



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Estudio de la producción y función de la proteína Vago en
células de mosquito *Aedes* infectadas con el virus dengue”**

T E S I S

Que presenta

HÉCTOR HUGO VARGAS CALDERÓN

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de Tesis:

Dr. Juan Ernesto Ludert León

México, D.F.

OCTUBRE, 2015

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Zacatenco en el Laboratorio de Virología 3 bajo la dirección del Dr. Juan Ernesto Ludert León. Además se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para el otorgamiento de beca con número de CVU 558317. Además este trabajo fue parcialmente apoyado por un premio de la Fundación Miguel Alemán A. C. otorgado al Dr. Juan E. Ludert.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Sofía Calderón, por su apoyo y su sacrificio.

A Lupita Lozano, por su amor incondicional y por confiar en que podría salir adelante a pesar de las adversidades encontradas en el camino.

A mi director de tesis, Dr. Ludert por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación en este camino de la ciencia.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a mi asesor el Dr. José Luis Rosales Encina por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de este trabajo. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad, paciencia y consejos en materia de biología molecular además de aceptarme en una temporada en su laboratorio. Además de la valiosa ayuda brindada por Lidia, Alondra y Francisco a todo lo relacionado con los ensayos de biología molecular.

Especial reconocimiento merecen mis asesores el Dr. José Luis Rosales Encina, Dr. Fidel de la Cruz Hernández-Hernández y la Dra. Rosa María del Angel Núñez de Cáceres por el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas.

A mis amigos del laboratorio de Virología 3, principalmente a Cinthia (Dra. Le Pilli) por su amistad, risas, ocurrencias, Ana por compartir conmigo sus conocimientos y buen humor, así como por la ayuda técnica en el trabajo de tesis, Salo por su amistad y sus ricos postres.

A mis amigos del Cinvestav, Pau, Vero, Nadia, Christian, Martin, Fer y Mosso.

A mis amigos, Lorena, Adriana, Cindy, Roxana, Norma, Paulina, Monse, Daniel e Israel, que de alguna manera me dieron ánimos y compartieron conmigo esta experiencia.

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1.** Mapa de la distribución geográfica del dengue.
- Figura 2.** Mapa de la distribución global de *A. aegypti*.
- Figura 3.** Mapa de la distribución global de *A. albopictus*.
- Figura 4.** Epidemiología Nacional del dengue.
- Figura 5.** Estructura del virus dengue.
- Figura 6.** Genoma del virus dengue.
- Figura 7.** Ciclo urbano y selvático del virus dengue.
- Figura 8.** Vía de señalización JAK/STAT en artrópodos.
- Figura 9.** Mapa del plásmido de transito pCR4-TOPO.
- Figura 10.** Mapa del plásmido de expresión pRSETA.
- Figura 11.** WB de sobrenadantes de células C6/36 HT infectadas con DENV4
- Figura 12.** Análisis densitométrico de WB en sobrenadante de células C6/36 HT infectadas con DENV4.
- Figura 13.** WB de lisados de células C6/36 HT infectadas con DENV4.
- Figura 14.** Análisis densitométrico de membrana de WB realizado con lisados de células C6/36 HT infectadas con DENV4.
- Figura 15.** Viabilidad de células C6/36HT expuestas a Brefeldina A.
- Figura 16.** Viabilidad de células C6/36HT expuestas a GW4869.
- Figura 17.** Viabilidad de células C6/36HT expuestas a Spiroepoxide.
- Figura 18.** Ensayo de WB del tratamiento con fármacos.
- Figura 19.** Densitometría de WB realizados con tratamientos de fármacos.
- Figura 20.** Alineamiento ClustalW de las secuencias de Vago.
- Figura 21.** Amplicones de Vago obtenidos por PCR a partir de células C6/36HT.
- Figura 22.** BLASTn realizado en NCBI con la secuencia de 493 pb.
- Figura 23.** Secuencias del genoma de *A. aegypti* correspondientes al gen Vago.
- Figura 24.** ClustalW entre las secuencias mRNA de Vago y DNA.
- Figura 25.** Alineamiento ClustalW de las secuencias de aminoácidos de Vago.
- Figura 26.** SignalP. Para la predicción de un péptido señal para la secreción.
- Figura 27.** Secuencia del DNA de Vago de *A. albopictus* reportada en GenBank
- Figura 28.** Probable vía de secreción de la proteína Vago.

ÍNDICE	Página
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES GENERALES	10
Epidemiología	10
Epidemiología en México	12
Estructura del Virus dengue	13
Cuadro clínico	16
ANTECEDENTES PARTICULARES	17
Infección del mosquito vector	17
Respuesta inmunológica del vector a la infección	18
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
METODOLOGÍA	25
Líneas celulares	25
Virus	25
Anticuerpos	25
Cinética de producción de la proteína Vago en células C6/36 HT infectadas	26

Western blot	26
Ensayos de plaqueo	27
Ensayos de viabilidad	28
Fármacos que inhiben la liberación de exosomas y la ruta constitutiva en la secreción de la proteína Vago	28
Brefeldina A	29
GW4869	29
Spiroepoxide	29
Estudio de las vías de secreción de la proteína Vago	30
Diseño de cebadores para clonación	30
Extracción de DNA en células de insecto	31
Extracción de RNA	32
RT-PCR	32
Plásmidos	33
Extracción de DNA a partir de geles de agarosa	34
Reacción de ligación	35
Transformación <i>E.coli</i> DH5-α	35
Purificación de ADN plasmídico (MINIPREP)	35
Purificación de ADN plasmídico (MAXIPREP)	36
Clonación del gen que codifica para la proteína Vago de <i>A. albopictus</i>	37
Secuenciación del gen de Vago de <i>A. albopictus</i>	37
Análisis bioinformático	38
Análisis estadístico	38
RESULTADOS	39

Cinética de producción y secreción de Vago en células C6/36 HT infectadas con DENV	39
Viabilidad de células C6/36 HT tratadas con Brefeldina A, GW4869 y Spiroepoxide	42
Efecto del tratamiento con fármacos en la liberación de Vago en células C6/36 HT infectadas con DENV4	44
Búsqueda de secuencias de Vago de bases de datos	45
Clonación y secuenciación del gen de Vago a partir de células C6/36 HT	46
Extracción de DNA	47
Análisis bioinformático	48
Envío de la secuencia del gen Vago de A. albopictus al GenBank	51
DISCUSIÓN	52
PERSPECTIVAS	58
PÓSTER	59
BIBLIOGRAFIA	60
ANEXO	66

RESUMEN

El dengue es la infección viral transmitida por artrópodos más importante en humanos. El dengue se transmite a través de la picadura de un mosquito hembra de la especie *Aedes* infectado por alguno de los cuatro serotipos (DENV-1, -2, -3, y -4), del género *Flavivirus*. A pesar de que el DENV circula entre su huésped humano y el mosquito vector, la mayor investigación hasta la fecha se ha centrado en la respuesta a la infección por el virus dengue en vertebrados. Los insectos y otros invertebrados carecen de componentes clave de los sistemas inmunes de vertebrados tales como anticuerpos y diversas citocinas, incluyendo interferones (IFNs); pero un gen que se asocia con la respuesta antiviral en los artrópodos es CG2081/Vago. Este gen codifica para una proteína rica en cisteínas que se sobreexpresa y secreta en las células del cuerpo graso, además actúa como un “IFN-like” en *Drosophila* y mosquitos para restringir la replicación viral. Recientemente, Paradkar et al. (2012) describió un aumento de la expresión de la proteína Vago en células de mosquito *Culex* infectados con el Virus del Nilo Occidental y la capacidad de la proteína recombinante Vago para restringir la replicación viral. En este estudio, quisimos evaluar la participación de Vago durante la infección con DENV de células de mosquito del género *Aedes*. Para ello se determinó la cinética de expresión de Vago en la línea celular de *A. albopictus* C6/36 HT infectadas con DENV-4. Por otra parte, ya que se desconoce la vía de secreción de Vago, también se probó el efecto de inhibidores de la liberación de exosomas y de la ruta clásica de secreción de proteína, sobre la secreción de Vago. Los resultados muestran un aumento en la producción y secreción de Vago en células C6/36 HT infectadas con DENV a partir de las 3hpi, sugiriendo que la producción de Vago forma parte de la respuesta anti-viral de las células C6/36 HT a la infección por DENV. La secreción de Vago por células infectadas fue inhibida significativamente por las drogas GW4869 y Spiroepoxide, pero no Brefeldina A, lo cual indica que Vago es secretado por las células de insecto infectadas, vía exosomas. Finalmente, se clonó y secuenció el gen que codifica para la proteína Vago a partir de células de *A. albopictus* y se encontró que el gen de Vago contiene dos intrones, a diferencia reportado para *Culex* donde carece de intrones. La secuencia de Vago generada a partir de *A. albopictus*, fue depositada en GenBank bajo el número 1854585. Estos resultados aportan al entendimiento de la respuesta de las células de insecto a la infección por DENV.

ABSTRACT

Vago is an insect cytokine, which acts similarly to the mammalian type I interferons in response to viral infection. Paradkar et al. [PNAS, 109:18915, 2012] described an increased expression of the protein Vago in mosquito *Culex* sp. cells infected with West Nile Virus (WNV) and a decrease in viral replication when the protein Vago is overexpressed in infected cells. Dengue is the viral disease transmitted by arthropods more important to humans. It is caused by the dengue virus (DENV) and transmitted to humans by *Aedes* sp. mosquitoes. However, the DENV antiviral response in the mosquito vector is not yet fully understood. In this work, we studied the kinetics of expression of Vago in *Aedes albopictus* C6/36 cells infected with DENV-4. The presence of Vago in the cells supernatants was evaluated by Western blot (WB). In agreement with the results reported with WNV and *Culex* sp. cells, a steady increase in Vago production was observed in cells infected with DENV-4 (MOI=3), starting at 3 and up to 24 hpi. The routes of Vago secretion by insect cells are unknown. To explore the secretory route of Vago in C6/36 cells infected with DENV, cells were treated with Brefeldin A to block the classical secretory pathway and with the exosome release inhibitors GW4869 and Spiropoxide. Cells were treated with the different drugs at 6 hpi, using non-cytotoxic concentrations, and the presence of Vago in cell supernatants evaluated at 24 hpi by WB. A significant reduction in the amount of Vago present in the cells supernatants was observed in cells treated with the exosome release inhibitors but not with Brefeldin A. These results suggest that DENV virus infection induces a Vago production response in C6/36 cells and that Vago is released from infected cells using the exosome secretory route.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES GENERALES

Epidemiología

El dengue es la infección viral transmitida por mosquitos más importante en humanos. La OMS informa que 40% de la población mundial está en riesgo de infección por dengue, con un aumento en el número anual de casos (Figura 1). Se estima que más de 50 millones de infecciones se producen cada año, incluyendo 500.000 hospitalizaciones por dengue hemorrágico. El dengue virus es endémico en más de 100 países, en las áreas tropicales y subtropicales del planeta, además de ser la causa principal de enfermedad febril entre los viajeros que regresan de América Latina, el Caribe y el sudeste asiático (Guzmán et al., 2010; WHO, 2014). Los vectores transmisores del virus dengue son los mosquitos hembras del género *Aedes*, especies *aegypti* y *albopictus*, pertenecientes a la familia *Culicidae*. En las Figuras 2 y 3 se muestra la distribución global de los vectores los cuales se caracterizan por preferir zonas con climas cálidos, en los que se generan condiciones ambientales favorables para su reproducción.

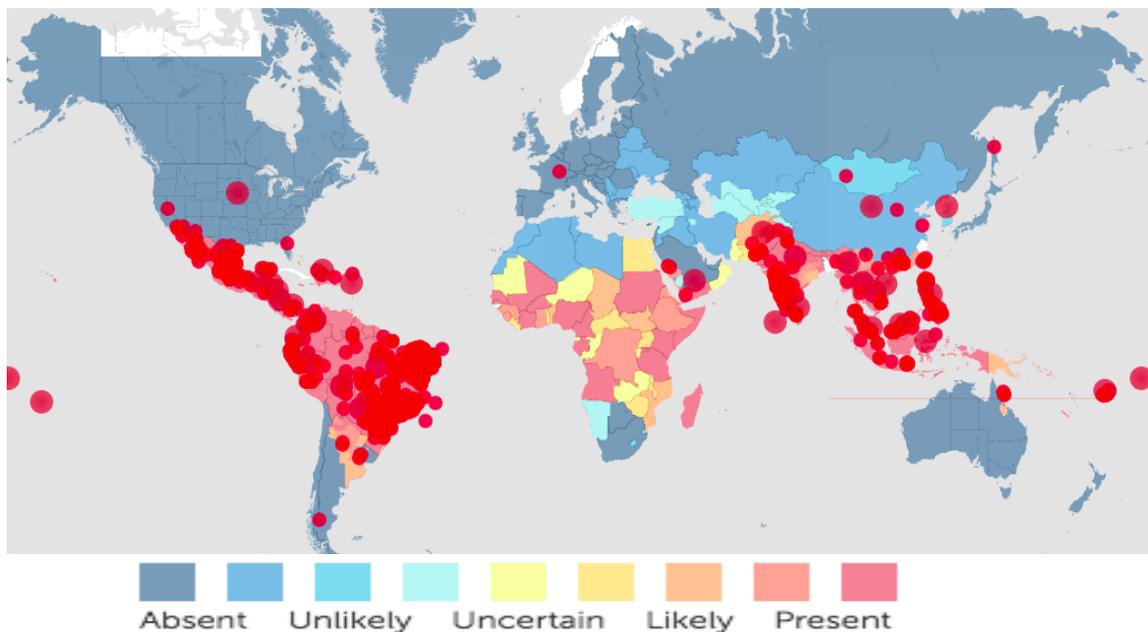


Figura 1. Mapa de la distribución geográfica del dengue. El dengue se encuentra ampliamente distribuido en las zonas tropicales del planeta. Fuente: www.cdc.gov/dengue/

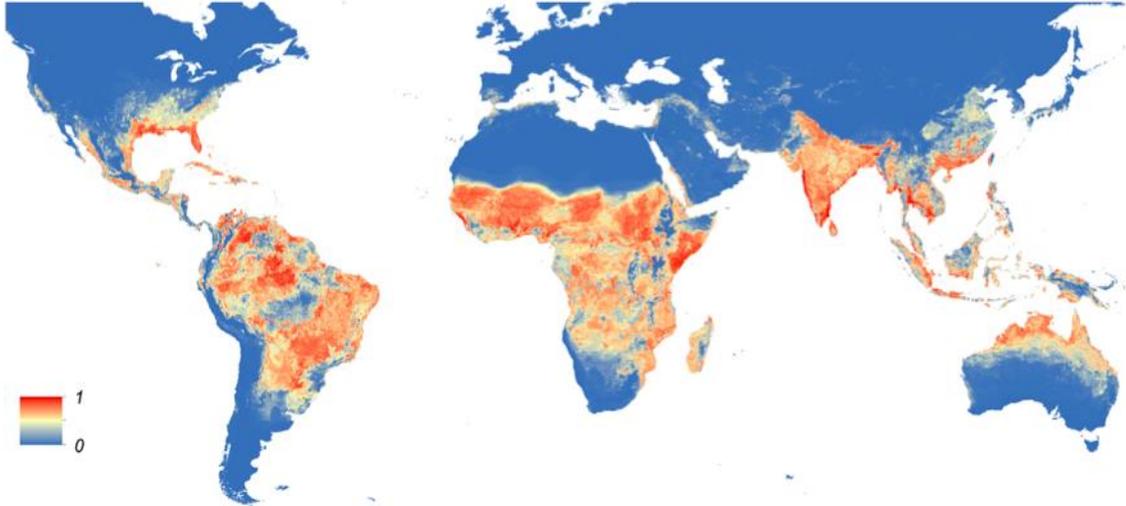


Figura 2. Mapa de la distribución global de *A. aegypti*. El mapa presenta una probabilidad de ocurrencia del vector (0 para azul y 1 para rojo). Fuente: Moritz et al, (2015).

