



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR**

**“Participación de la proteína no estructural 1 (NS1) del Virus  
Dengue en la propagación del virus en el mosquito”.**

**TESIS**

**QUE PRESENTA**

**QUEZADA RUIZ EDGAR**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**DIRECTORES DE TESIS**

**JUAN ERNESTO LUDERT LEÓN  
CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA**

**CIUDAD DE MÉXICO**

**AGOSTO 2020.**

**Tutores:**

- Dr. Juan Ludert León (Infectómica y Patógenesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México).
- Dr. Humberto Lanz Mendoza (Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca).

**Asesores:**

- Dr. Salvador Hernández Martínez (Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca).
- Dra. Lorena Gutiérrez Escolano (Infectómica y Patógenesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México).
- Dra. Abigail Betanzos Fernández (Infectómica y Patógenesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México).

**Agradecimientos académicos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) por la beca otorgada durante el periodo de duración de la maestría realizada.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN y al programa de maestría del Departamento de Infectómica y Patógenesis Molecular por permitirme utilizar las instalaciones y el equipo para la realización de este proyecto.

Al Instituto Nacional de Salud Pública por permitirme utilizar las instalaciones y el equipo como parte de la colaboración realizada en este trabajo.

A la Dra Ana Alcalá del Instituto de Biotecnología, UNAM por la donación de la proteína NS1 recombinante.

A mis asesores por el seguimiento del proyecto y sus comentarios respecto a éste. **Agradecimientos personales**

A mis tutores, los cuales contribuyeron en mi formación académica.

A mis asesores, por sus comentarios y apoyo para la realización de este trabajo.

A mí familia y amigos.

## Índice

Contenido.....	3
Índice de figuras .....	5
Índice de tablas .....	5
Abreviaturas .....	6
Resumen.....	7
Introducción .....	8
Ciclo replicativo .....	8
Estructura del genoma viral. ....	9
Proteína no estructural 1 (NS1).....	11
Estructura de la proteína NS1 .....	12
La NS1 de DENV es una proteína multifuncional .....	13
Efecto de la proteína NS1 soluble en los endotelios de mamíferos. ....	14
Diseminación del virus en el mosquito .....	18
Epitelio intestinal y matriz peritrófica en insectos.....	20
Mecanismos de salida del intestino de diferentes arbovirus .....	21
Antecedentes .....	23
Justificación .....	25
Hipótesis.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares .....	25
Diseño experimental .....	26
Materiales y Métodos .....	29
Mosquitos.....	29
Cultivo celular.....	29
Virus. ....	29
Ensayo de foco .....	30
Obtención de la proteína NS1 recombinante y su desnaturalización por calor .....	30
Testigos y tratamientos experimentales.....	31
Ensayos de permeabilidad .....	31
Diseminación del virus dentro del mosquito .....	32
Extracción de ARN y RT-PCR punto final .....	32
Diseción del intestino y patas del mosquito.....	33

Análisis estadístico .....	33
Resultados .....	34
Estandarización del modelo de permeabilidad intestinal.....	34
Ensayo de permeabilidad intestinal.....	40
Diseminación del virus dentro del mosquito .....	42
Discusión .....	44
Conclusiones .....	50
Perspectivas .....	50
Bibliografía .....	51

