se usa.

La falta de comprensión en los procesos reproductivos complica futuros esfuerzos de control biológico y tiene implicaciones para el muestreo de genética de poblaciones (Richardson et al., 2015). Por esto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la localización y el uso del esperma en las hembras *Ae. aegypti*. Para esto usamos la cepa modificada DsRed, de *Ae. Aegypti*, donde el esperma está marcado con fluorescencia, lo que nos permitió observar su localización y uso en los tejidos reproductivos femeninos. Para observar la localización apareamos a las hembras con machos modificados, mientras que, para evaluar el uso, apareamos a las hembras con un macho silvestre seguido por un macho modificado. Aportando información para mejorar la comprensión de los procesos reproductivos en el vector *Ae. aegypti*.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Mosquitos**

Se utilizaron dos cepas diferentes del mosquito *Ae. aegypti*, la cepa Thai colectada en Bangkok, Tailandia, pero mantenida en condiciones de laboratorio desde el 2009 y la cepa transgénica DsRed.

Utilizamos la cepa Thai porque es una cepa con la cual se han hecho muchos estudios de reproducción y por esto se conoce mucho acerca de su comportamiento. También usamos la cepa DsRed ya que, es una cepa modificada que presenta dos transgenes. El primer transgén es EGFP, que bajo el control transcripcional del promotor sintético 3xP3, permite ver fluorescencia verde en ojos, usándose como marcador ocular en larvas. El segundo transgén es DsRed, que se encuentra bajo el promotor del gen de la  $\beta 2$  tubulina y expresa una proteína roja fluorescente en el esperma de los machos (Kokoza et al., 2001).

## ***2.2 Procedimiento de crianza***

Huevos de ambas cepas (Thai y DsRed) se eclosionaron en una campana de vacío por separado. Las larvas obtenidas se criaron a una densidad de 200 larvas por litro de agua destilada y se alimentaron con cuatro pellets de comida para pez. Las pupas fueron transferidas individualmente a tubos de ensayo y los adultos que emergieran se separaron por sexo. Los adultos se liberaron en jaulas de 0,4m<sup>3</sup>, separados por sexo para asegurar machos y hembras vírgenes. Los mosquitos adultos tenían acceso a una solución de sacarosa al 10% p/v como alimento. Los mosquitos permanecieron en jaulas hasta que tuvieron el rango de edad necesaria para los ensayos de apareamiento, machos y hembras jóvenes entre 4 y 6 días y machos viejos 20 días. Todos los estadios de desarrollo se mantuvieron en una incubadora a 27°C y 80% de humedad relativa.

## ***2.3 Consideraciones en las cópulas***

Todos los apareamientos se realizaron en jaulas de 0,4m<sup>3</sup>. En las cópulas individuales se introdujeron un macho y una hembra y se agitó suavemente de vez en cuando para estimular el encuentro. Dado que *Ae. aegypti* presenta una cópula efectiva de 10 segundos (Ponlawat & Harrington, 2009), en los apareamientos individuales se midió el tiempo de unión en cópula de los genitales y solo se consideraron las hembras que permanecieron con su genitalia unida al macho mínimo 10 segundos. Para las cópulas en grupo se mantuvo la proporción 1:1 de machos y hembras.

## ***2.3 Experimento 1: Localización del esperma***

En tres jaulas diferentes fueron introducidas 40 hembras vírgenes de la cepa Thai de 4 a 6 días de edad y 40 machos DsRed vírgenes del mismo rango de edad, los cuales dejaron apareando 12 horas. Pasadas 12 horas se retiraron los machos y las hembras fueron alimentadas con sangre. Después de

4 días, las 40 hembras de la primera jaula fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (grupo C0); grupo que se usó como control. Las hembras de las otras dos jaulas (grupo C1 y C2) se individualizaron en tubos falcón con sustrato para oviposición. Luego de 24 horas, las hembras fueron regresadas a sus respectivas jaulas, se alimentaron con sangre y se realizó el conteo de los huevos ovipositados. Después de cuatro días más se congeló el segundo grupo de hembras (C1). Las hembras del tercer grupo (C2) pasaron por un ciclo de oviposición adicional antes de ser congelado.

Al final todas las hembras congeladas se diseccionaron para extraer bursa y espermatecas, y los tejidos fueron observadas en el microscopio de fluorescencia bajo un filtro de emisión naranja (583nm). Se reportó presencia o ausencia de fluorescencia en bursa y espermatecas.