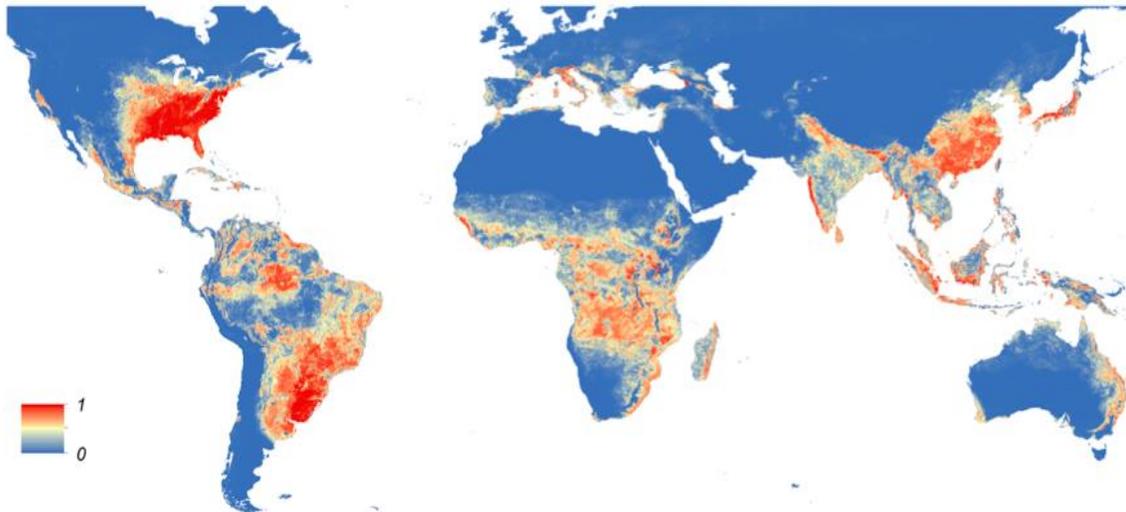


Figura 3. Mapa de la distribución global de *A. albopictus*. El mapa presenta una probabilidad de ocurrencia del vector (0 para azul y 1 para rojo). Fuente: Moritz et al, (2015).

Epidemiología en México

El dengue en México se convirtió en las últimas décadas en uno de los problemas de salud pública más importantes en el país. En el año de 1963, después de una amplia labor, la Organización Panamericana de la Salud declaró la erradicación del vector del dengue del país. Sin embargo, a finales de la década de los setentas el continente sufrió una reinfección con el vector, la enfermedad reapareció y se ha diseminado por las regiones tropicales del territorio nacional. El dengue es considerado la enfermedad reemergente más importante transmitida por mosquitos, además de que las formas hemorrágicas de la enfermedad van en aumento, en la actualidad encontramos los cuatro serotipos y en algunas entidades hay evidencia de la circulación simultánea de dos o más (Becker et al., 2014).

En México la enfermedad está presente en 29 de los 31 estados donde residen más de 50 millones de personas y se localizan grandes ciudades, centros agrícolas, ganaderos, industriales, pesqueros, petroleros y los sitios turísticos más importantes del país, por lo que el aumento en el número de casos va a la alza. Los factores que han ayudado a una mayor diseminación del dengue son el aumento de la población, una explosión demográfica en zonas donde habita el mosquito *Aedes*, un aumento en el turismo a las zonas endémicas y lugares donde se almacena agua y como cubetas, tinacos y llantas, entre otros, que representan una fuente de reproducción del mosquito *Aedes*. (Fajardo et al., 2012).

Hasta la semana 27 del 2015 en México se reportaron 7136 casos de dengue, de los cuales 5728 corresponden a fiebre por dengue y 1408 a fiebre hemorrágica por dengue, de los cuales 11 llegaron a la pérdida de la vida del paciente. (Figura 4).

INDICADOR	2014		2015
	CIERRE@	SEMANA*	SEMANA**
Casos de Fiebre por Dengue	23,432	4,941	5,728
Casos de Fiebre Hemorrágica por Dengue	8,668	2,094	1,408
Total de casos Dengue	32,100	7,035	7,136
Defunciones por Fiebre Hemorrágica por Dengue	76	26	11
Letalidad***	0.88	1.24	0.78

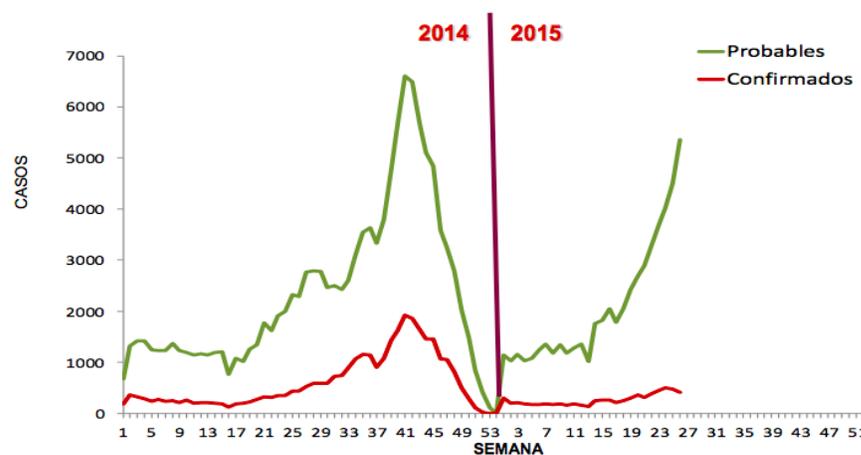


Figura 4. Epidemiología Nacional del dengue. **Información al 20 de julio de 2015. *Información al 8 de septiembre de 2014. **Información al 7 de septiembre de 2015. ***Por 100 casos. @ preliminar.

Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue.

Estructura del Virus dengue

El DENV pertenece a la familia *Flaviviridae* que incluye además los virus de la fiebre amarilla (YFV), West Nile Virus (WNV) y el Virus de la encefalitis japonesa (JEV), entre otros de importancia en salud pública y veterinaria (Murrell et al., 2011). DENV es un virus de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva de aproximadamente 10.7Kb de largo. Los flavivirus son envueltos, son

esféricos, de alrededor de 40 a 60nm de diámetro y la nucleocápside presenta simetría icosaédrica (Figura 5) (Smit, 2011).

El virus tiene tres proteínas estructurales que se producen en cantidades estequiométricas para la formación de la partícula: la proteína del núcleo o cápside (C, 100 aminoácidos), la de la membrana (M, 75 aminoácidos), y la envoltura (E, 495 aminoácidos), la cual participa en el proceso de fusión de membranas (Kuhn, 2002).

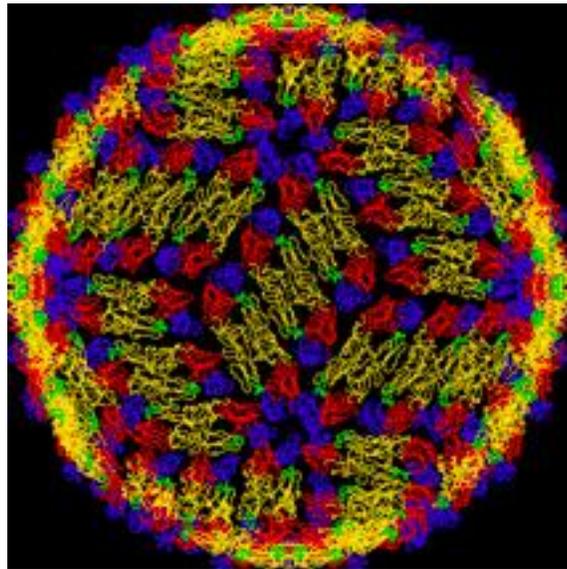


Figura 5. Estructura del virus dengue. Se muestran los dominios I, II y III de la proteína E con los colores rojo, amarillo y azul, respectivamente. Los cambios estructurales iniciales en la proteína E inducidos por la exposición al bajo pH es un movimiento alrededor de una región tipo bisagra que separa los dominios I y II, lo cual expone el péptido de fusión interno, se muestra en verde. Fuente: Kuhn et al., (2002).

En el virión la proteína C se asocia con el RNA viral y las proteínas E y prM se asocian a la envoltura lipídica; es por esto que, cuando el DENV entra e infecta el huésped, el primer contacto con el huésped lo hacen las proteínas E y prM. Por esta razón, los principales objetivos de la respuesta inmune en individuos infectados con DENV son la proteína la E y la prM (Cedillo et al., 2014).

El genoma del DENV tiene un solo marco de lectura abierto, flanqueado por regiones no traducidas (UTRs), en ambos extremos 5' y 3' con una longitud de aproximadamente 100 y 600 nucleótidos respectivamente. El ARNm viral codifica un precursor de poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, el cual se procesa cotraduccionalmente, por proteasas virales y celulares. Esta poliproteína precursora se escinde para generar 10 proteínas, que incluyen las 3 proteínas estructurales: la nucleocápside o proteína núcleo (C), una proteína asociada a la membrana (M), una proteína de la envoltura (E) y 7 proteínas no estructurales NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5, estas últimas responsables de la replicación viral y diversas funciones celulares (Idrees, 2012). (Figura 6).

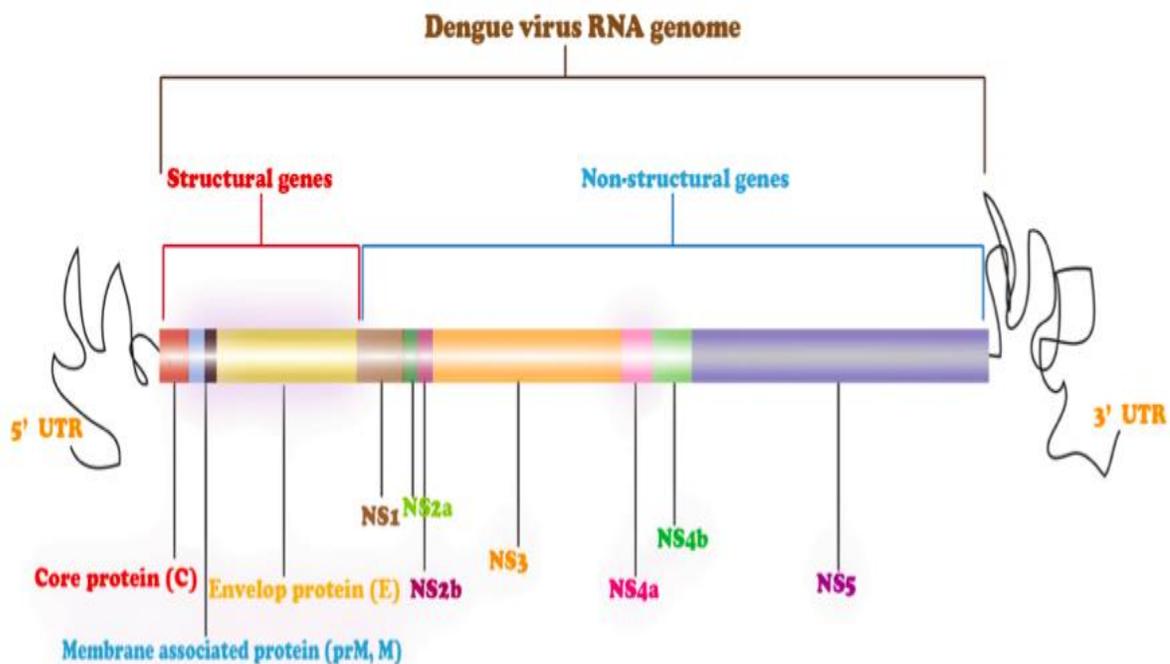


Figura 6. Genoma del virus dengue. Codifica 10 proteínas virales incluyendo 3 proteínas estructurales (C, M y E) responsables de la estructura viral y la unión del virus a la célula huésped y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que están implicados en la replicación viral y otras funciones celulares. Obtenida de Ashfaq et al., 2012.

Cuadro clínico

El DENV es transmitido por la picadura de mosquitos *Aedes aegypti* o *Ae. albopictus* infectados por alguno de los 4 serotipos virus del dengue (DENV-1, -2, -3 y -4), las cuales muestran una homología de secuencia de 65-70%. La enfermedad se produce en las zonas tropicales y subtropicales del mundo pero el área de distribución geográfica de los mosquitos vectores continúa expandiéndose. (Figuras 2 y 3) (Moritz et al., 2015; Green et al., 2014).

El espectro clínico de la enfermedad incluye desde cuadros asintomáticos hasta las formas severas y hemorrágicas con signos y síntomas específicos para cada estado clínico. Debido a que la infección con alguno de los 4 serotipos que no confieren protección cruzada contra los otros serotipos, las personas pueden sufrir infecciones secundarias. El DENV provoca dos tipos de infecciones, Fiebre por Dengue (FD) y Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD), esta última se caracteriza por la permeabilidad vascular repentina asociada a citocinas liberadas por células T y otras células del sistema inmune. El tratamiento de la enfermedad producida por el virus dengue es únicamente de apoyo basado en el control de los síntomas. Los cuatro serotipos causan tanto fiebre por dengue, como la fiebre hemorrágica por dengue. Hasta la fecha, no existe una vacuna profiláctica con licencia y no hay medicamentos antivirales específicos disponibles (Sam et al., 2013).

Tras la infección primaria con DENV, hay un período de incubación promedio de 4-7 días. En este momento, el virus se replica en las células dendríticas en estrecha proximidad a la picadura y también puede infectar macrófagos y linfocitos, y finalmente llega al torrente sanguíneo, donde se convierte en infección sistémica (Wu et al., 2000).

ANTECEDENTES PARTICULARES

Infeción del mosquito vector

Para que se lleve a cabo la transmisión del DENV del humano infectado hacia el mosquito se necesita de una serie de factores que garanticen el éxito del ciclo. La hembra del mosquito *Aedes* se alimenta con sangre de una persona previamente infectada con DENV, cuando sucede la picadura el virus viaja hasta el intestino medio del mosquito y se une a la superficie del epitelio del intestino medio. Si el virus es capaz de infectar con éxito a las células del epitelio del intestino medio y replicarse dentro, entonces la progenie viral se libera al hemocele (la cavidad en la que circula la hemolinfa, parte del sistema circulatorio abierto de invertebrados), donde posteriormente se puede difundir e infectar los tejidos secundarios, incluyendo las glándulas salivales, que es el principal sitio de replicación viral en el mosquito. Una vez que la replicación del virus se ha producido eficientemente en las glándulas salivales, en la siguiente picadura a un humano sano, el virus puede ser transmitido a través de la saliva del mosquito infectado (Figura 7). Existe evidencia que muestra que la saliva de los mosquitos actúa como agente facilitador de la infección en el huésped vertebrado. Así la actividad de serina proteasas presentes en la saliva favorece de manera significativa la infectividad del virus ya que degradan la matriz extracelular, aumentando así la unión del virus a sus receptores como el heparán sulfato, entre otras moléculas. (Carrington et al., 2014; Conway et al., 2014).

Aunque *Aedes aegypti* se considera generalmente el vector primario de DENV, *Aedes albopictus* ha sido implicado como el principal vector de DENV durante algunos brotes de enfermedades. Hace unos años se determinó que *Ae. albopictus* no solo se encontraba en Asia, sino que se le ha localizado en algunas zonas del continente Americano y en la zona norte de México.

(Metselaar, et al. 1980; Moritz et al., 2015). Un meta-análisis de 14 estudios sobre la susceptibilidad relativa de *A. albopictus* y *A. aegypti* sugiere que *A. albopictus* es más susceptible a las infecciones del intestino medio que el *A. aegypti*; sin embargo, la capacidad del virus para replicar en este último mosquito es mayor, lo que sugiere un mayor potencial para la transmisión en la naturaleza (Lambrechts et al., 2010).

Además de la transmisión vectorial horizontal del virus mediante la picadura del mosquito a una persona infectada y de ahí a una persona susceptible, se ha confirmado también la transmisión vertical de mosquitos infectados a sus descendientes, igualmente en el huésped vertebrado se han reportado casos de transmisión de la madre al feto (Arunachalam et al., 2008; Chye et al., 2007).