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura del genoma del género Flavivirus y su expresión proteica. ....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura del DENV.....	10
<b>Figura 3.</b> Conformaciones y regiones de la proteína no estructural 1 de DENV.. ....	13
<b>Figura 4.</b> Estructura del endotelio y glicocálix. ....	15
<b>Figura 5.</b> Esquema general del mecanismo de acción ocasionado por la NS1 de DENV. ....	17
<b>Figura 6.</b> Establecimiento del virus DENV dentro del vector. ....	19
<b>Figura 7.</b> Esquema general del tracto digestivo de un díptero. ....	21
<b>Figura 8.</b> Estrategias de escape de los arbovirus. ....	22
<b>Figura 9.</b> Esquema de alimentación y condiciones. ....	26
<b>Figura 10.</b> Estrategia experimental para el objetivo 1. Ensayo de permeabilidad. ....	27
<b>Figura 11.</b> Estrategia experimental para el objetivo 2. Diseminación del virus dentro del mosquito. .....	28
<b>Figura 12.</b> Alimentación de mosquito <i>A. aegypti</i> con el colorante vegetal.....	36
<b>Figura 13.</b> Alimentación y perfusión de mosquitos <i>A. aegypti</i> .....	35
<b>Figura 14.</b> Salida del colorante a la hemolinfa de <i>A. aegypti</i> utilizando tres agentes permeabilizantes.....	37
<b>Figura 15.</b> Curva de supervivencia del Dithiothreitol (DTT). ....	38
<b>Figura 16.</b> Cinética de 24, 48 y 72h del ensayo de permeabilidad. ....	39
<b>Figura 17.</b> Ensayo de permeabilidad en un tiempo temprano (12 y 24h). ....	40
<b>Figura 18.</b> Ensayo de permeabilidad en <i>A. aegypti</i> .....	42
<b>Figura 19.</b> Imagen representativa de las electroforesis realizadas para determinar las muestras positivas para DENV-2. ....	43
<b>Figura 20.</b> Cinética de infección a las 12, 24 y 48h utilizando sobrenadantes de células sin purificar. .....	44

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Colorantes evaluados en el ensayo de permeabilidad.....	34
<b>Tabla 2</b> Agentes permeabilizantes evaluados en el modelo de permeabilidad en <i>A. aegypti</i> . ....	36
<b>Tabla 3</b> Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de permeabilidad intestinal.....	41

## Abreviaturas

**Arbovirus:** *Arthropod-borne virus*

**CHIKV:** Virus de Chikungunya

**DENV:** Virus de Dengue

**dpi:** días post infección

**HPEMC:** Células endoteliales microvasculares pulmonares humanas primarias

**MEM:** Medio esencial mínimo

**NS1:** Proteína no estructural 1

**NS1r:** Proteína no estructural 1 recombinante

**PBS:** Buffer de fosfatos

**TLR4:** *Toll like receptor 4*

**VE6:** Células Vero

**WNV:** Virus de West-Nile

**YFV:** Virus de Fiebre Amarilla

**ZIKV:** Virus de Zika

## Resumen

El dengue es una enfermedad viral transmitida por la picadura de mosquitos hembra de las especies *Aedes aegypti* y *A. albopictus*. El ARN del virus dengue presenta un solo marco de lectura abierto que al traducirse da origen a 3 proteínas estructurales (c, prM y E) y a 7 proteínas no-estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). En el huésped vertebrado, la proteína no estructural 1 (NS1) se ha asociado a la patogénesis de la enfermedad. Ésta provoca la desestabilización de los endotelios a través de la degradación del glicocálix y la movilización de las proteínas que participan en las uniones estrechas de los endotelios, favoreciendo la dispersión de la infección hasta el tejido blanco. En el mosquito, se sabe que la NS1 de DENV puede inmunomodular de manera negativa la respuesta antiviral en los vectores; sin embargo, se desconoce si la capacidad reportada de NS1 de permeabilizar a los endotelios, también pueda ocurrir en el epitelio intestinal del vector, y favorecer así la dispersión del virus dentro del mosquito.