#### ***2.4 Experimento 2: Uso del esperma***

De la cepa Thai, se aparearon dos grupos de hembras vírgenes con machos vírgenes de manera individual. El primer grupo de 60 hembras (grupo J), se apareo con machos entre 4 y 6 días de edad (jóvenes) y el segundo grupo de 45 hembras (grupo V), con machos de 20 días de edad (viejos). Cada cópula fue observada para asegurar su duración e inmediatamente después las hembras se introdujeron en dos jaulas con machos DsRed jóvenes, teniendo en cuenta el grupo del que provenían. Luego de dos horas, las hembras fueron retiradas de cada jaula, alimentadas con sangre y posteriormente ubicadas de manera individual en tubos con sustrato para oviposición. Pasados dos días se contaron los huevos ovipositados por cada hembra.

Se diseccionaron todas las hembras para revisar presencia o ausencia de fluorescencia en bursa y espermatecas. Los huevos ovipositados por hembras con esperma fluorescente se eclosionaron para revisar el fenotipo de la progenie. La progenie de los machos DsRed tiene ojos que florecen verde;

así que todas las larvas son revisadas en el microscopio de fluorescencia bajo un filtro de emisión verde (507nm).

## ***2.5 Análisis estadístico de resultados***

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software RStudio, Inc (Team, 2020). El análisis exploratorio para conocer la distribución de los datos se realizó con el paquete *riskDistributions* (Schueller, 2017) seguido por los test de hipótesis Shapiro-Wilk y Bartlett. Para todas las pruebas, el alfa fue  $P < 0.05$ . La proporción de hembras inseminadas 1 y 2 veces se compara entre la edad del primer macho que hace la inseminación utilizando la prueba de Chi-cuadrado de Pearson ( $n=202$ ). También, la proporción de larvas proveniente de la primera y segunda cópula es comparada con la edad del primer macho que realiza la inseminación, utilizando la prueba de Chi-cuadrado de Pearson ( $n=4117$ ). Además, para comparar el número de progenie de dos papás diferentes en una misma hembra, se usó el test de Kruskal-Wallis ( $n=124$ ). Para el conteo de huevos del experimento 1 ( $n=75$ ) se realizó un ANOVA y para el experimento 2 ( $n=218$ ) se realizó la prueba de Kruskal-Wallis.

## **3. Resultados**

### ***3.1 Localización del esperma***

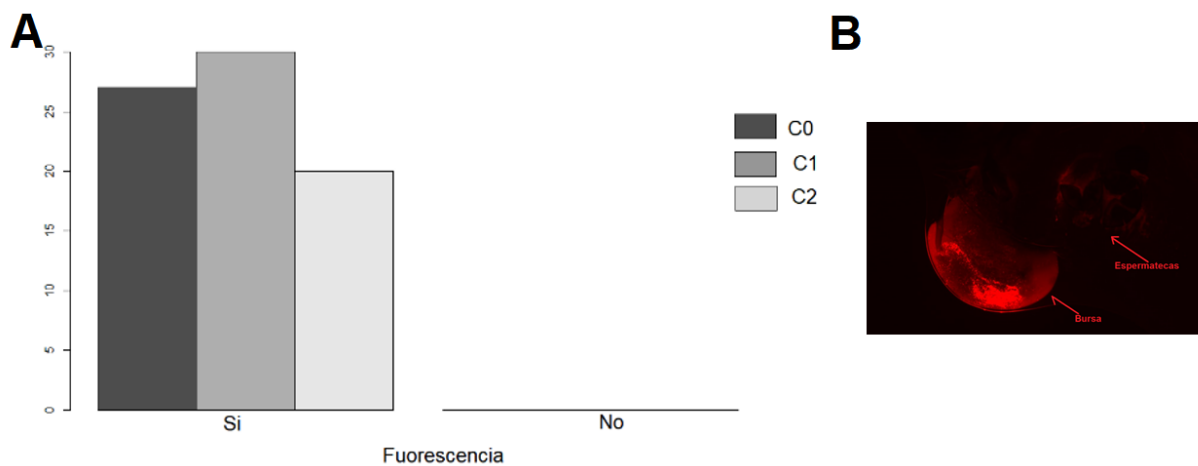
Con el objetivo de determinar la ubicación del esperma en las hembras *Ae. aegypti* después de varios ciclos gonotróficos, se aparearon hembras vírgenes Thai con machos vírgenes DsRed. Las hembras fueron diseccionadas después de cero (grupo control), uno y dos ciclos gonotróficos. La fluorescencia en bursa se evaluó como presencia o ausencia (Figura. 1).