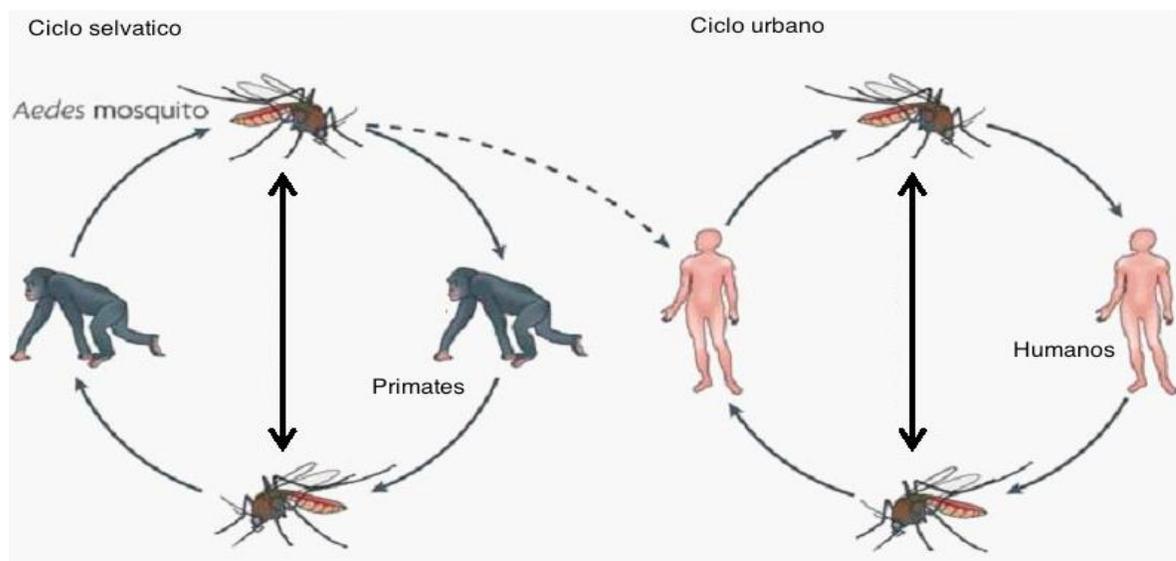


Figura 7. Ciclo urbano y selvático del virus dengue. Extraído de Whitehead et al. (2007)

Respuesta inmunológica del vector a la infección

Los mosquitos usan el el RNA de interferencia (RNAi) como su principal defensa contra las infecciones virales (Brackney et al., 2010; Rennos et al., 2009) los insectos y otros invertebrados se cree que carecen de componentes

clave de los sistemas inmunes innatos y adaptativos de vertebrados, tales como citocinas, incluyendo interferones (IFNs), receptores del MHC o anticuerpos (Randall et al., 2008). Sin embargo, la vía JAK-STAT se encuentra evolutivamente conservada en insectos. Ello indica que la respuesta tipo IFN de los mamíferos, también se induce por infecciones virales en los insectos y que la depleción de alguno de los componentes de la vía, daría como resultado una mayor susceptibilidad a la infección por virus (Souza et al., 2009).

Un estudio reciente mostró que en *D. melanogaster* la DExD/H-box RNA helicasa Dicer-2 (Dcr-2) que juega un papel crucial en la vía del RNAi, también puede mediar la inducción de genes antivirales (Ferrandon et al., 2007). Usando una combinación de herramientas de análisis de secuencia, se identificó una nueva familia de genes que codifican para proteínas cortas en *Drosophila melanogaster*, que poseen similitud al dominio SVC (Single Von Willebrand factor C domain, por sus siglas en inglés). Uno de los genes de esta familia, el gen CG2081, también conocido como Vago, codifica para una proteína de 18 kDa, rica en cisteínas y con un dominio Von Willebrand factor tipo C (VWC), el cual se encuentra sólo en proteínas de los artrópodos.

En ese estudio se evidenció además que el producto del gen Vago se sobreexpresa y controla la carga viral en el cuerpo graso luego de una infección con el virus C de *Drosophila* (Deddouche et al., 2008). Vago no sólo se activa en respuesta a la infección por virus sino que también se encontró que el gen se sobreexpresa en respuesta a la inanición en los artrópodos. Estos datos sugiere que la proteína Vago se sobreexpresa en respuesta a situaciones de estrés, lo cual incluye infecciones virales (Sheldon et al., 2007).

Recientemente, Paradkar et al. (2012) reportaron que células Hsu de *Culex* infectadas con el Virus del Oeste del Nilo (WNV) sobreexpresan Vago y la secretan al sobrenadante celular. Más aún, el tratamiento de estas células con la proteína Vago recombinante, antes de la infección, pero no después, limita

significativamente la replicación de WNV en estas células. La proteína Vago, por lo tanto, parece funcionar como una citocina que actúa de manera similar a los interferones de mamíferos, siendo capaz de activar la vía de JAK/STAT en artrópodos y establecer un estado antiviral. La figura 8 muestra un diagrama en cuyo panel A se presenta la activación clásica de la vía JAK-STAT en los artrópodos y en el panel B se muestra lo que se conoce hasta el momento de las vías de inducción y de acción de la proteína Vago, incluyendo aspectos desconocidos como la vía de señalización dependiente de Dcr-2, su vía de secreción y su receptor (Paradkar et al., 2012).

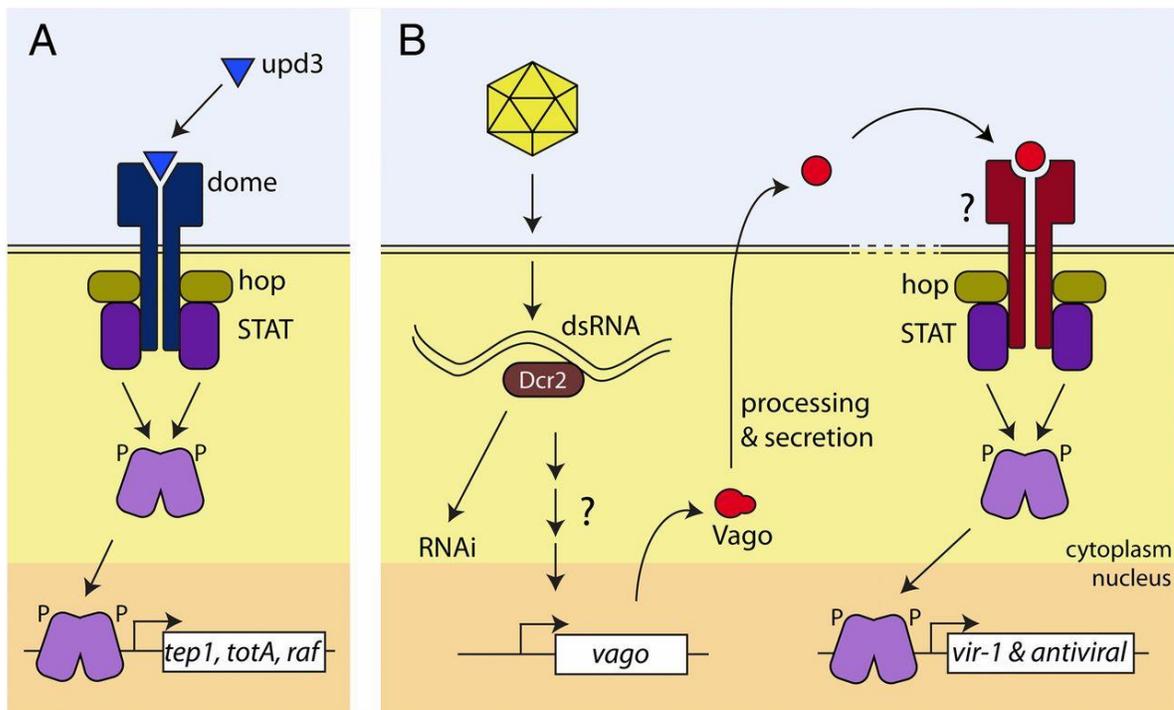


Figura 8. (A). Vía de señalización JAK/STAT en artrópodos. (B). Inducción de la proteína Vago dependiente de Dicer2, ésta proteína se une al dsRNA viral y a través de un mecanismo desconocido activa la expresión de Vago. Procesada y secretada (vía desconocida de secreción) Vago se une a un receptor celular desconocido, lo que resulta en la activación de la vía Jak-STAT y la expresión de *vir-1* y los genes antivirales aún no caracterizados. Extraído de Kingsolver, et al. (2012).

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, la incidencia de dengue en áreas tropicales y subtropicales ha crecido de forma importante, convirtiendo a esta enfermedad en un problema de salud global pero, hasta la fecha, no existen vacunas ni tratamientos antivirales específicos. Su agente etiológico, el DENV, se transmite a los humanos a través de mosquitos *Aedes* infectados. El estudio de la inmunidad del vector para el control de la replicación viral y la identificación de actividades antivirales inhibitorias y moléculas efectoras es de suma importancia ya que abre alternativas para el control de esta enfermedad desde el vector.

HIPÓTESIS

La infección con DENV de células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 HT, induce la síntesis y secreción de la proteína Vago, la cual, a su vez, es capaz de activar vías que restringen la replicación viral. Vago se secreta por un mecanismo desconocido hasta ahora, el uso de drogas que inhiben selectivamente mecanismos de secreción de proteínas (Brefeldina A, GW4869 y Spiroepoxide) permitirán conocer la ruta de secreción de Vago en células C6/36 HT.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A la fecha no se conocen los mecanismos de la respuesta a la infección por DENV en el mosquito *Aedes*, la proteína Vago como “INF-like” presumiblemente restringe la replicación viral en las células de artrópodos, actuando de manera similar que en los mamíferos al activar la vía de señalización JAK/STAT y desencadenando una respuesta de genes en respuesta a la infección que restringen la replicación viral en el mosquito.

Hasta el momento solo se ha determinado que los mosquitos poseen únicamente una respuesta inmune innata a las infecciones y que la respuesta rápida de esta es crucial para el éxito al combate de los agentes patógenos; sin embargo, el papel de la proteína Vago como supuesto interferon antiviral, abre nuevas líneas de investigación y el entendimiento de esta proteína y su respuesta antiviral propone una vía alterna para bloquear el ciclo del DENV desde el vector.

Actualmente los estudios realizados con Vago se imitan con West Nile Virus en células Hsu de *Culex*, donde demuestran su actividad como interferón al restringir la replicación viral a tiempos tempranos, y dado que la vía de secreción de esta proteína es desconocida y en este trabajo se usaron, fármacos que bloquean las vías de secreción para elucidar la ruta que sigue la proteína para su exportación. Así como el comportamiento en la cinética de expresión de Vago ante la infección con DENV.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la cinética de producción, rutas de secreción y función de la proteína Vago en células C6/36 infectadas con DENV

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Analizar la cinética de producción y secreción de la proteína Vago en células C6/36 infectadas con DENV.
- 2.- Determinar el efecto de fármacos que inhiben la liberación de exosomas y la ruta constitutiva en la secreción de la proteína Vago.
- 3.- Evaluar la actividad antiviral de la proteína Vago recombinante sobre la replicación de DENV en células de mosquito.

METODOLOGÍA

Líneas celulares. En todos los experimentos se utilizó la línea celular C6/36, clone HT (High Temperature - células adaptadas para su desarrollo a 34°C), de origen larvario del mosquito *Aedes albopictus*; crecidas en medio de cultivo E-MEM (Minimum Essential Medium Eagle) suplementado con aminoácidos no esenciales, antibióticos y antimicóticos (penicilina y estreptomina) y suero fetal bovino (SFB) al 10%.

Virus. La cepa viral de dengue utilizada es del serotipo 4 (cepa H-241), la cual se mantiene mediante la replicación en cerebros de ratones neonatos no sexados de 2-3 días de nacidos (ICR CD-1), según protocolo estándar (Gould et al., 1985). Para la propagación el DENV-4 se inoculó por vía intracerebral con jeringa de insulina de 31G x 6mm, se revisaron los ratones se revisaron diariamente hasta notar los signos característicos de la infección como son ataxia movimiento lento y parálisis. Los ratones se sacrificaron por congelamiento a -70°C, se procesan y se recupera el cerebro 5 días después de la inoculación para la propagación viral, se purificó el virus mediante ciclos constantes de centrifugación (4 ciclos de 30 min a 14 000RPM) y se esterilizan por filtración a través de una membrana PVDF (0.22 µM). Finalmente, el virus se tituló mediante ensayo de plaqueo en células BHK-21 (derivadas de fibroblastos de riñón de hámster bebé).

Anticuerpos. Para los ensayos de Western blot se utilizó un anticuerpo anti-Vago primario policlonal hecho en conejo y proporcionado amablemente por el Dr. Peter J. Walker del CSIRO Animal, Food and Health Sciences, Australian Animal Health Laboratory, Geelong, Australia. Como controles de carga se detectaron las proteínas GAPDH o actina utilizando anticuerpos primarios anti-GAPDH (Millipore MAB374) hechos en ratón, a una dilución 1:2000 y anti-β Actina hechos en ratón. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-

conejo IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) y anti-ratón IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology).

Cinética de producción de la proteína Vago en células C6/36 HT infectadas

Para este ensayo se inocularon células C6/36 HT a una MOI de 3 con DENV4, por 1 h a 34 °C y los sobrenadantes se colectaran a las 3h, 6h, 12h y 24hpi. En cultivos similares se lisaron células utilizando un buffer de lisis (TRIS-HCl 50mM, NaCl 120mM, IGEPAL 0.5%, NaF 100mM, NaVO₃ 200µM, pH 8.0) adicionado con inhibidor de proteasas (Roche). Tanto los sobrenadantes como los lisados celulares se almacenaron a -20°C hasta que fueron utilizados para la determinación de los niveles de Vago por Western blot. Como controles se usaron células sin infectar, expuestas a extractos de cerebro de ratón no infectados y tratados de manera idéntica a las células infectadas.

Ensayo de Western blot. La detección de la proteína Vago en sobrenadantes y lisados se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot. La determinación de la concentración de proteínas en los sobrenadantes y lisados se realizó por el método de Bradford, se ajustaron los volúmenes para cargar 30µg de proteína por pozo de cada muestra para su análisis. Para los lisados se utilizó la detección de la proteína GAPDH como control de carga.

Electroforesis. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 12% de 1.0mm de espesor. Los geles se corrieron a un voltaje de 90 volts durante aproximadamente 120 min. Para la electroforesis se utilizaron 3µL de marcador de peso molecular Flash Protein Ladder (Gel Company FPL-006).

Transferencia. Una vez separadas las proteínas de acuerdo a su peso molecular en el gel de poliacrilamida, se procedió a transferirlas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), la cual requiere un pretratamiento con metanol para activar la membrana. La transferencia se realizó en cámara húmeda (BioRad), con aditamento especial para la

transferencia y se llevó a cabo durante 60 minutos a 90 volts.

Bloqueo de la membrana. El bloqueo de sitios inespecíficos para el anticuerpo en la membrana, se llevó a cabo con una solución de TBS Tween (0.05M TBS, 0.05% Tween 20, pH 9.0) con leche descremada al 5%, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante.

Detección de la proteína Vago. Se utilizó el anticuerpo primario anti-Vago a una dilución 1:1000 disuelto en TBS-Tween (0.05M TBS, 0.05% Tween 20, pH 9.0) con 0.5% de leche descremada. Las incubaciones con el anticuerpo primario se hicieron a 4°C durante toda la noche. Una vez terminado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de la membrana con TBS-Tween (0.05M TBS, 0.05% Tween 20, pH 9.0) de 15 minutos cada uno, y se incubó nuevamente la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente con una solución que contenía al anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) picante (GeneTex, GTX26721- Rabbit IgG antibody) a una dilución de 1:15 000 en TBS-Tween y 5% de leche descremada. Transcurrido el tiempo se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno con TBS-Tween (0.05M TBS, 0.05% Tween 20, pH 9.0).

Revelado. Para el revelado se utilizó el reactivo comercial SuperSignal West Pico Trial Kit® (Thermo Scientific 34079), del cual se utilizaron 400uL de cada uno de los reactivos A y B, cubriendo la membrana y exponiéndola durante 5 minutos a la mezcla. Se utilizó un equipo de LiCor® C-DiGit® Blot Scanner (P/N 3600-00) para el revelado de la membrana una vez expuesta a la mezcla reactiva. El procesamiento de imágenes obtenidas y el análisis de densitometría se realizó mediante el software ImageStudioLite® para Mac OS X.

Ensayos de plaqueo. Los ensayos de plaqueo se llevaron a cabo como una versión modificada del ensayo descrito por De Madrid et al. (1969). Brevemente, se inocularon monocapas confluentes de células BHK-21 crecidas en placas de 24 pozos, con diluciones seriadas (10^x) de la suspensión viral de DENV-4 replicado en cerebros de ratón. Las células se incubaron 1 hora a 37°C

con las diluciones virales, se retiró el inóculo y se colocó medio de mantenimiento y las placas se incuban durante 5 días a 37°C. Para impedir que las partículas virales se liberen hacia el medio o difundan e inicien placas separadas en otras células se incorpora carboximetilcelulosa (3%) al medio. Transcurrido ese tiempo, las células se fijaron con p-formaldehído (1%) durante 30 minutos y se tiñeron con cristal violeta (3%), para visualizar las calvas o placas. El título viral se determinó contando el número de placas visibles en determinada dilución y se expresó en unidades formadoras de placa (UFP)/mL.