En el presente trabajo, se evaluó la capacidad permeabilizante de la proteína NS1 en el epitelio intestinal del estómago de mosquitos, a través de un ensayo de permeabilidad, basado en el uso de un colorante administrado por vía oral y luego cuantificado en la hemolinfa. Como control positivo para desestabilizar las uniones del epitelio intestinal, se utilizó el agente reductor ditioneitol (DTT). La administración de NS1 recombinante, o de sobrenadantes recolectados de células infectadas con DENV 2 (conteniendo viriones y proteína NS1 soluble), resultó en la salida aumentada del colorante desde el estómago de los mosquitos hacia el hemocele. Sin embargo, el aumento no resultó estadísticamente significativo en relación con el control. También se fijaron intestinos de mosquito para evaluar la integridad del tejido mediante técnicas histológicas. Este trabajo contribuye a esclarecer el papel de la proteína NS1 en el establecimiento de DENV en el mosquito.

## Introducción

El Dengue es una infección viral transmitida por la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes*; principalmente las especies *A. aegypti* y *A. albopictus* (Chen y Vasilakis, 2011). Esta enfermedad es causada por el virus del dengue (DENV por sus siglas en inglés). Pertenece a la familia de virus *Flaviviridae*, dentro del género *Flavivirus*, y existen cuatro serotipos distintivos (enumerados del 1 al 4) (Lanciotti, Gluber y Trend, 1997).

Anualmente, se estiman 390 millones de infecciones, de las cuales 100 millones de éstas presentan manifestaciones clínicas y ocurren 25 mil defunciones en un periodo del 2010 al 2015) (Ahmad y Poh, 2019). En nuestro país, para el 2019 se obtuvieron 44 mil casos y 191 defunciones ocasionadas por esta enfermedad (Secretaría de Salud, 2019). El paciente infectado con el DENV puede presentar desde una enfermedad febril leve, la fiebre por dengue, la cual cursa con dolor de cabeza, dolor articular y petequias entre otros síntomas, hasta un dengue severo, el cual se caracteriza por presentar fuga de plasma, hemorragias y compromiso respiratorio y puede comprometer la vida del paciente (Guzman y Harris, 2015). Esta enfermedad ocasiona un alto impacto socioeconómico en muchos países de las regiones tropicales y subtropicales, además de ser la arbovirosis más frecuente (Wilder-Smith y otros, 2019), teniendo un impacto económica relevante, con costos reportados para el continente americano de 2 mil millones de dólares, principalmente asociados a costos de hospitalización, ello sin estimar los costos del control vectorial (Guzman y Harris, 2015).