Observamos que el 100% de las hembras en los tres grupos  $C_0$  ( $n=27$ ),  $C_1$  ( $n=30$ ) y  $C_3$  ( $n=20$ ) presentaron fluorescencia en bursa y espermatecas. Así que, hembras con 10 días después de la



cópula y un ciclo de oviposición (C1) y hembras con 15 días después de la cópula y dos ciclos gonotróficos sucesivos (C2), presentaron fluorescencia en bursa y espermatecas al igual que el grupo control (C0) y aunque la señal de la bursa es mucho más notable en la bursa que en las espermatecas (figura 1B), el patrón de señal permanece constante a lo largo de los tres grupos.

En cuanto a los huevos ovipositados por ciclo gonotrófico, no se encontraron diferencias significativas entre en número de huevos ovipositados en el primer ciclo comparado con el número de huevos ovipositados en el segundo ciclo (ANOVA  $df = 1$ ,  $F = 0.129$ ,  $P = 0.72$ ).

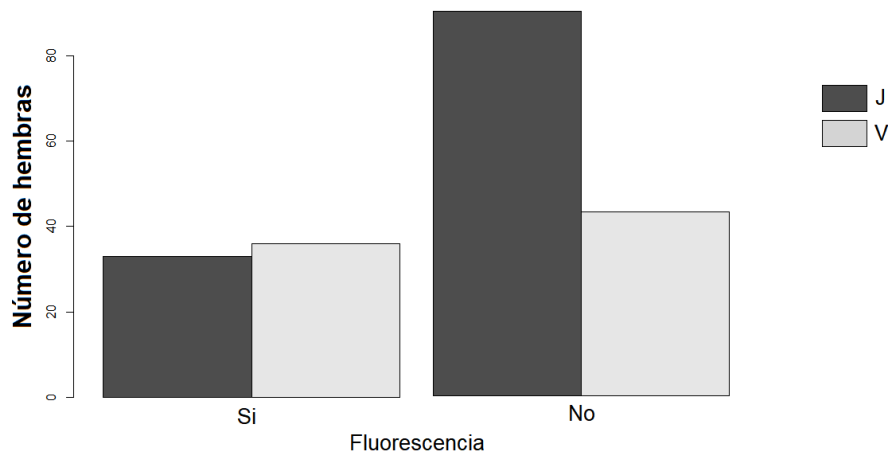


**Figura 1. A. Numero hembras *Ae. aegypti* con señal fluorescente en bursa después de cero ovoposiciones (C<sub>0</sub>), un ciclo gonotrófico (C<sub>1</sub>) y dos ciclos gonotróficos (C<sub>2</sub>). B. Imagen en microscopio fluorescencia de bursa de hembra *Ae. aegypti* inseminada por macho DsRed.**

### 3.2 Uso del esperma

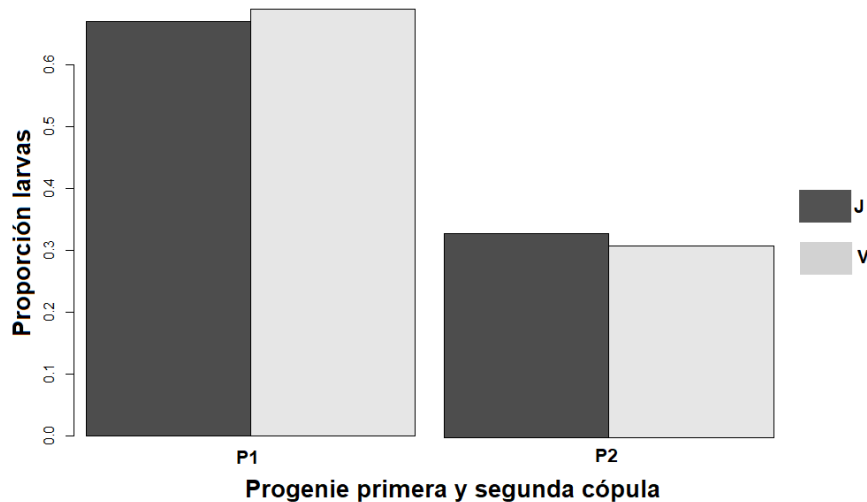
Para determinar si la receptividad de una hembra a una segunda cópula es influenciada por la edad del primer macho que realiza la inseminación, se tomaron mosquitos vírgenes y se apareó un grupo de hembras (4-6 días) con machos jóvenes (4-6 días) (grupo J) y un segundo grupo de hembras (4-6 días), con machos viejos (20 días) (Grupo V). Luego las hembras recién apareadas se cópularon con machos DsRed. El 27% de hembras apareadas inicialmente con un macho joven (grupo J) se