Ensayo de viabilidad. Para la viabilidad celular de la línea celular C6/36 HT expuesta a las diferentes concentraciones de los fármacos Brefeldina A, GW4869 y Spiroepoxide, fue determinadas con el estuche comercial CellTiter96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega G3580). Este es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad y se llevó a cabo según el protocolo del proveedor. El reactivo contiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] y un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina; PES). El compuesto de tetrazolio MTS (reactivo de Owen) es biorreducido por las células viables que lo convierten en formazán, un producto coloreado que es soluble. La solución acuosa de reactivos se coloca directamente en los pozos de cultivo, durante 1 hora y después se mide la absorbancia a 490 nm con un lector de placas de ELISA de 96 pozos. La cantidad de formazán, medido a una absorbancia de 490 nm es directamente proporcional al número de células viables en cultivo. Como control de 100% de viabilidad se utilizan células sin ningún tratamiento donde únicamente se agrega medio E-MEM en la misma proporción que en los pozos problema.

Fármacos que inhiben la liberación de exosomas y la ruta constitutiva en la secreción de la proteína Vago.

Para la determinación de la vía de secreción se utilizaron tres fármacos, cuyas principales características se describen a continuación:

Brefeldina A. Brefeldina A (BFA) es un metabolito producido por el hongo *Eupenicillium brefeldianum* que exhibe un amplio espectro como antibiótico y se utiliza para el estudio del transporte intracelular de proteínas. BFA es un inhibidor del tráfico de endomembranas, capaz de inhibir el tráfico del retículo endoplasmático hacia Golgi y bloquea la secreción de proteínas del Golgi, a través de las vías clásicas, específicamente bloquea la proteína ARF (factor de ADP-ribosilación) que es el responsable de la asociación de proteína de la cubierta a la membrana de Golgi (Miller et al., 1992).

GW4869. El GW4869 (N,N-bis[4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]-3,3-phenylene-bis-acrylamide dihydrochloride), es un inhibidor específico de la esfingomielinasa neutra (N-SMasa), el nombre de neutra por el pH óptimo en el que ejerce su acción, pertenece a una familia de enzimas encargadas de la transformación de la esfingomielina a ceramida, presentes en células eucariotas (donde se encuentra unida a la membrana), Uno de los efectos de la ceramida es el facilitar la generación puntual de fases no lamelares que estarían relacionadas con procesos de gemación y fusión de membranas, principalmente en la formación de exosomas. En un estudio reciente se determinó que los exosomas son ricos en ceramidas y que la inhibición de la esfingomielinasa neutra, se ve reflejada en una disminución en la formación de exosomas (Trajkovic, et al. 2008).

Spiroepoxide. Es un inhibidor irreversible y selectivo de esfingomielinasa neutra (N-SMasa). Su mecanismo de acción es desconocido aunque posee actividad similar al GW4869 (Trajkovic, et al. 2008).

Estudio de las vías de secreción de la proteína Vago. Las rutas de secreción se estudiaron mediante el uso de Brefeldina A, GW4869 y Spiroepoxide que bloquean las vías de secreción clásica y exosomal respectivamente. Monocapas de células C6/36 HT a confluencia se infectaron con DENV-4 a una MOI=3 por 1h a 34°C, luego de lavar el inóculo, se les agregó el medio de mantenimiento que contenía las drogas Brefeldina A [7µg/µL], GW4869 [30µM] y Spiroepoxide [20µM]. Estas concentraciones de las drogas comprobaron ser no tóxicas en los ensayos de viabilidad. Luego de 12 hpi se recuperaron los sobrenadantes y posteriormente mediante la técnica de Western blot se determinó la cantidad de proteína Vago en el medio. Las cantidades de sobrenadante a analizar por Western blot se ajustaron a la concentración de proteínas medidas por ensayo de Bradford.

Diseño de cebadores para clonación. Para la amplificación y clonación del gen de Vago de *A. aegypti* y *A. albopictus* se diseñaron cebadores específicos. La secuencia del ARNm de Vago en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, se identificaron mediante la base de datos VectorBase. Se encontró un solo gen de Vago en *A. aegypti* y 4 isoformas del gen Vago en *A. albopictus*. En base a la secuencia se diseñaron los Primers específicos para detección en PCR punto final. Los cebadores diseñados se les añadió la secuencia de las enzimas de restricción HindIII para el “Forward (F)” y BamHI para el “Reverse (R)”. (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño de cebadores para la clonación de Vago y sus diferentes isoformas en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

Gen blanco	Secuencias de los cebadores diseñados
>Vago <i>Aedes aegypti</i>	Forward 5'-AAGTTTTAATGATAACTCACTTTTCCATCGTG-3' Reverse 5'-GGATCCATGAAGGCATTTGCAGTGAGTTTC-3'
> Vago 066671 y >Vago 066670 <i>Aedes albopictus</i>	Forward 5'-GGATCCATGAGGACGTTGGCTGTA-3' Reverse 5'-AAGCTTTCAATGATAGCTCACTTTCCC-3'
>Vago 034893 y >Vago 066669 <i>Aedes albopictus</i>	Forward 5'-GGATCCATGAAGGCATTTGCAGTGA-3' Reverse 5'-AAGCTTTCAAATATAATTAATTCTCCATTGCG-3'

Los cebadores correspondientes a los genes 066671 y 066670 son idénticos, lo mismo para 066669 y 034893; a partir de aquí los pares de cebadores serán llamados R70 para los primeros genes y R93 para los últimos pares de genes, así como HindIII para los cebadores correspondientes a *A. aegypti*.

Extracción de DNA en células de mosquito. Para la extracción de DNA a partir de lisado de células C6/36 HT y Aag2 se siguió el protocolo modificado de Arteaga et al. (2000). Brevemente, en un frasco P75 se crecieron células C6/36 HT a confluencia en medio de cultivo E-MEM. Se retiró el medio de mantenimiento y se realizó un lavado con PBS (cloruro de potasio 2,7 mM, cloruro de sodio 137 mM, y fosfato de potasio 1.76mM. pH 7,4) estéril. Posteriormente se despegaron las células con un raspador para recoger células, se resuspendieron en 3mL de PBS estéril, se colocaron en dos microtubos de 1.5mL. y finalmente se centrifugaron a 4°C durante 10min a 4000 rpm. El botón celular fue recuperado y puesto en un mortero donde fue congelado con nitrógeno líquido. Se molió el botón con un pistilo hasta obtener

polvo. El polvo fue transferido a un tubo cónico de 15mL y resuspendido en buffer de lisis (Tis-HCl 200mM (pH 8.5), NaCl 200mM, SDS 0.5%, EDTA 25mM y Proteínasa K (Thermo-Fisher, 25530-049) 1mg/mL) y se incubó a 65°C durante 30 minutos en baño de agua. Posteriormente el microtubo fue centrifugado a 2900 x g por 5 min para descartar residuos en el fondo del tubo. Se recuperó el sobrenadante en un microtubo de 1.5mL y por cada mL se agregó 0.5mL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1 por volumen) y se centrifugó a 8200 x g por 10 min. La fase acuosa se recuperó y se le realizó una extracción con fenol-cloroformo (1:1). Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con 45µL de acetato de amonio 5M y 0.9 mL de etanol absoluto frío para precipitar el DNA incubando a -20°C durante 2h. El precipitado obtenido se centrifugó a 11800 x g por 15 minutos a 4°C. El botón se lavó con etanol al 70%, resuspendido en 50µL de agua desionizada y se incubó con 5µL de RNasa T1 (Thermo. EN0541) a 37°C por 1h.

Extracción de RNA de células C6/36 HT. El RNA total se extrajo a partir de lisado de células C6/36 HT utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen 155596-018) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La solución final fue tratada con DNasa y para la cuantificación del RNA total se colocaron 2µL de muestra en Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), y se realizó la lectura. La pureza e integridad del RNA se comprobó por electroforesis en 1,0% (w/v) geles de agarosa.

RT-PCR. Para la obtención del DNA complementario (cDNA), a partir de RNA se realizó una reacción estándar de transcripción inversa usando Improm-II Reverse Transcription System (Promega, A3800) y cebadores aleatorios. Una vez obtenido el cDNA, se amplificó en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el protocolo del fabricante *Taq* DNA polymerase Native (Invitrogen 18038-018) y una mezcla de los cebadores específicos para cada gen Vago. Tanto la retrotranscripción como la PCR punto final se realizaron en un termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems). Los productos de

PCR fueron resueltos en un gel de agarosa 1%, se tiñeron con bromuro de etidio (BIO-RAD). Como marcador de pares de bases (pb) se utilizó 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, 10787-018) y los gels fueron visualizados en un transiluminador de luz UV.

Plásmidos. Los plásmidos usados en este trabajo fueron pCR®4-TOPO (Life Technologies K4575-02) que es un vector de tránsito que está específicamente diseñado para clonar los productos de PCR para secuenciación y pRSETA (Invitrogen, V351-20) es un vector pRSETA de expresión diseñado para la expresión y purificación de proteínas a partir de genes clonados en *E. coli* (Figuras 9 y 10). Se siguieron las instrucciones según el fabricante para el uso de estos vectores.

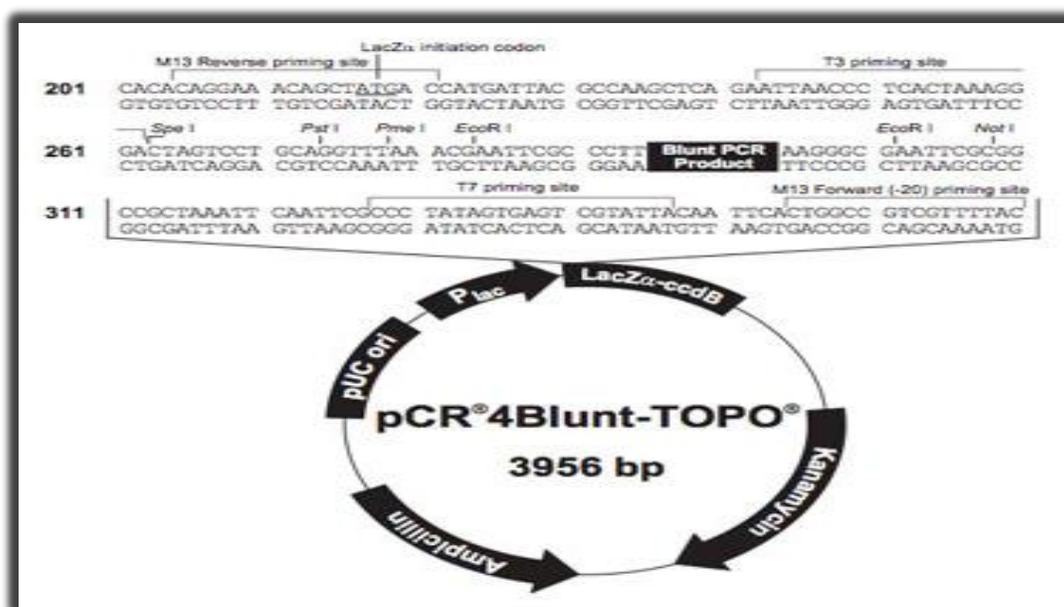


Figura 9. Plásmido de tránsito pCR®4-TOPO mostrando genes de resistencia a kanamicina y ampicilina para la selección de colonias positivas, sitios de corte para la enzima de restricción *EcoRI* flanqueando al inserto de interés y sitios de promotores T7 y T3.

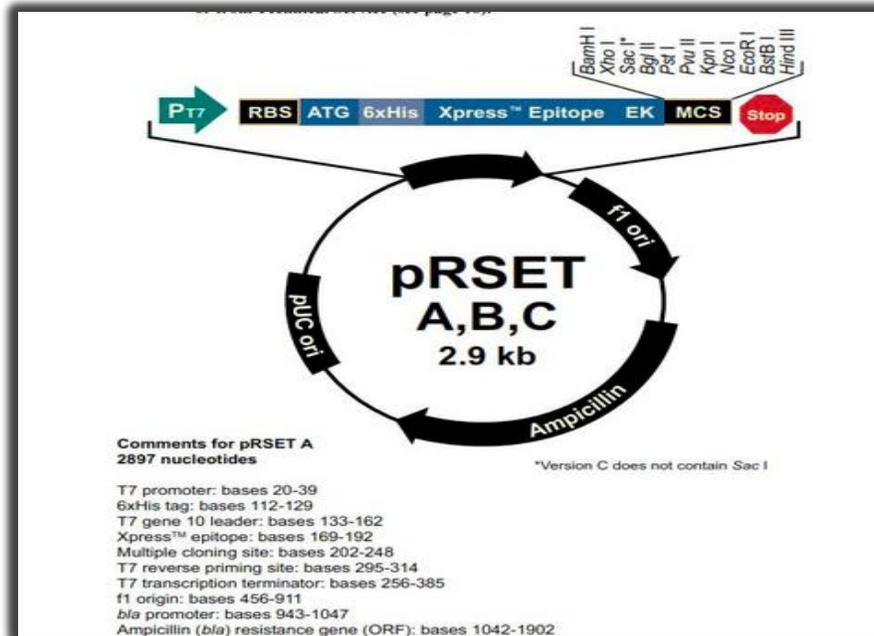


Figura 10. Plásmido de expresión pRSETA, con un tamaño de 2940pb, con gen de resistencia a ampicilina para la selección de colonias positivas, 11 sitios de corte para enzimas de restricción, entre ellos BamHI y HindIII que flanquean la zona donde se acepta el inserto. La expresión está controlada bajo el promotor T7 y una bandera de 6 histidinas (His).

Extracción de DNA a partir de geles de agarosa. La extracción se realizó mediante QIAEX II Gel Extraction Kit de acuerdo al protocolo del fabricante. Brevemente, el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio se visualizó en el transiluminador y el fragmento de interés se cortó con una navaja y se recuperó en un microtubo estéril. Al tubo se agregaron 400µL de la solución QX1 del kit, después se adicionó 8µL de perlas QIAEX II y en un termoblot se calentó a 50°C durante 20 minutos. El tubo se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente, se recuperó el precipitado del fondo y se resuspendió en 500µL de QX1. El precipitado se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. La pastilla formada se resuspendió en 15µL de agua para PCR y se dejó durante 15 minutos en un tubo de 1.5mL. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos para separar las perlas del DNA que

quedó en la fase acuosa. Para evaluar la integridad del fragmento se corrió un gel de agarosa al 1%.

Reacción de ligación. Para conseguir la ligación, se siguió el protocolo del fabricante. Brevemente, en un microtubo de 0.6mL se colocaron los siguientes volúmenes de reacción.

Producto de PCR	0-5 μ L
Solución salina	1 μ L
Vector pCR®4-TOPO	1 μ L
Agua	c.b.p. 6 μ L
Volumen Final	6 μ L

La mezcla se colocó en un baño de agua a una temperatura constante de 22-23°C durante 1h y se detuvo la reacción manteniendo el tubo a 4°C.

Transformación *E. coli* DH5- α . Para la transformación se utilizaron células *E. coli* DH5- α . Se describe brevemente el método, se colocó la reacción de ligación en un microtubo y en hielo durante 5 minutos y se le agregaron al microtubo de la reacción 100 μ L de células competentes *E. coli* DH5- α . Se colocó el tubo en hielo durante 20 minutos. Posteriormente el tubo se incubó por 2 minutos a 42°C y después, 2 minutos en hielo. Al tubo de reacción se agregó 1mL de medio LB sin ampicilina. Se mezcló el volumen de reacción y se incubó 40 minutos a 37°C, al término se centrifugó 20 segundos a 3000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón con 60 μ L de medio LB sin ampicilina. La solución final se sembró en cajas Petri con LB ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C. Este mismo procedimiento también se aplicó para las transformaciones de células *E. coli* BL21,

Purificación de DNA plasmídico a pequeña escala (MINIPREP). En un tubo corex® de 15mL se inocularon 5mL de medio LB con ampicilina, con una colonia bacteriana de células transformadas. El tubo corex® se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante (200 rpm). Después en un microtubo de

1.5mL se centrifugó 1.5mL de las células durante 20 segundos y se descartó el sobrenadante. El botón se resuspendió el pellet con 100µL de GTE (Tris 25mM pH8, EDTA 10mM pH8, Glucosa 50mM) y se incubó 5 minutos a T.A. Al microtubo se agregó 200µL de solución NaOH/SDS (NaOH 0.2N/SDS 1%), se mezcló el microtubo con movimientos ligeros y se colocó en hielo durante 5 minutos. Al microtubo se agregó 150µL de acetato de potasio 3M y se mezcló por vórtex por 2 segundos. El microtubo se colocó en hielo 5 minutos y después se centrifugó a 14 000 rpm durante 3 minutos para descartar el residuo y ADN cromosomal. El sobrenadante obtenido se transfirió a otro microtubo y se realizó una extracción fenol-Cloroformo (1:1). Al microtubo se agregó 800µL de etanol 95%, se dejó 2 minutos a T.A. para precipitar los ácidos nucleicos. Posteriormente, el microtubo se centrifugó 5 minutos a 14 000 rpm a T.A. Del microtubo se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70% y el sedimento se dejó secar manteniendo el microtubo destapado a T.A. Se resuspendió el sedimento en 20µL de agua.