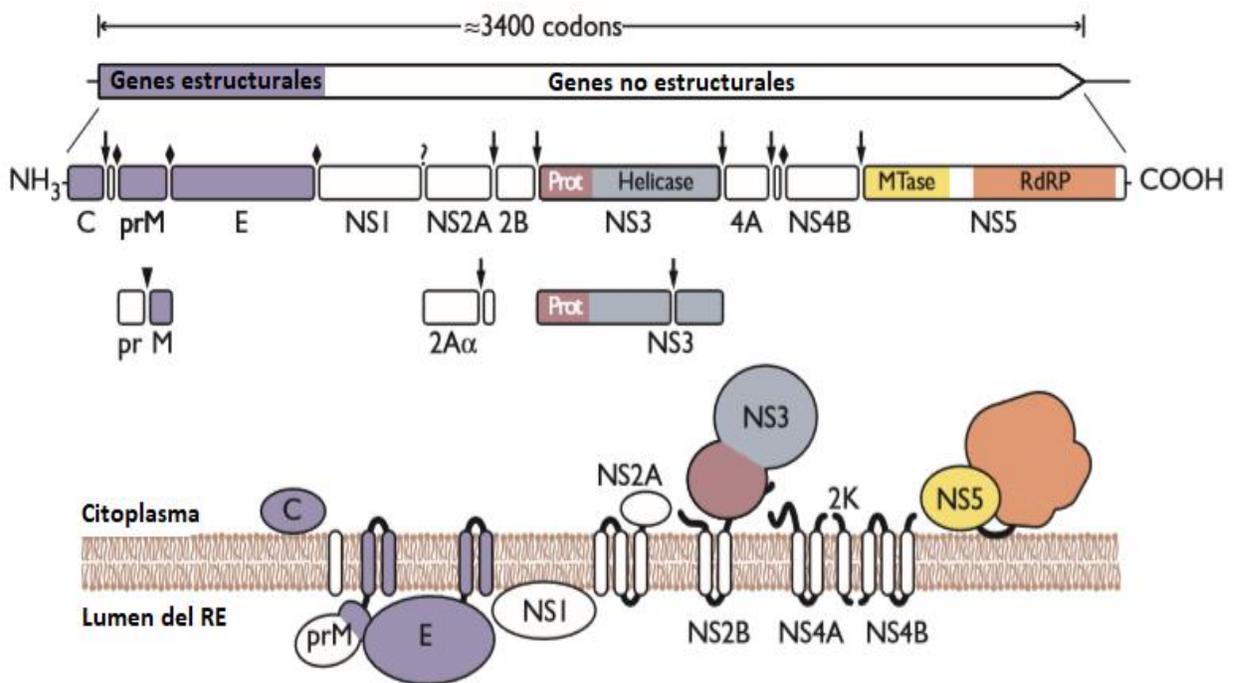
## Ciclo replicativo

El DENV requiere un receptor para la infección de la célula huésped. Los receptores reportados para las células de mamífero y de insecto son varios e incluyen moléculas como lectinas, claudinas, glicosaminoglicanos y receptores de baja afinidad como heparán sulfatos, proteoglicanos, entre otros (Lauteri y otros, 2018). Los viriones se internalizan mediante endocitosis mediada por receptor. El pH bajo de los endosomas induce un cambio conformacional en la proteína E que favorece la fusión del virión con las membranas de los endosomas, y provoca el desnudamiento de la nucleocápside. Esto conlleva a la liberación del genoma viral en el citoplasma, teniendo éste dos funciones: traducirse en una poliproteína que dar lugar a todas las proteínas virales; y replicarse posteriormente para producir el genoma de la progenie viral (Fields, Knipe y Howley, 2014). La generación de las proteínas virales maduras se da por el procesamiento de la poliproteína traducida

por proteasas de la célula hospedera y una proteasa viral. Las proteínas no estructurales inician la replicación del genoma viral. Estas nuevas copias de RNA genómico viral interactúan con las proteínas estructurales, formando los nuevos viriones. Las partículas inmaduras son liberadas al medio extracelular por una vía de secreción clásica; pero antes de ser liberadas, en el aparato de Golgi la proteína pre-M es procesada por una furina del hospedero, para su maduración y la liberación de nuevas partículas infectivas (Rodenhuis-Zybert, Wilschut y Smith, 2010).

### Estructura del genoma viral

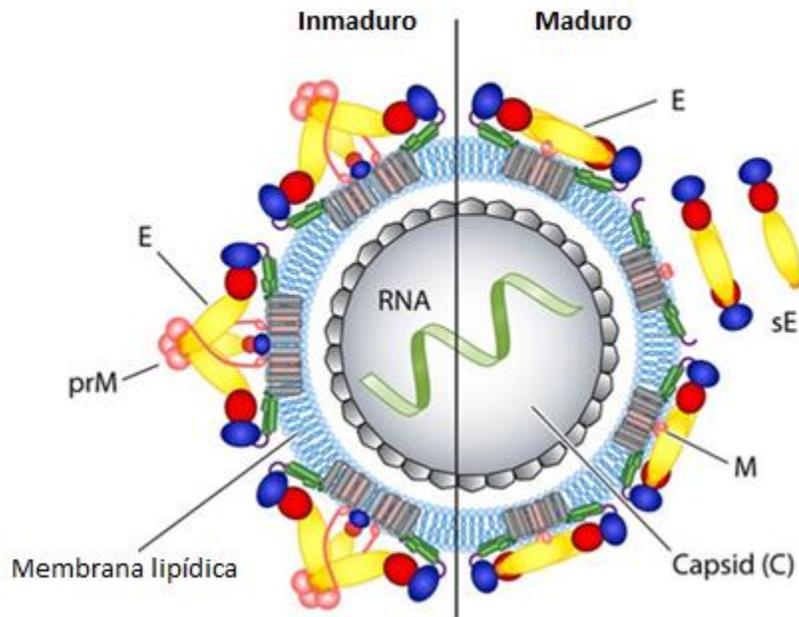
El genoma del DENV está compuesto por un ARN de cadena positiva de aproximadamente 11 kb. El ARN de DENV tiene un solo marco de lectura abierto, que al traducirse se sintetiza a una poliproteína que es procesada por proteasas virales y celulares para dar origen a todas las proteínas virales; en la región N-terminal se encuentran codificadas las 3 proteínas estructurales y la siguiente región se codifican las 7 proteínas no estructurales (Figura 1) (Flint y otros, 2014).