aparearon por segunda vez, mientras que un 46% de hembras apareadas inicialmente con machos viejos (Grupo V) se aparearon nuevamente (figura 2). Observamos una diferencia significativa entre los grupos de hembras apareadas primero con machos jóvenes y hembras apareadas con machos viejos (Chi-cuadrado,  $X^2=7.51$ ,  $df=1$ ,  $P=0,0061$ ) y que hay influencia de la edad del primer macho que insemina, en la receptividad de la hembra para una segunda cópula.



**Figura 2. Número de hembras *Ae. aegypti* con señal de fluorescencia en bursa para los grupos J (apareadas inicialmente con machos jóvenes) y V (apareadas inicialmente con machos viejos).**

Para caracterizar el uso que le dan las hembras *Ae. aegypti* al esperma después de haber sido inseminadas dos veces, revisamos el fenotipo de la progenie de las hembras doblemente inseminadas de los grupos J y V. Para las hembras del Grupo J 67% de los individuos eran progenie del primer macho, mientras que para el grupo V la progenie del primer macho fue de un 69,5% (figura 3). Así pues, no hay diferencia significativa (Chi-cuadrado,  $X^2= 2.82$ ,  $df= 1$ ,  $P=0.093$ ) entre el porcentaje de progenie de los grupos J y V. Lo que indica que la edad del macho no influyó en el uso del esperma que hizo la hembra para la fertilización de los huevos. Sin embargo, el número de individuos de la progenie del primer macho que insemina es significativamente mayor que la del segundo macho (Kruskal-Wallis,  $df=1$ ,  $P<0.05$ ) para ambos grupos.



**Figura 3. Proporción de larvas provenientes de la primera (P1) y segunda cópula (P2) en hembras *Ae. aegypti* para los grupos J y V**

En el conteo de huevos para los grupos J y V no se encontró diferencia significativa en la cantidad de huevos ovipositados por las hembras en ambos grupos (Kruskal-Wallis,  $df=1$ ,  $P = 0,112$ ).

#### **4. Discusión**

Nuestros resultados muestran que el esperma permanece almacenado tanto en la bursa como en espermatecas hasta 15 días después del apareamiento. En contraste con los estudios que afirman que el esperma que no se transfiere a las espermatecas es digerido y absorbido dos días después del apareamiento dentro de la bursa (Oliva et al., 2014).

Adicionalmente observamos que la receptividad de las hembras a una segunda cópula está influenciada por la edad del macho que insemina primero. La cantidad de hembras receptivas a una segunda cópula fue mayor cuando la primera cópula fue con un macho de 20 días de edad. Se sabe que las SFPs juegan el papel central en inducir este cambio en la receptividad femenina (Avila et al., 2011), así que es probable que la calidad de las SFPs disminuya con la edad. También es probable que la concentración de SFPs sea menor con la disminución de esperma, dado que después

de 20 días de edad el número de espermatozoides disminuye en los machos de *Ae. aegypti* (Ponlawat & Harrington, 2007).

Finalmente, la mayoría de hembras doblemente inseminadas usan más espermatozoides del primer macho con el que cópulan para inseminar sus huevos, que, del segundo, independiente de la edad del primer macho, sin embargo, hubo casos también (en menor proporción) donde la hembra prefirió usar más espermatozoides del segundo macho para inseminar sus huevos, que del primero. Además, no todas las hembras doblemente inseminadas tuvieron prole mixta.

Cuando un macho *Ae. aegypti* insemina una hembra, uno de los péptidos que ingresan en el fluido seminal denominado HP-1 (Duvall et al., 2017), permite al macho engendrar todos los hijos de una hembra independiente de si la hembra es inseminada por un macho diferente (Duvall et al., 2017). Hp-1 tiene un receptor específico (NPYLR1) en las hembras *Ae. aegypti* y es detectable entre 10 minutos y 2 horas después del apareamiento (Duvall et al., 2017). Sin embargo, el segundo macho que logra inseminar a la hembra también tiene en su fluido seminal el péptido HP-1. Esto sugiere que el momento específico en que se da la segunda cópula dentro del lapso de 40 minutos donde cesa la receptividad de la hembra (Oliva et al., 2014), sea un factor influyente en el uso que la hembra hace del espermatozoides de los machos que la inseminaron.