Purificación de DNA plasmídico a gran escala (MAXIPREP). La purificación de DNA plasmídico para secuenciación se realizó siguiendo el protocolo del fabricante del kit QIAGEN tip-20 (lot: 145045348). Brevemente, en un matraz estéril se inocularon 25mL de medio LB con ampicilina con una colonia bacteriana. El cultivo se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante. Las células se concentraron por centrifugación durante 10 minutos a 10 000 rpm a 4°C en un tubo cónico de 25mL y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió el sedimento en 1.5mL de GTE (Tris 25mM pH8, EDTA 10mM pH8 y Glucosa 50mM), con vórtex. Al tubo cónico se agregó 1mg de lisozima (Merck. 9001-63-2) y se homogenizó e incubó durante 15 minutos a T.A. El tubo se pasó al hielo durante 5 minutos. Al tubo cónico se agregaron 3mL de NaOH 0.2N/SDS 1%. El tubo se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 15 minutos. Se añadió 2.25mL de acetato de potasio (3M pH4.8) al tubo y se mezcló por inversión. El tubo se incubó en hielo 15 minutos y se centrifugó 30 minutos a 12 000 rpm para descartar el residuo (DNA

cromosomal). Se transfirió el sobrenadante a un tubo corex® de vidrio y se adicionó 3mL de isopropanol. El tubo se incubó a T.A. por 15 minutos y se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 300µL de agua. Se equilibró una columna QIAGEN-tip 20 (lot: 145045348) con 1 mL de buffer QBT, hasta que pasó todo el buffer por gravedad. Se añadió los 300µL anteriormente recuperados a la columna. La columna se lavó con buffer QC. Posteriormente se eluyó el DNA de la columna con 800µL de buffer QF. El DNA se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol. La solución se centrifugó inmediatamente a 10 000 rpm por 30 minutos y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento con 20µL de agua.

Clonación del gen que codifica para la proteína Vago de *Aedes albopictus*.

El amplicón de Vago obtenido por PCR punto final se introdujo en el vector para secuenciación pCR 4-TOPO®TA Cloning Kit for Sequencing siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando la enzima ligasa T4 (Life Technologies EL0011) para la unión del inserto con el plásmido. Se transformaron bacterias competentes *Escherichia coli* DH5-alfa con el plásmido y se crecieron en medio LB. Para corroborar que el inserto fue aceptado por el vector y seleccionar la colonia bacteriana transformada, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% para verificar las bandas correspondiente al plásmido más el inserto liberado al utilizar la enzima de restricción *EcoRI* que posee dos sitios de corte en el vector flanqueando al inserto. Posteriormente, se seleccionaron las colonias de bacterias que presentaron evidencia de poseer el plásmido con el inserto y se lisaron, para la obtención del plásmido y utilizando las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* se obtuvo el DNA correspondiente al fragmento Vago para secuenciación. Finalmente, se realizó la ligación del fragmento al vector de expresión pRSET A, un vector especial para la expresión de altos niveles de proteína recombinante en bacterias *E. coli* BL-21.

Secuenciación del gen de Vago de *Aedes albopictus*. Se purificó el DNA plasmídico de células lisadas DH5-alpha competentes, se realizó una reacción

de PCR para secuenciación y se amplificó el plásmido utilizando cebadores para el promotor T7 en un solo sentido. Terminado el PCR se utilizó BigDye® Terminator V3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems 4636915) para la purificación y concentración del producto para su secuenciación en un equipo ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Análisis Bioinformático. El análisis bioinformático de las secuencias se realizó en las bases de datos de NCBI utilizando el programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), EMBL-EBI Cambridgeshire UK, para realizar ClustalW2, (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y el modelamiento de la proteína se realizó en la base de datos SWISS-MODEL (swissmodel.expasy.org/). Para la búsqueda de secuencias homólogas al gen de Vago en el genoma de *A. albopictus* y *A. aegypti* se utilizó la base de datos de VectorBase (<http://www.vectorbase.org>). Finalmente, la secuencia se analizó utilizando el software SignalP que predice si una secuencia de proteína posee un péptido señal para su secreción ([http://www.cbs.dtu.dk /services/ SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)).

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico de los resultados densitométricos obtenidos de los ensayos de Western blot, se utilizó la prueba de t Student pareada. Las diferencias significativas fueron consideradas cuando el valor de p estuviera por debajo de 0.05. Para el tratamiento de los datos y su análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 6 para Mac OS X.

RESULTADOS

Cinética de producción y secreción de Vago en células C6/36 HT infectadas con DENV. Para la determinación de los niveles de la proteína Vago secretada por células C6/36 HT infectadas con DENV4, se recuperaron los sobrenadantes a las 3, 6, 12 y 24 horas postinfección (hpi). La cantidad de proteína se midió mediante el método de Bradford y se realizaron los ajustes para cargar 30µg de proteína por pozo, en un gel de poliacrilamida y mediante la técnica de Western blot se llevó a cabo la detección de proteína. Para cuantificar la expresión de la proteína Vago, se realizó una densitometría de las bandas presentes en la membrana. En la figura 11 se muestra un resultado típico obtenido en los ensayos de Western blot en donde se observa un aumento en las concentraciones de una banda de aproximadamente 45kDa correspondiente al peso molecular esperado para la proteína Vago. En la Figura 12 se muestra el resultado de la cuantificación por densitometría de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos mostraron en los sobrenadantes un claro aumento en la producción de la proteína Vago después de la infección a partir de las 3hpi y de manera sostenida hasta las 24hpi. Inesperadamente, se observó una presencia significativa de la proteína Vago en los sobrenadantes de células Mock (células sin infectar) recolectadas a las 24h en relación a los niveles basales observados en los sobrenadantes de células Mock recuperadas a las 3hpi. Sin embargo, las cantidades de Vago detectadas en los sobrenadantes de las células infectadas aún a las 3hpi resultó significativamente mayor que las cantidades observadas en las células Mock a las 24hpi. Estos resultados sugieren que las células C6/36 HT infectadas con DENV activan vías de producción de Vago.

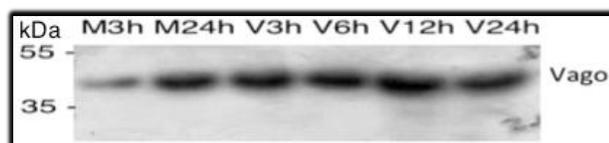


Figura 11. Western Blot de sobrenadantes de células C6/36 HT infectadas con DENV4, ilustra la banda de 45 kD correspondiente a Vago. Se observa un aumento dependiente del tiempo, habiendo un máximo a las 24hpi.

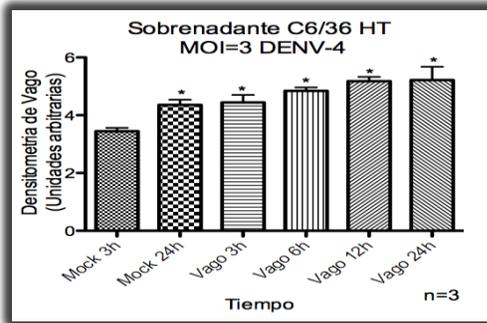


Figura 12. Análisis densitométrico de membrana de Wester blot realizado con sobrenadante de células C6/36 HT infectadas con DENV4, en tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. * P <0,05.

Para determinar los niveles de Vago en el citoplasma de células C6/36 HT infectadas se analizaron por Western blot lisados de células igualmente cosechadas a las 3, 6, 12 y 24 hpi. La determinación de Vago se realizó mediante la técnica de Western blot, para el caso concreto de los lisados se utilizó como control de carga interno la detección de la proteína GAPDH. Los resultados de los Western blot obtenidos con los lisados celulares se muestran en la Figura 13 y su cuantificación por densitometría en la Figura 14.

En el panel A de la Figura 13 se muestra un resultado típico obtenidos en los ensayos de Western blot de lisados celulares para la detección de Vago. El panel B muestra la detección de GAPDH utilizado como control interno. En el Western blot se observó un máximo en los niveles de Vago a hasta las 6hpi respecto a las células mock; sin embargo, en horas posteriores los niveles de Vago revelaron un decremento hasta las 24hpi, respecto al mock de 24hpi.

Estos resultados sugieren que en los lisados de células C6/36 HT infectadas con DENV, activan la vía de producción de Vago en horas tempranas a la infección, alcanzando niveles máximos de producción de Vago a las 6hpi, además es probable que la infección suprima la producción de Vago, mediante mecanismos aun no dilucidados.

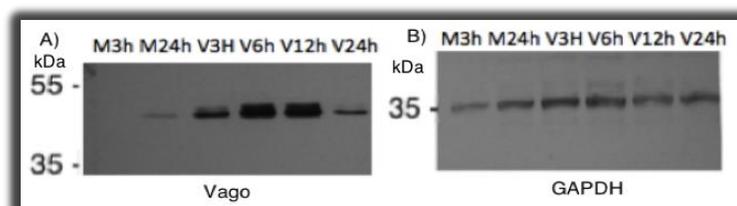


Figura 13. A) Western Blot de lisados de células C6/36 HT infectadas con DENV4. Se observa un aumento dependiente del tiempo, habiendo un máximo a las 6hpi. . B) GAPDH como control de carga.

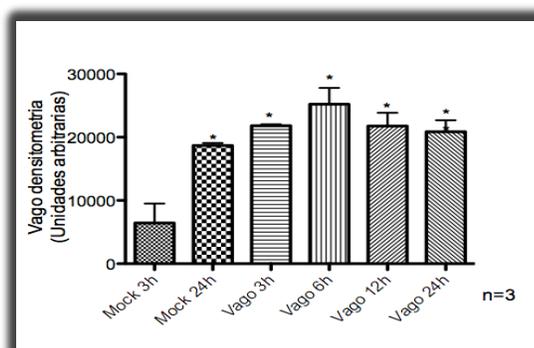


Figura 14. Análisis densitométrico de membrana de Wester blot realizado con lisados de células C6/36 HT infectadas con DENV4, de 3 experimentos independientes. Los resultados fueron normalizados de acuerdo a los niveles de GAPDH utilizado como control de carga. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. * P < 0,05.

Viabilidad de células C6/36 HT tratadas con Brefeldina A, GW4869 y Spiroepoxide

Para la determinar si la acción de los fármacos ejerce algún cambio proliferativo sobre las células de interés y de esta manera determinar concentraciones de trabajo que no afecten el resultado, se hicieron pruebas de viabilidad en células no infectadas.

La determinación de viabilidad se realizó por triplicado utilizando el estuche de Promega® CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay en células tratadas por 24h. Para cada fármaco se evaluaron 3 diferentes concentraciones: Brefeldina A [5µg/µL], [7µg/µL] y [9µg/µL], GW4869 [25µM], [30µM] y [40µM] y Spiroepoxide [10µM], [20µM] y [30µM]. Como control se utilizó medio de mantenimiento sin fármaco. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 15, 16 y 17. Para cada fármaco se escogió para los experimentos la aquella concentración que no afecte la viabilidad celular en más de un 15%, para Brefeldina A se escogió una concentración de 7µg/µL, para GW4869 una de 30µM y para Spiroepoxide una de 20µM.

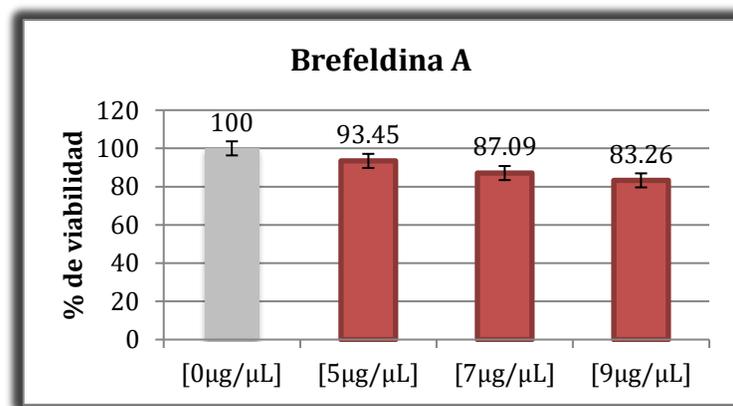


Figura 15. Viabilidad de células C6/36 HT, expuestas a diferentes concentraciones de Brefeldina A. La viabilidad se determinó utilizando un estuche Promega® CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, los ensayos se realizaron por triplicado.

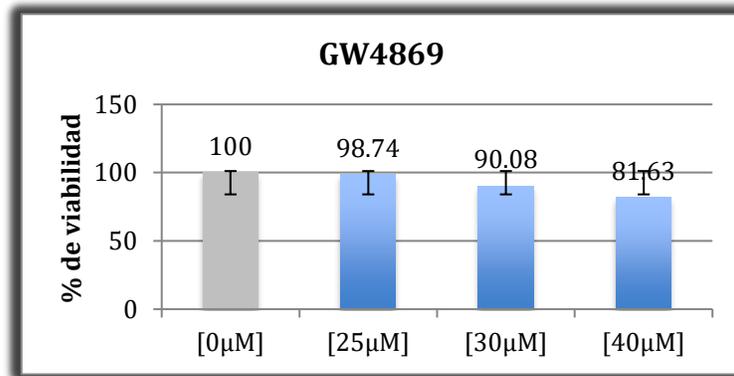


Figura 16. Viabilidad de células C6/36 HT, expuestas a diferentes concentraciones de GW4869. La viabilidad se determinó utilizando un estuche Promega® CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, los ensayos se realizaron por triplicado.

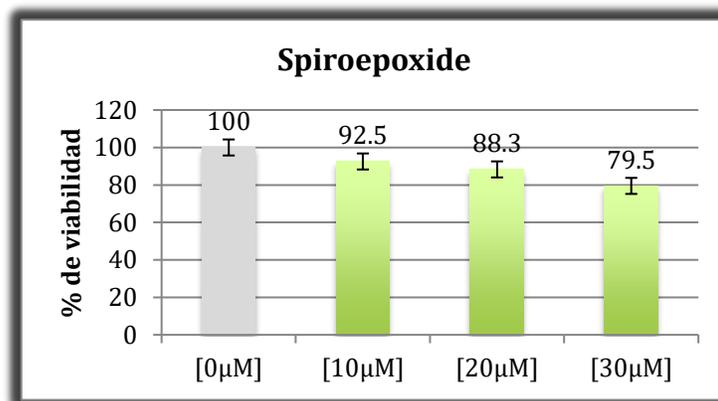


Figura 17. Viabilidad de células C6/36 HT, expuestas a diferentes concentraciones de Spiroepoxide. La viabilidad se determinó utilizando un estuche Promega® CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, los ensayos se realizaron por triplicado.

Efecto del tratamiento con fármacos en la liberación de Vago en células C6/36 HT infectadas con DENV4

Células C6/36 HT crecidas en una placa de 24 pozos, se infectaron con DENV4 durante 1h, se retiró el inóculo y se añadió medio de mantenimiento con la concentración del fármaco y se recuperaron los sobrenadantes 24 horas después de la infección.

A los sobrenadantes cosechados se les realizó cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford, se ajustaron para cargar 30µg por pozo de proteína y se separaron en un gel de poliacrilamida al 12%. Finalmente se determinaron los niveles de la proteína Vago mediante la técnica de Western blot y la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría. Los resultados se muestran en la Figuras 18 y 19 respectivamente.

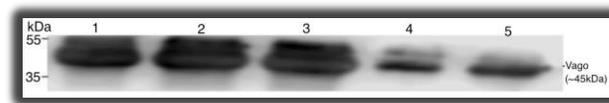


Figura 18. Ensayo de Western blot que muestra un resultado típico correspondiente al tratamiento con fármacos. Carril 1. Células no infectadas. Carril 2. Células infectadas pero no tratadas. Carril 3. Células infectadas y tratadas con Brefeldina A, Carril 4. Células infectadas y tratadas con Spiroepoxide. Carril 5. Células infectadas y tratadas con GW4869.

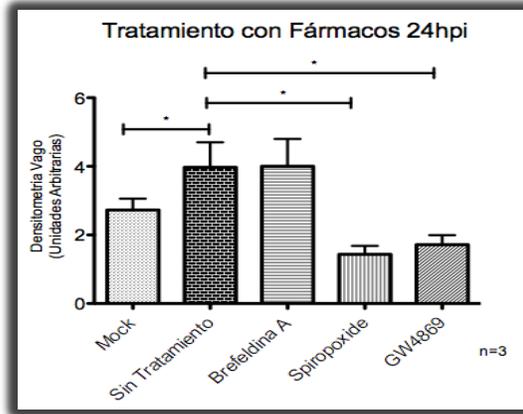


Figura 19. Densitometría correspondiente a los WB realizados con tratamientos de fármacos. El análisis estadístico se realizó utilizando una t de Student. * $P < 0.05$. $n=3$.