**Figura 1. Estructura del genoma del género *Flavivirus* y su expresión proteica.** El genoma viral se representa con un solo marco de lectura abierto (ORF) con una molécula cap en el extremo 5' y carente de una cola de poliadenilación, y las regiones no codificantes flanquean el genoma. El

procesamiento de la poliproteína se encuentra indicado por proteasas de la célula infectada (♦) y por la serina proteasa viral (flechas negras). La orientación de las proteínas en la membrana se encuentra esquematizada. Imagen tomada y modificada de (Flint y otros, 2014).

El virión del DENV es envuelto y está compuesto por tres proteínas estructurales: la proteína E (envoltura), prM/M (precursor de la membrana o membranal, respectivamente) y C (proteína de la cápside). Por su naturaleza, la proteína C interactúa con el genoma viral para formar la nucleocápside, y ésta en conjunto con la proteína prM y E conforman las partículas virales (Heinz y Stiansy, 2012) (Figura 2).



**Figura 2. Estructura del virus Dengue.** En el esquema se encuentra del lado izquierdo los componentes estructurales del virión inmaduro, la proteína prM antes de ser procesada por la furina del hospedero. En el lado derecho se encuentra esquematizado el virión maduro. La proteína M alcanza su maduración al ser procesada en el aparato de Golgi. También se encuentran señalados otros componentes como la cápside (C), la proteína E y la membrana lipídica. Tomado y modificado de Henz y Stiansy, 2012.

Por otro lado, las 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) son cruciales para la formación de los complejos de replicación. También participan en otros procesos, como el abatimiento de la inmunidad innata e interactuando con las proteínas de la célula infectada,

entre otros (Wilder-Smith y otros, 2019). La proteína NS1 es esencial para la replicación viral, posiblemente interactuando con las proteínas no estructurales NS4A y NS4B (Hong-Ru, Yen-Chung y Trai-Ming, 2018). La proteína NS1 también puede interactuar con las proteínas estructurales para formar los complejos de replicación y participa en el ensamblaje de los viriones, ya que tiene funciones de proteína de andamiaje (Scaturro y otros, 2015). (NS2A está involucrada en la coordinación del cambio entre el empaquetamiento del ARN y su replicación, NS2B es una proteína que funciona de cofactor para NS3, que es la proteasa viral que además de generar a las proteínas a partir de la poliproteína, tiene un papel fundamental en el establecimiento de la infección. NS4A y NS4B además de participar en la replicación viral se encuentran reportadas como inhibidores de la vía del interferón (Waver y Vasilakis, 2009). La NS5 es la ARN polimerasa del propio virus y junto con las demás proteínas estructurales se forman los sitios de replicación para dar origen a nuevas partículas virales (Wilder-Smith y otros, 2019).

## Proteína no estructural 1 (NS1)

La proteína NS1 es una glicoproteína de 48kDa aproximadamente, que se sintetiza en las células infectadas de forma monomérica, la cual se transloca al retículo endoplásmico durante su síntesis, formando inmediatamente homodímeros con una alta afinidad por las membranas (Glasner y otros, 2018).