En este estudio la cantidad de huevos ovipositados por las hembras no tuvo diferencias con respecto al ciclo gonotrófico ni a una doble inseminación.

## **5. Conclusiones**

El espermatozoides transferido a las hembras se encuentra localizado a lo largo de 15 días en espermatecas y bursa, se hace necesario realizar ensayos con más ciclos de oviposición para saber si hay diferencia.

Las hembras vírgenes apareadas con machos viejos tienen mayor probabilidad de ser inseminadas dos veces dentro de un periodo de dos horas.

No es claro si las hembras doblemente inseminadas escogen el tipo de espermatozoides que van a usar en la inseminación, pero igualmente la proporción de progenie resultante es mayor para el primer macho que insemina la mayoría de las veces.

A futuro sería beneficioso evaluar la progenie de una doble inseminación, después de re-cóplular las hembras en periodos de tiempos diferentes dentro de las primeras dos horas después del primer apareamiento.

## Referencias

- Avila, F. W., Sirot, L. K., LaFlamme, B. A., Rubinstein, C. D., & Wolfner, M. F. (2011). Insect Seminal Fluid Proteins: Identification and Function. *Annual Review of Entomology*, 56(1), 21–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144823>
- Carvalho, D. O., Chuffi, S., Ioshino, R. S., Marques, I. C. S., Fini, R., Costa, M. K., Araújo, H. R. C., Costa-da-Silva, A. L., Kojin, B. B., & Capurro, M. L. (2018). Mosquito pornoscopia: Observation and interruption of *Aedes aegypti* copulation to determine female polyandric event and mixed progeny. *PLOS ONE*, 13(3), e0193164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193164>
- Degner, E. C., & Harrington, L. C. (2016a). Polyandry depends on postmating time interval in the dengue vector *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(4), 780–785. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0893>
- Degner, E. C., & Harrington, L. C. (2016b). A mosquito sperm's journey from male ejaculate to

egg: Mechanisms, molecules, and methods for exploration. In *Molecular Reproduction and Development* (Vol. 83, Issue 10, pp. 897–911). John Wiley and Sons Inc.

<https://doi.org/10.1002/mrd.22653>

Duvall, L. B., Basrur, N. S., Molina, H., McMeniman, C. J., & Vosshall, L. B. (2017). A Peptide Signaling System that Rapidly Enforces Paternity in the *Aedes aegypti* Mosquito. *Current Biology*, 27(23), 3734-3742.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.074>

*Enfermedades transmitidas por vectores*. (n.d.). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>

Gómez García, G. F. (2018). *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) y su importancia en salud humana. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 70(1), 0–0.

Kokoza, V., Ahmed, A., Wimmer, E. A., & Raikhel, A. S. (2001). Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the piggyBac transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12), 1137–1143. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00120-5)

Oliva, C. F., Damiens, D., & Benedict, M. Q. (2014). Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. *Acta Tropica*, 132(1), S12-9. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.021>

Oliva, C. F., Damiens, D., Vreysen, M. J. B., Lemperière, G., & Gilles, J. (2013). Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the sterile insect technique. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078884>

Ponlawat, A., & Harrington, L. C. (2007). Age and Body Size Influence Male Sperm Capacity of the Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 44(3), 422–426. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.3.422>

- Ponlawat, A., & Harrington, L. C. (2009). Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(3), 395–400. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.395>
- Quintero Gil, D. C., Osorio Benítez, J. E., & Martínez-Gutiérrez, M. (2010). Vector competence: Entomological considerations and its implications on the epidemiology of Dengue. *Iatreia*, 23(2), 137–145. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-07932010000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Richardson, J. B., Jameson, S. B., Gloria-Soria, A., Wesson, D. M., & Powell, J. (2015). Evidence of limited polyandry in a natural population of *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1), 189–193. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0718>
- Schueller, N. B. and M. G. and K. T. and K. (2017). *rriskDistributions: Fitting Distributions to Given Data or Known Quantiles* (R package version 2.1.2). <https://cran.r-project.org/package=rriskDistributions>
- Team, R. C. (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Villarreal, C., Fuentes-Maldonado, G., Rodriguez, M. H., & Yuval, B. (1994). Low rates of multiple fertilization in parous *Anopheles albimanus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10(1), 67–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8014629>