Los resultados muestran una clara disminución en la concentración de Vago en los sobrenadantes de células tratadas con Spiroepoxide y GW4869 pero no en el sobrenadante de células tratadas con Brefeldina A en relación a los niveles de Vago observados en los sobrenadantes de células infectadas pero no tratadas. Estos resultados indican claramente que las células C6/36 HT infectadas secretan Vago al medio extracelular vía exosomas.

Búsqueda de secuencias de Vago en bases de datos

Mediante el uso de bases de datos NCBI y VectorBase (<https://www.vectorbase.org>), se identificaron los genes de Vago para *A. aegypti* y *A. albopictus*. Solo el gen de *A. aegypti* se encuentra identificado como Vago en la base de datos NCBI, mientras que las 4 secuencias encontradas en *A. albopictus*, son secuencias reportadas como proteínas hipotéticas. Se utilizó la herramienta bioinformática ClustalW para el alineamiento de las secuencias de Vago reportadas (Figura 20).

```

066671      ATGAGGACGTTGGCTGTAGTGAGTTTTGCTCTCTGCTGTTTGATCGCAGTAACCTTTGCC 60
066670      ATGAGGACGTTGGCTGTAGTGAGTTTTGCTCTCTGCTGTTTGATCGCAGTAACCTTTGCC 60
A. aegypti  ATGAAGGCATT---TGCAGTGAGTTTCGCTTTGCTGCTGCTGATCGCAGTAGCACTTTGCC 57
066669      ATGAAGGCATT---TGCAGTGAGTTTCACGCTGTGCTGCTGATCGCAGCAGCCCTCGCC 57
034893      ATGAAGGCATT---TGCAGTGAGTTTCACGCTGTGCTGCTGATCGCAGCAGCCCTCGCC 57
          ****.*.*.** ** ***** .* * ***** ***** **.*. * **

066671      GGTCAGGGT-GTCTTGCTCAAAGCGACCCATCCAGATCACCCAGGCAAGTGCTATGACGA 119
066670      GGTCAGGGT-GTCTTGCTCAAAGCGACCCATCCAGATCACCCAGGCAAGTGCTATGACGA 119
A. aegypti  GGTCAGAGC-ATTTTGCTCAATGCGACTCACCCAGATCACCCCTGGGAAGTGCTACGATCC 116
066669      G-CCAGGATGATCCAGCCTAACGCCACTCATCCAGATCACCCGGGCAAGTGCTATGACC 116
034893      G-CCAGGATGATCCAGCCTAACGCCACTCATCCAGATCACCCGGGCAAGTGCTATGACC 116
          * ***.. .* :** ** ** ** ** ***** ** ***** **

066671      AGGTTTCAGGATTAGTGTGTTGATCCTGACGAGGAGAAATCTATCCCCGAGAATGTACCAT 179
066670      AGGTTTCAGGATTAGTGTGTTGATCCTGACGAGGAGAAATCTATCCCCGAGAATGTACCAT 179
A. aegypti  AACATCGAAATTGGTGCTCGATCCCGATGAAGAGAAATCCATTCTCGGTGCTTGATACCGA 176
066669      AAGTTCGGCCTGGTGTTCGATGTAGATGAAAAGAAAACATTACCGGAACGTGCATGCT 176
034893      AAGTTCGGCCTGGTGTTCGATGTAGATGAAAAGAAAACATTACCGGAACGTGCATGCT 176
          *. :** ... *.* ** ** ** ** ..*****:* :* ** **:. ** * :

066671      GGCATATTGTTCAAAGGCTTCTCGTTGACATACACCAGTTGTATAAAAGCGGTAGTA-- 237
066670      GGCATATTGTTCAAAGGCTTCTCGTTGACATACACCAGTTGTATAAAAGCGGTAGTA-- 237
A. aegypti  GGCATACTGTTCCAGAGATTATTCTTTGACCTTTACGAGCTGTGTACTGTCGATAGTG-- 234
066669      GGTTCCTTGCTCGGAAGATTATTCTTTGATATTCCACACGTGCGGAGTGGCCGTTATGGA 236
034893      GGTTCCTTGCTCGGAAGATTATTCTTTGATATTCCACACGTGCGGAGTGGCCGTTATGGA 236
          ** : : ** ** ..**.* : ** ***** .*: .. * ** . * :. * .*:.*.

066671      -GATGATCCTAAGTGTGAAAAAATCAAGCAGGACCTAAGGATTACCCGGAATGTTG 296
066670      -GATGATCCTAAGTGTGAAAAAATCAAGCAGGACCTAAGGATTACCCGGAATGTTG 296
A. aegypti  -GCTGACCCAAATGCGAAAAAATCAAGCAAGATCTAACCAGGATTACCCGGAATGTTG 293
066669      CGATGACCCAGACTGCGAACCTATTGAACAGGACTTCACTAAGAACTACCCAGAATGCTG 296
034893      CGATGACCCAGACTGCGAACCTATTGAACAGGACTTCACTAAGAACTACCCAGAATGCTG 296
          *.* ** **:* ** **..:**.*.* ** ** **.* *****.*.* **

066671      CCACACATATAAATGCGTACACGATGGGAAAGTGAGTTATCATTGA 342
066670      CCACACATATAAATGCGTACACGATGGGAAAGTGAGTTATCATTGA 342
A. aegypti  TCACAAATATAAATGTGTACACGATGGGAAAGTGAGTTATCATTAA 339
066669      TAATAAGTACAAATGCGTACGCAATGGAGAAGTTAATTATATTGA 342
034893      TAATAAGTACAAATGCGTACGCAATGGAGAAGTTAATTATATTGA 342
          .* **..** ***** **.*.*.*.* **.* **.* **.* **.*

```

Figura 20. Alineamiento de las secuencias de Vago, descargadas de la base de datos VectorBase. Se muestran las 4 secuencias correspondientes a *A. albopictus* y una única secuencia de *A. aegypti*. Secuencias alineadas con ClustalW2 (EMBL-EBI).

Clonación y secuenciación del gen de Vago a partir de células C6/36 HT

A partir de DNA extraído de células C6/36 y Aag2 se procedió a amplificar los genes correspondientes a Vago por PCR, contrario a los resultados esperados se obtuvo un amplicón de aproximadamente 500pb para cada caso (Figura 21).

Sin embargo, según las bases de datos los amplicones esperados eran de 339pb y 342pb para *A. aegypti* y *A. albopictus*, respectivamente.

Extracción de DNA.

A partir de un amplicón de Vago generado por PCR de C6/36 HT y Aag2, según el protocolo descrito. Del amplicon obtenido se utilizó 1 μ L para verlo en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador, para comprobar la pureza. En la Figura 21 se ve claramente una purificación libre de RNA o degradación,

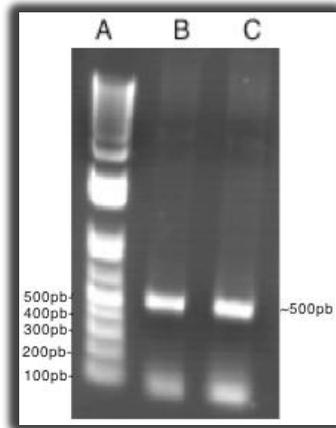


Figura 21. Amplicones de Vago obtenidos por PCR a partir de células (B) C6/36 HT y (C) Aag2. Analizados en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

El amplicon correspondiente a C6/36 HT se clonó en el vector para secuenciación pCR 4-TOPO® siguiendo las instrucciones del fabricante y fue secuenciado en un sólo sentido utilizando los servicios de la unidad de secuenciación de ácidos nucleicos del Departamento de Genética en el Cinvestav Zacatenco. Se obtuvo una secuencia de 492pb y posteriormente se realizó un análisis bioinformático por BLASTn de la secuencia de C6/36 la cual mostró 98% de identidad con un proteína putativa rica en cisteínas de *A. albopictus* (Figura 22). En estos resultados obtenidos mostraron dos espacios a

lo largo de la secuencia de Vago respecto a la secuencia depositada en la base de datos NCBI, sugerentes de la presencia inesperada de 2 intrones en el gen de Vago de *A. albopictus*.

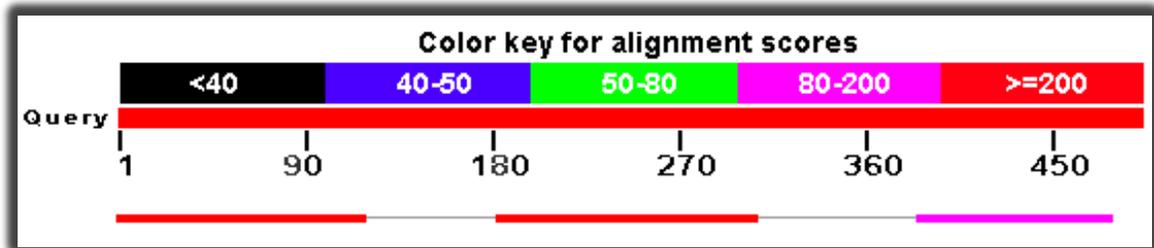


Figura 22. BLASTn realizado en NCBI con la secuencia de 492pb de *A. albopictus*. Se observan espacios libres donde no existe similitud entre la secuencia de interés y las secuencias de Vago en la base de datos NCBI.

Análisis bioinformático

Se realizó una búsqueda de secuencias con similitud a la secuencia de Vago obtenida, se encontró en la base de datos VectorBase una secuencia del genoma de *A. aegypti* con amplia similitud (Figura 23). Se realizó un ClustalW con la secuencia del mRNA de Vago y el DNA encontrado en el genoma de *A. aegypti* (Figura 24).

```
>gi|157117805:c4499207-4498646 Aedes aegypti strain Liverpool
chromosome 3 supercont1.3, whole genome shotgun sequence
AGTTCTAGTGGAGCCTGCGCGAAAAGTCACGACGCGACGTTTCGTCAAATAGCACACGATGAAGGCATTTG
CAGTGAGTTTAGCTTTGTGCTGCTTGATCGCAGTAGCATTGCGCGTCAGAGCATTCTACTCAATGCGAC
TCACCCAGGTTGGTAATCAAAGTTAGCACTTTTATTGATAATTGATAACGTAAAGCCTATTACTACGATC
CATTCTAGATCACCTGGGAAGTGCTACGATCCAACATCGAAATTGGTGCTCGATCCCGATGAAGAGAA
ATCCATTCTGGTGCTTGCACCGAGGCATACTGTTCCAGAGATTATTCTTTGACCTTTACGAGGTGATTT
GTTTTTCATATGAATAGCAATATAAAATTAATTAATTTTTATTTTCGATTATAGCTGTGTACTGTGCGATA
GTGGCTGACCCAAACTGCGAAAAAATCAAGCAAGATCTTACCAAGGATTACCCGGAGTGTGTGCACAAAT
ATAAATGTGTACACGATGGAAAAGTGAGTTATCATTAAGTATTCATTTTGAATAAAAACAAAAATCAATC
GA
```

>gi|604859857|gb|KJ184328.1| Aedes aegypti strain Kaohsiung Vago
protein mRNA, complete cds
ATGAAGGCATTTGCAGTGAGTTTCGCTTTGTGCTGCTTGATCGCAGTAGCACTTGCCGGTCAGAGCATTT
TGCTCAATGCGACTCACCCAGATCACCCGGGAAGTGCTACGATCCAACATCGAAATTGGTGCTCGATCC
CGATGAAGAGAAATCCATTCCTGGTGCTTGTACCGAGGCATACTGTTCCAGAGATTATTCTTTGACCTTT
ACGAGCTGTGTACTGTGATAGTGGCTGACCCAAATTGCGAAAAAATCAAGCAAGATCTAACCAAGGATT
ACCCGGAGTGTGTACAAAATATAAATGTGTACACGATGGAAAAGTGAGTTATCATTTAA

Figura 23. Secuencias encontradas del genoma de *A. aegypti* correspondientes al mRNA de Vago y una secuencia de DNA con alta similitud a Vago.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

DNA          AGTTCTAGTGGAGCCTGCGCGAAAGTCACGACGCGACGTTTCGTCAAATAGCACACGATG 60
RNAm         AGTTCTAGTGGAGCCTGCGCGAAAGTCACGACGCGACGTTTCGTCAAATAGCACACGATG 60
*****

DNA          AAGGCATTTGCAGTGAGTTTAGCTTTGTGCTGCTTGATCGCAGTAGCATTGCGCGTCAG 120
RNAm         AAGGCATTTGCAGTGAGTTTAGCTTTGTGCTGCTTGATCGCAGTAGCATTGCGCGTCAG 120
*****

DNA          AGCATTTTACTCAATGCGACTCACCCAGGTGGTAATCAAAGTTAGCACTTTTATTGATA 180
RNAm         AGCATTTTACTCAATGCGACTCACCCAG----- 148
*****

DNA          ATTGATAACGTAAAGCCTATTACTACGATCCATTTCTAGATCACCCCTGGGAAGTGCTACG 240
RNAm         -----ATCACCCCTGGGAAGTGCTACG 169
*****

DNA          ATCCAACATCGAAATTGGTGCTCGATCCCGATGAAGAGAAATCCATTCCTGGTGCTTGCA 300
RNAm         ATCCAACATCGAAATTGGTGCTCGATCCCGATGAAGAGAAATCCATTCCTGGTGCTTGCA 229
*****

DNA          CCGAGGCATACTGTTCCAGAGATTATTCTTTGACCTTTACGAGGTGATTTGTTTTTCATA 360
RNAm         CCGAGGCATACTGTTCCAGAGATTATTCTTTGACCTTTACGAG----- 272
*****

DNA          TGAATAGCAATATAAAATTAATTAATTTTATTTTCGATTATAGCTGTGTACTGTGCGATA 420
RNAm         -----CTGTGTACTGTGCGATA 288
*****

DNA          GTGGCTGACCCAAACTGCGAAAAAATCAAGCAAGATCTTACCAAGGATTACCCGGAGTGT 480
RNAm         GTGGCTGACCCAAACTGCGAAAAAATCAAGCAAGATCTTACCAAGGATTACCCGGAGTGT 348
*****

DNA          TGTCAAAAATATAAATGTGTACACGATGGAAAAGTGAGTTATCATTAACTGATTCATTTT 540
RNAm         TGTCAAAAATATAAATGTGTACACGATGGAAAAGTGAGTTATCATTAACTGATTCATTTT 408
*****