Cabe destacar, que NS1 es la única proteína no estructural que es secretada al medio extracelular. Esta proteína se encuentra circulando en el suero de pacientes durante la etapa aguda de la enfermedad (Glasner, y otros, 2018), por lo cual se utiliza como marcador diagnóstico. Así mismo, la NS1 circulante ha sido asociada a la patogénesis de la enfermedad, a través de varios mecanismos, que incluyen fijación de complemento, y desestabilización de la homeostasis vascular (Pang, y otros, 2017). Además, la proteína NS1 es capaz de generar anticuerpos, con reactividad cruzada con células del hospedero (plaquetas y células endoteliales) que también contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Reyes-Sandoval y Ludert, 2018).

## Estructura de la proteína NS1

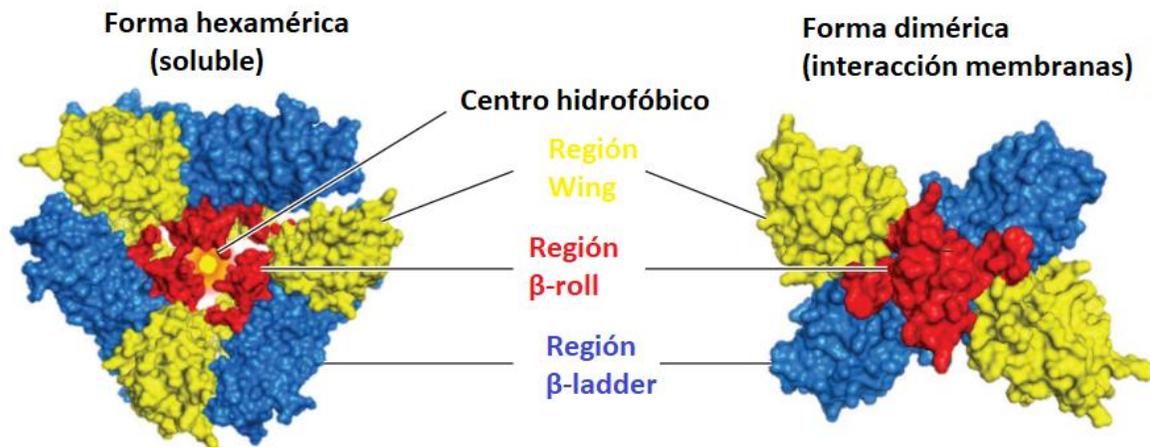
La NS1 es expresada de manera monomérica en las células infectadas. Posteriormente, sufre modificaciones post-traduccionales, como son las glicosilaciones en un aspartato en la posición 130 y 207, las cuales tienen importancia biológica (Muller y Young, 2013).

Los monómeros de la proteína interactúan entre ellos, pudiendo dimerizar, y esta conformación le permite asociarse con las membranas intracelulares y de la superficie celular. La NS1 también puede adquirir una conformación hexamérica, la cual es la forma secretada por las células infectadas, facilitado a través de las glicosilaciones mencionadas (Glasner y otros, 2018). Cada uno de los monómeros presenta tres regiones: una región central, llamada  *$\beta$ -roll* (1-29 aminoácidos), la que permite la dimerización de las proteínas y dentro de la cual existen dos pequeñas regiones  *$\beta$ -hairpin* estabilizadas por puentes disulfuro. La segunda región se conforma desde el aminoácido 30-180, las cuáles son protuberancias en su conformación terciaria llamada *wing*, en esta región se encuentran las glicosilaciones mencionadas anteriormente. Por último, la región  *$\beta$ -ladder* (181-352 aminoácidos), en la cual se unen los otros dominios (Akey y otros, 2014) (Figura 3).