DNA          GAATAAAACAAAAATCAATCGA 562
RNAm         GAATAAAACAAAAATCAATCGA 430
*****

```

Figura 24. ClustalW entre las secuencias mRNA Vago y DNA de *A. aegypti* encontradas en la base de datos. Los espacios sin complementariedad corresponden a los intrones.

Además se realizó un alineamiento de las proteínas Vago y sus isoformas mediante ClustalW (EMBL-EBI), para comparar la similitud que presentan. Se observa en la Figura 25 la conservación de un dominio SVWC (Single Von Willebrand factor C-domain) entre las 5 proteínas.

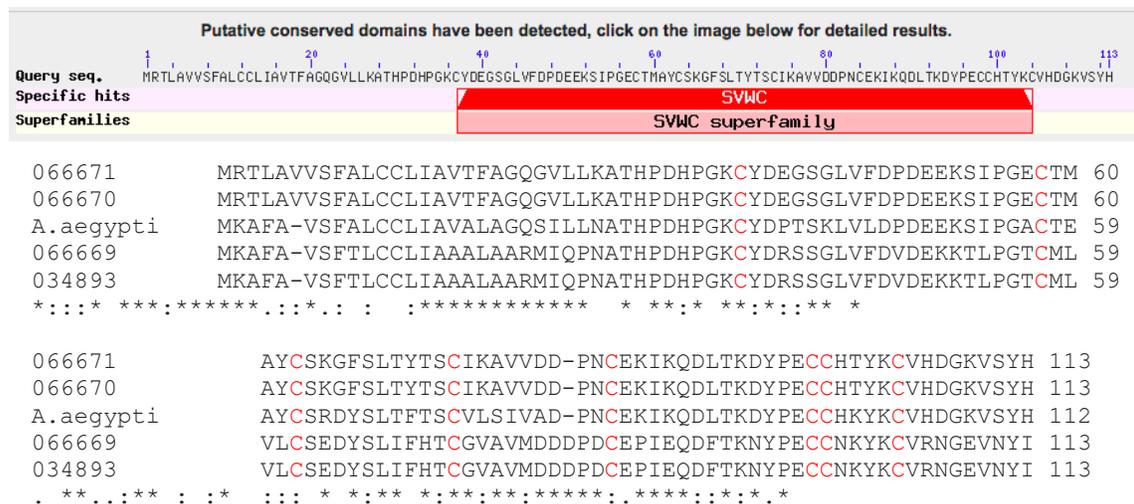


Figura 25. Alineamiento ClustalW de las secuencias de aminoácidos de la proteína Vago. En rojo se muestra el dominio VWC (Dominio de 8 cisteínas) conservado en las 4 isoformas de Vago en *A. albopictus* y Vago de *A. aegypti*.

Además para determinar que la proteína es secretada, se realizó mediante la herramienta bioinformática SignalP un análisis para determinar si posee un péptido señal de secreción. El resultado mostró un sitio de corte probable del péptido señal entre los aminoácidos 19 y 20 (Figura 26).

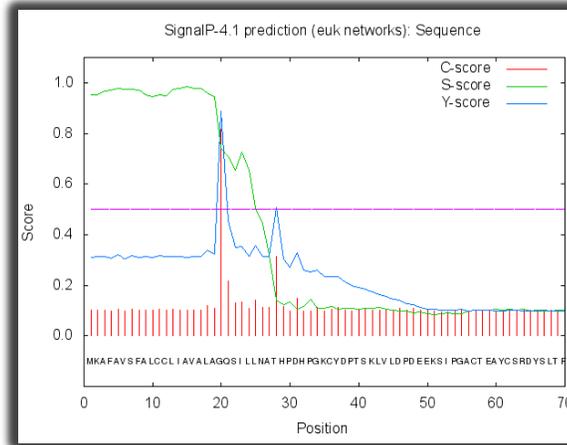


Figura 26. SignalP. Para la predicción de un péptido señal para la secreción. El programa determina un péptido señal con un sitio de corte entre el aminoácido 19 y 20 (Petersen et al., 2011).

Envió de la secuencia del gen Vago de *Aedes albopictus* al GenBank

La secuencia de 492pb clonada a partir de DNA genómico de células C6/36 HT y según el análisis ClustaW comparada en contra del mRNA de Vago de *A.aegypti* presenta dos intrones hasta ahora desconocidos y no reportados en *A. albopictus* para el gen Vago, se reportó en el GenBank mediante la herramienta Bankit y le fue asignada el número de acceso 1854585 (Figura 27)

```

LOCUS       BSeq#1                      492 bp    DNA     linear   INV 21-AUG-2015
DEFINITION Aedes albopictus.
ACCESSION  BSeq#1
VERSION    .
KEYWORDS   .
SOURCE     Aedes albopictus (Asian tiger mosquito)
  ORGANISM Aedes albopictus
            Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
            Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera;
            Culicoidae; Culicidae; Culicinae; Aedini; Aedes; Stegomyia.
REFERENCE  1 (bases 1 to 492)
AUTHORS   Vargas,H.H. Sr., Rosales Encina,J.L. Sr., Ludert,J.E. Sr. and
            Baylon,L. Sr.
TITLE     DNA sequence Vago Aedes albopictus
JOURNAL   Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 492)
AUTHORS   Vargas,H.H. Sr., Rosales Encina,J.L. Sr., Ludert,J.E. Sr. and
            Baylon,L. Sr.
TITLE     Direct Submission
JOURNAL   Submitted (21-AUG-2015) Infectomica y Patogenesis Molecular,
            Cinvestav-IPN, Av. Instituto Politecnico Nacional No.2508,
            Zacatenco, Mexico City, Distrito Federal 07360, Mexico
COMMENT   Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:1.
FEATURES  Location/Qualifiers
            source          1..492
                        /organism='Aedes albopictus'
                        /mol_type='genomic DNA'
                        /db_xref='taxon:7160'
BASE COUNT 140 a      116 c      95 g      141 t
ORIGIN
1 atgataactc actttcccat cgtgtacgca tttatatgtg tggcaacatt cggggtaatc
61 cttagttagg tcctgcttga ttttttcaca attaggatca tctactaccg cttttataca
121 gctgcaatcg aaatgaaatg tatttcctt  atataattca agttgaaaaa cacttttacc
181 tgggtgtatg caacgagaag ccttttgaac aatatgccat ggtacattct cgggggatag
241 atttctctc  gtcaggatca aacactagtc ctgaaaccttc gtcatagcac ttgcctgggt
301 gatctgaaa caatctgca gaactcattg ctgcttttgt tatcaattat cttcaacggc
361 aacaggccaa cttcgattac gaacctggat gggctgcttt gagcaagaca cttcgaccgg
421 caaaggttac tgcgatcaaa cagcagagag caaaactcac tacagccaac gtctctcatgg
481 atccaaggcg ga

```

Figura 27. Secuencia del DNA de Vago en *A. albopictus* reportada en el GenBank con la herramienta Bankit en NCBI.

DISCUSIÓN

A pesar de la importancia del dengue y que se conocen sus vectores *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* también vectores del virus del chikungunya, es poco conocida la inmunología y los componentes que conforman la respuesta a infecciones virales en estos mosquitos. Ello debido en parte a que la investigación está dirigida en la obtención de una vacuna eficaz y de bajo costo, así como al estudio de los mecanismos implicados en la patogénesis de la infección en el humano.

En estudios recientes se describió la existencia del gen Vago en respuesta a la infección viral en *Drosophila*. Este gen (CG2081/Vago) descubierto junto con otro grupo de genes que responden a la infección viral se han catalogado en un grupo que tienen en común un Dominio Simple Von Willebrand factor C (VWC), el cual tiene como característica una estructura de ocho cisteínas además de un péptido señal para ser secretadas (Sheldon, et al. 2007). Dostert et al. (2005) determinaron que el encendido de este gen es dependiente de la vía de JAK-STAT, y que además se sobreexpresa en respuesta a infecciones virales en *Drosophila*.

Recientemente, Paradkar et al. (2012) describieron un aumento de la secreción de la proteína Vago en las células de mosquito *Culex* infectadas con el Virus del Nilo Occidental, lo cual conduce a un estado antiviral en células no infectadas. Además, describieron un mecanismo inédito de conexión de 2 vías de inmunidad innata, como lo son la vía de RNAi y la vía Jak-STAT en mosquitos, a través de la señalización de la molécula Vago secretada. Por sus similitudes con el mecanismo de INF tipo I de vertebrados, a la proteína Vago se le ha considerado como una proteína tipo interferón (“INF-like”) de mosquitos. En ese trabajo Paradkar et al. (2012) proporcionaron evidencia de un sistema integrado y versátil en el sistema inmune del mosquito capaz de comunicar vías inmunológicas relacionadas con la infección viral y células activadas por esta

molécula, para dar lugar a una respuesta antiviral eficaz. En concordancia con su parecido al interferón, Vago actúa solo si está presente en etapas tempranas de la infección viral y su liberación activa células vecinas promoviendo un estado antiviral.

Dadas las similitudes que existen entre el virus del Oeste del Nilo y el DENV, ambos miembros del género *Flavivirus*, y dado que en la actualidad no se conoce acerca de la posible participación de la proteína Vago en la respuesta antiviral contra el DENV, en este trabajo se abordó el estudio de esta molécula utilizando células C6/36. Además, como la ruta de secreción de Vago en células de insecto se desconoce, también se investigó la posible participación de algunas rutas de secreción en células de insecto infectadas con DENV.

Nuestros resultados muestran que las células C6/36 infectadas con DENV responden con la producción y secreción de Vago desde horas tempranas post-infección, ya que por ensayos de western blot se observó un aumento significativo en la concentración de Vago en los sobrenadantes a partir de las 3 horas post-infección. Este aumento en la concentración de Vago en los sobrenadantes de células infectadas se mantuvo de manera sostenida a las 6, 12 y hasta las 24 hpi (Figuras 9 y 10).

Además de la secreción de Vago al sobrenadante, también se evaluó la producción de Vago analizando por western blot lisados de células infectadas cosechados a los mismos tiempos post infección. Los resultados indican un significativo aumento en la producción de Vago en lisados colectados a las 3, 6 y 12 hpi, en concordancia con los niveles de Vago observados en los sobrenadantes. Sin embargo, el aumento en los niveles de Vago se interrumpe en los lisados recolectados a las 24 hpi, lo cual sugiere que la producción intracelular de Vago puede sufrir una regulación negativa a tiempo tardíos post-infección, caída que no se observó en los sobrenadantes cosechados a las 24 hpi, debido a un probable efecto acumulativo en los sobrenadantes. Nuestros

resultados son similares a los resultados reportados por Paradkar et al. (2012) quienes observaron un aumento en la producción de Vago al analizar lisados de células Hsu de *Culex* infectas con WNV, cosechadas a las 12, 24 y 48 hpi. Sin embargo, la caída en los niveles de Vago a tiempos tardíos post infección observadas en este trabajo, no fueron observados en células de *Culex*, lo cual sugiere que es diferente la regulación para la expresión de Vago dependiendo del tipo de célula.

Como controles para la secreción y la producción de Vago, se utilizaron células “mock”, en donde en sobrenadantes y lisados colectados a las 3hpi se observaron niveles mínimos de Vago. Sin embargo, un resultado inesperado fue observar un aumento significativo en los niveles de Vago en los sobrenadantes y lisados cosechados a las 24 h de las células “mock”, hasta niveles equiparables a los observados en las células infectadas a 3 hpi. Las razones para el aumento de los niveles de secreción de Vago en las células no-infectadas se desconocen, pero muy probablemente se deba a factores de estrés, debido a las condiciones de un cultivo prolongado y la depleción de nutrientes en el medio. Es bien conocido que Vago también se dispara en respuesta a estrés nutricional e infecciones bacterianas (Dostert et al. 2005). Estos resultados tomados en conjunto indican que las células C6/36 responden ante la infección por DENV, con una producción y secreción sostenida de Vago al sobrenadante celular al menos desde las 3 hasta las 24 hpi. A tiempos más tardíos (48hpi) en células infectadas se observa un decremento en la producción de Vago acompañado de una reducción en la viabilidad celular.

Existen dos aspectos en las cascadas de producción y señalización de Vago que se desconocen; uno es el receptor sobre la célula blanco y otro es la ruta de secreción por parte de la célula infectada. En este trabajo se abordó este último aspecto utilizando fármacos que bloquean de manera específica la ruta de secreción clásica (Brefeldina A) o la secreción por exosomas (GW4869 y Spiroepoxide). Nuestros resultados mostraron una clara y significativa

disminución en los niveles de Vago en los sobrenadantes de las células tratadas con GW4869 y Spiroepoxide, mientras que en los sobrenadantes tratados con Brefeldina A, se observaron niveles de Vago comparables a los controles no tratados. Estos resultados sugieren fuertemente que Vago es secretado de las células C6/36 vía exosomas. Además, resultados preliminares sugieren que exosomas purificados a partir de células infectadas son positivos a Vago por Western blot. Estudios previos han demostrado que los exosomas median la comunicación célula a célula en una variedad de procesos biológicos y se les consideran otra clase de mediadores de comunicación intercelular (Urbanelli. 2013). Además, se ha determinado que los exosomas secretados por algunas células contienen ácidos nucleicos, tales como mRNA y miRNA. Por ejemplo, se ha observado que células infectadas con el virus de la hepatitis C secretan exosomas con componentes virales, incluyendo ácidos nucleicos, los cuales pueden encender señales de alarma antivirales en células vecinas (Dreux et al., 2012; Valadi et al., 2007). Interesantemente, los exosomas también sirven de ruta de secreción para algunas citocinas de mamíferos (Dai et al., 2006). Nuestros resultados están en línea con toda la evidencia que ha mostrado un papel importante para los exosomas en la comunicación de célula a célula por transferencia de mediadores de información genética y de moléculas claves en los mecanismos de respuesta inmune innata de las células. La Figura 28 muestra un esquema con las posibles rutas de secreción de Vago.

La función principal de Vago soluble o secretado parece ser establecer un estado anti-viral en células no infectadas. En este trabajo se intentó la obtención de la proteína Vago de *Aedes albopictus* de forma recombinante en bacterias y así evaluar su efecto antiviral contra DENV. Partiendo de la base de datos para los genomas de mosquitos del género *Aedes* (Vectorbase) se diseñaron cebadores para amplificar directamente el gen de Vago a partir de DNA extraído de células C6/36. Se decidió esta estrategia porque en base a la literatura ninguno de los genes de Vago conocidos de mosquitos *Aedes albopictus*

contiene intrones en su secuencia. Sin embargo, la alineación del clon obtenido en este trabajo con otras secuencias de Vago utilizando el programa CLUSTAL y la comparación de esta secuencia con secuencias depositadas en el GenBank, con el programa BLAST, indicaron claramente que el gen de Vago de *Aedes albopictus* contiene 2 intrones de 71 y 61 pares de bases anteriormente no descritos. Esta presencia de intrones, impidió que se intentara la expresión de la proteína Vago recombinante en bacterias. Sin embargo, dada la novedad del hallazgo, la secuencia de Vago obtenida fue depositada en el GenBank, utilizando el programa Bankit, bajo el número de acceso 1854585.

El estudio de los mecanismos de inmunidad innata en mosquitos es de suma importancia ya que a diferencia de los vertebrados, parecen carecer de mecanismos de inmunidad adaptativa, y depender en gran medida solo de aquella para el control de las infecciones virales (Sim et al., 2014). En este trabajo se obtuvieron datos que sugieren que, al igual que lo observado previamente para el WNV (Paradkar et al., 2012), la proteína Vago también parece ser parte importante de la respuesta inmune innata de insectos contra la infección por DENV. También se obtuvieron resultados que indican que la proteína Vago es secretada a través de exosomas, lo cual la asemeja a otras citocinas de vertebrados. Una perspectiva de este trabajo es probar directamente, el efecto antiviral de Vago sobre células infectas con DENV. Entender a cabalidad los mecanismos de respuesta inmune y control de los mosquitos del genero *Aedes* a la infección con DENV, permitirá en un futuro la implementación de estrategias de control de dengue basadas en la manipulación del vector.

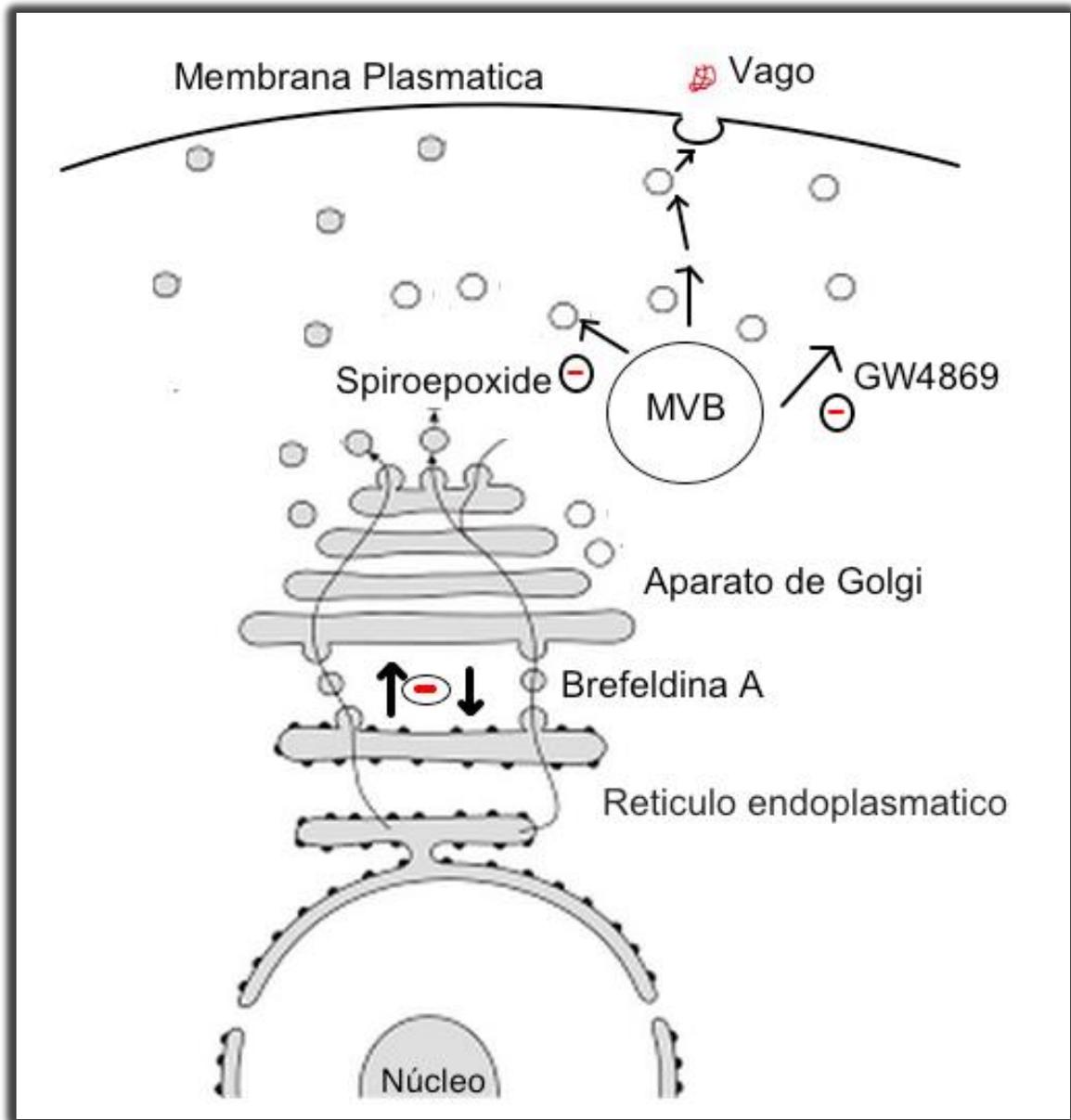


Figura 28. Probable vía de secreción de la proteína Vago, en células de insecto infectadas con DENV y mecanismo de acción de los fármacos.

PERSPECTIVAS

- 1) Expandir estos resultados a otra línea celular de mosquitos; por ejemplo la línea celular Aag2 de *A. aegypti*, utilizando cepas de virus aisladas directamente de pacientes.**

- 2) Evaluar la capacidad de la proteína Vago recombinante para controlar la infección por DENV en células C6/36 HT.**

- 3) Purificar exosomas de células infectadas para comprobar la presencia en ellos de la proteína Vago.**

POSTER

El trabajo fue presentado como poster en (ASV) 2015 34th Annual Meeting of The American Society for Virology Julio 11-15. En Western University London ON, Canadá.



Study of the production and secretion of the interferon-like Vago protein in C6/36 HT cells infected with dengue virus.

Héctor H. Vargas Calderón*, Ana C. Alcalá*, Lidia Baylon*, Marlene Dreux**, José L. Rosales-Encina*, Juan E. Ludert*.

*Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN). Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Mexico, D.F.

**CIRI, Université de Lyon, Inserm, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France.
jludert@cinvestav.mx; hectorhugovci@gmail.com

INTRODUCTION

Dengue is the viral disease transmitted by mosquitoes most prevalent in the world. Transmission is through the bite of *Aedes* mosquitoes infected with any of the 4 dengue virus serotypes (DENV-1, -2, -3 and -4). A gene that is associated with the antiviral response in arthropods is CG2081/Vago. This gene encodes for a cysteine-rich protein that is overexpressed and secreted in cells of the fat body and acts as an IFN-like in *Drosophila* and mosquitoes to restrict viral replication. Recently, Paraskar et al. [PNAS, 109:18915, 2012] described an increased expression of the protein Vago in mosquito *Culex* cells infected with West Nile Virus and the capacity of recombinant Vago to restrict viral replication. In this study, we determined the kinetics of Vago expression in the cell line from *A. albopictus* C6/36 HT infected with DENV-4; moreover, since the route of Vago secretion is unknown, we also tested the effect of exosome release inhibitors on Vago secretion.

MATERIAL AND METHODS

C6/36 HT cells grown to confluence in culture medium E-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, were infected with DENV-4 at a Multiplicity of infection (MOI) 3 for 1 hour. Supernatants and cells lysates were collected at 3, 6, 12 and 24 hpi. Vago levels were determined by Western blot (WB) using an anti-Vago primary antibody made in rabbit and kindly provided by Dr. Peter J. Walker (CSIRO, Australia). For WB supernatants were standardized by total protein content measured by Bradford protein assay, and cells lysates using the protein GAPDH as an internal load control. For determination of Vago secretory pathways, cells were treated after infection with Brefeldin A [$7\mu\text{g}/\mu\text{L}$], an inhibitor of the classical secretory pathway, and Spiropoxide [$20\mu\text{M}$] and GW4869 [$30\mu\text{M}$], both inhibitors of neutral sphingomyelinase and inhibitors of exosome release. Drug concentrations used were previously tested non-toxic to C6/36 HT as determined by commercial cell proliferation assay (Promega).

RESULTS

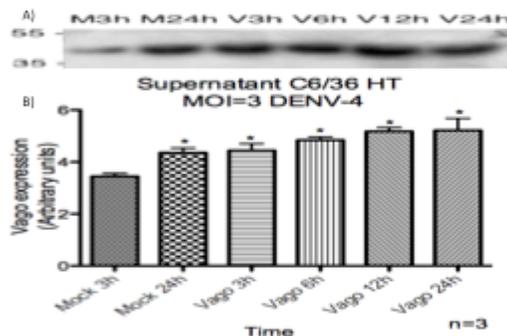


Fig. 1. Kinetics of Vago secretion in cells C6/36 HT infected with serotype DENV-4. Mock infected cells were used as control. A) Result from a typical WB shown. B) Densitometric analysis of 3 independent experiments. Of note, the kinetics of Vago expression was also tested using a DENV isolated from patients with identical results. Statistical analysis was performed using Student's t-test. * $P < 0.05$

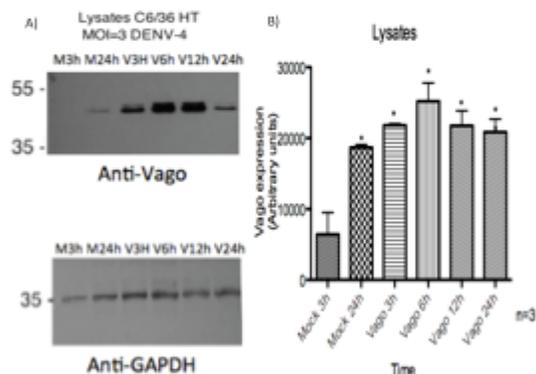


Fig 2. Kinetics of infection in cell lysates in C6/36 HT infected with DENV-4 at a MOI=3. Using GAPDH as a loading control, increased levels of Vago peaking at the 6hpi and subsequently decreasing in time were observed. A) Result from a typical WB shown. B) Densitometric analysis of 3 independent experiments. The graph shows a comparison between the Mock 3h control and the rest of the conditions using Student's t-test. * $P < 0.05$

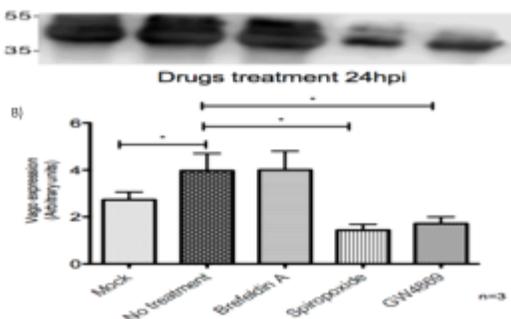


Fig 3. Drug treatment to elucidate the secretion pathway of Vago. C6/36 HT cells were infected with DENV-4 and drugs added to the maintenance medium kept for 24 hpi. Levels of Vago in supernatants of infected and treated and untreated cells were determined by WB. A) Results from a typical WB shown. B) Densitometric analysis of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's t-test. * $P < 0.05$

CONCLUSIONS

In this work, we studied the kinetics of expression of Vago. In C6/36 HT cells infected with DENV-4, the results show a steady increase in Vago starting at 3 hpi and up to 6 hpi and an steady secretion up to 24 hpi. This work also provides evidence indicating that the secretion of Vago in cells of mosquito *Aedes albopictus* infected with DENV is via exosomes. The effect of Vago direct exposure of C6/36 HT cells to dengue virus susceptibility is currently under investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

Héctor H. Vargas C. is a recipient of CONACYT (Mexico) scholarship. This work was partially supported by a Miguel Aleman Foundation Award given to Juan E. Ludert.

BIBLIOGRAFÍA

Arteaga P, Álvarez A, Flores A, López E, and Calvo C. (2000). Featured Papers on RT-PCR/PCR: Improved purification of DNA from *Entamoeba histolytica*. Life technologies Focus. 22:1, 14-16

Arunachalam N, Tewari SC, Thenmozhi V, Rajendran R, Paramasivan R, Manavalan R, Ayanar K, Tyagi BK. (2008). Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. Indian J Med Res. Apr;127(4):395-7.

Ashfaq Usman and Idrees Sobia. (2012). A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. BioMed Central Ltd. Genetic Vaccines and Therapy, 10:6

Becker I, Torres I, Cortés D. (2014). Dengue en México: análisis de dos décadas. Gaceta Médica de México.150: 122-7

Brackney DE, Scott JC, Sagawa F, Woodward JE, Miller NA, et al. (2010) C6/36 *Aedes albopictus* Cells Have a Dysfunctional Antiviral RNA Interference Response. PLoS Negl Trop Dis 4(10): e856. doi:10.1371/journal.pntd.0000856

Bradford M. Marion. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254

Carrington and Simmons (2014) Human to mosquito transmission of dengue viruses. Front. Immunol. 5:290. doi: 10.3389/fimmu.00290

Cedillo-Barron L, Garcia-Cordero J, Bustos-Arriaga J, Leon-Juarez M, Gutierrez-Castaneda B. (2014) Antibody response to dengue virus. Microbes and Infection;16(9):711–20.

CDC - Dengue - Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
<http://www.cdc.gov/dengue/> Revisado: 27 de julio de 2015-07-24.

Chye JK, Lim CT, Ng KB, Lim JM, George R, Lam SK. (1997) Vertical transmission of dengue. *Clin Infect Dis*. Dec;25(6):1374-7.

Conway M.J., Watson A.M., Colpitts T.M. , Dragovic S.M., Wang Z. Li, P., Feitosa F., Shepherd D.T., Ryman K.D., Klimstra W.B., Anderson, Fikrig E. (2014). Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host *J. Virol.*, 88 , pp. 164–175.

Dai, S.; Zhou, X.; Wang, B.; Wang, Q.; Fu, Y.; Chen, T.; Wan, T.; Yu, Y.; Cao, X. (2006) Enhanced induction of dendritic cell maturation and HLA-A*0201-restricted CEA-specific CD8(+) CTL response by exosomes derived from IL-18 gene-modified CEA-positive tumor cells. *J. Mol. Med. Berl* , 84, 1067-1076.

DGE. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. México. 2015.
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html Revisado 2015-07-27.

Deddouche, S., Matt, N., Budd, A., Mueller, S., Kemp, C., Galiana- Arnoux, D., Dostert, C., Antoniewski, C., Hoffmann, J. A. & Imler, J. L. (2008). The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *Drosophila*. *Nat Immunol* 9, 1425–1432.

Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, Hetru C, Hoffmann J & Imler J-L. (2005) The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *drosophila*. *Nature Immunology* 10.1038/ni1237 V6 N9 946-953.

Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, Décembre E, Chung J, Whitten-Bauer C, Wieland S, and Chisari F. (2012). Short range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell*

Host Microbe.12(4): 558–570.

Fajardo G., Meijem J., Vicente E., Venegas F., Aguirre H. (2012) El dengue en México. Conocer para mejorar la calidad de la atención. Rev Med Inst Mex Seguro Soc; 50 (6): 631-639 631.

Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. Nat Rev Immunol 7, 862–874.

Green A, Beatty R, Hadjilaou A and Harris E. (2014) Innate Immunity to Dengue Virus Infection and Subversion of Antiviral Responses. J. Mol. Biol. Elsevier Ltd 426, 1148–1160.

Gould EA, Clegg JCS (1985) Growth, titration and purification of alphaviruses and flaviviruses. In: Mahy BWJ, editor. Virology: A Practical Approach. Oxford: IRL Press. pp. 43–78.

Guzman M.G. et al. (2010) Dengue: a continuing global threat. Nature Reviews Microbiology. doi:10.1038/nrmicro2460.

Idrees S and Ashfaq U.A. (2012) A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. Genetic Vaccines and Therapy, 10:6.

Kingsolver M and Hardy R. (2012) Making connections in insect innate immunity. Commentary. PNAS. Proc Natl Acad Sci USA. vol. 109 no. 46. 18639–18640.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, et al (2002). Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. Cell, 108(5), 717–725.

Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. (2010) Consequences of the expanding distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e646. doi:10.1371/journal.pntd.0000646 .

Metselaar D, Grainger CR, Oei KG, Reynolds DG, Pudney M, Leake CJ, et al. (1980) An outbreak of type-2 dengue fever in The Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). *Bull World Health Organ* 58:937–43.

Miller S.G, Carnell L, Moore H.H. (1992). Post-Golgi membrane traffic: brefeldin A inhibits export from distal Golgi compartments to the cell surface but not recycling. *J Cell Biol.* Jul;118(2):267-83.

Moritz U, Marianne E, Kirsten A, Adrian Q, Freya M, Christopher M, Chester G, Roberta G, Giovanini E, Wim V, Guy H, Francis S, Iqbal R, Hwa J, Oliver J, Jane P, David M, Thomas W, David L, William W, Nick G, Simon I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife* ;4:e08347.

Murrell S, Wu S, Butler M. (2011). Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology Advances* 29, 239–247.

Paradkar PN, Trinidad L, Voysey R, Duchemin JB, Walker PJ (2012) Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 18915– 18920.

Petersen T, Brunak S, Heijne G, and Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8:785-786.

Randall, R. E. & Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89, 1–47.

Rennos Fragkoudis, Ghassem Attarzadeh-Yazdi, Anthony A. Nash, John K. Fazakerley and Alain Kohl. (2009) Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. *Journal of General Virology*, 90, 2061–2072.

Sam S-S, Omar SFS, Teoh B-T, Abd-Jamil J, AbuBakar S (2013) Review of Dengue Hemorrhagic Fever Fatal Cases Seen Among Adults: A Retrospective Study. *PLoS Negl Trop Dis* 7(5): e2194. doi:10.1371/journal.pntd.0002194.

Sheldon T, Miguel-A, Gould A, Taylor W, Conklin D (2007) A novel family of single VWC-domain proteins in invertebrates. *FEBS Letters* 581, 5268–5274.

Sim S, Jupatanakul N and Dimopoulos G. (2014). Mosquito Immunity against Arboviruses. *Viruses* , 6(11), 4479-4504; doi:10.3390/v6114479

Smit J. M, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I and Wilschut J. (2011) Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses* 3, 160-171; doi:10.3390/v3020160.

Souza-Neto J A, Sims, Dimopoulos G (2009) An evolutionary conserved function of the vía JAK-STAT en defensa anti-dengue. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 106: 17.841 a 17.846.

Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science*.10.1126/1153124: 1244-1247.

Urbanelli L, Magini A, Buratta S, Brozzi A, Sagini K, Polchi A, Tancini B and Carla Emiliani C. (2013). Signaling Pathways in Exosomes Biogenesis, Secretion and Fate. *Genes*, 4, 152-170.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee J, Lotvall J. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell. Biol.* , 9, 654-659.

Whitehead S, Blaney J, Durbin A, and Murphy B. (2007) .Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology*. 5: 518-528.

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. (2000) Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med*;6(7):816–20.

World Health Organization. (2014) <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/en/> Revisado: 23.07.2014.

ANEXO

Secuencia de DNA correspondiente a Vago de *A. albopictus*.

```
>ATGATAACTCACTTTCCCATCGTGTACGCATTTATATGTGTGGCAACATTCCGGGT  
AATCCTTAGTTAGGTCCTGCTTGATTTTTTACAATTAGGATCATCTACTACCGCTT  
TTATACAGCTGCAATCGAAAATGAATGTATTTCCCTTATATAATTCAAGTTGAAAA  
CACTTTTACCTGGTGTATGTCAACGAGAAGCCTTTTGAACAATATGCCATGGTACA  
TTCTCCGGGGATAGATTTCTCCTCGTCAGGATCAAACACTAGTCCTGAACCTTCGT  
CATAGCACTTGCCTGGGTGATCTGGAAACAATTTCGCAGAAATCATTGCTGCTTTC  
GTTATCAATTATCTTCAACGGCAACAGGCCAACTTCGATTACGAACCTGGATGGGT  
CGCTTTGAGCAAGACACTCTGACCGGCAAAGGTTACTGCGATCAAACAGCAGAGA  
GCAAAACTCACTACAGCCAACGTCTCATGGATCCAAGGGCGA
```

Electroferograma correspondiente al DNA de Vago de *A. albopictus*.