La forma dimerica es resistente a tratamientos con detergentes iónicos, pero es susceptible a cambios en la temperatura o a pH ácidos. La dimerización no es necesariamente esencial para la infectividad viral y se desconoce el mecanismo por el cual esta proteína puede interactuar con las membranas celulares (Muller y Young, 2013).

La forma hexamérica de NS1 presenta la forma de un barril hueco asociado a lípidos (Muller y Young, 2013). En la conformación hexamérica, las tres caras de la región  *$\beta$ -roll* se encuentran en la parte interna del hexámero, mientras que en su superficie se encuentra principalmente la región *wing* con los sitios de glicosilación accesibles. Los epítomos principales pertenecen al dominio *wing* expuesto. Se desconoce en qué punto este hexámero puede ser reconocido por el sistema inmune, ya sea manteniendo esta conformación o cuando se disocia en los monómeros (Akey y otros, 2014). Esta proteína también es secretada por células de insecto, aunque carece de una glicosilación compleja, ya que la maquinaria de glicosilación en los insectos es poco eficiente (Alcalá, Palomares y Ludert, 2018). Además, en los mamíferos, la NS1 presenta un tipo de anclaje GPI, probablemente con el que puede interactuar con las membranas celulares, la proteína NS1 secretada por células de insecto

infectadas carece de este componente, sugiriendo una función diferente en estos organismos (Alcalá, Palomares y Ludert, 2018).



**Figura 3.** Conformaciones y regiones de la proteína no estructural 1 de DENV. La NS1 presenta tres regiones: la parte más externa es la región *wing*, la región  $\beta$ -roll, la cual le permite interactuar con proteínas de su mismo tipo para dimerizarse o conjuntarse en una forma hexamérica, y la región  $\beta$ -ladder que tiene relevancia inmunológica. La forma dimérica le permite interactuar con las membranas celulares a través de la región  $\beta$ -ladder y *wing*. La forma hexamérica es secretada al medio extracelular, teniendo un centro hidrofóbico. Tomado y modificado de (Glasner y otros, 2018).

### La NS1 de DENV es una proteína multifuncional

Se han relacionado múltiples procesos en los cuales la proteína NS1 de DENV se encuentra relacionada, tanto de manera intracelular como su forma extracelular, ya que esta proteína puede interactuar con diversas proteínas de los hospederos.

Dentro de la célula, la NS1 interactúa con proteínas virales para la replicación viral, traducción de su genoma y la producción de nuevas copias de éste: ya sea, relocalizando proteínas ribosomales en el sitio de replicación, secuestrando elementos que participan en la homeostasis celular, y

proporcionando energía en los sitios replicativos a través de la re-localización de GADPH cerca de estos sitios (Rastogi, Sharma y Singh, 2016).

Su forma soluble de NS1 ha sido reportada en circulación de individuos que cursan la infección a altas concentraciones, además también se detectan anticuerpos anti-NS1. La concentración de NS1 estimada en sueros de pacientes va desde 0.001 a 50 µg/ml, además, la severidad de la enfermedad está asociada a la concentración de esta proteína (Chuang y otros, 2013).

La NS1 de DENV puede interactuar con diferentes proteínas que participan en la homeostasis vascular del hospedero vertebrado, como es uniéndose a componentes de la vía del complemento (Conde y otros, 2016). En mamíferos, la proteína es reconocida por el receptor TLR4, induciendo la liberación de proteínas pro-inflamatorias (Modhiran y otros, 2015). También se ha asociado su papel de manera directa con diferentes componentes de los vertebrados; por ejemplo, NS1 es capaz de interactuar con varias proteínas del sistema de complemento e interferir su función (Conde y otros, 2010). A su vez, es altamente inmunogénica (Reyes-Sandoval y Ludert, 2018). Los anticuerpos generados contra ésta pueden tener una reacción cruzada con diversas proteínas del hospedero, como son integrinas, proteínas involucradas en la adhesión celular, componentes de la coagulación, entre otros (Chuang y otros, 2013).

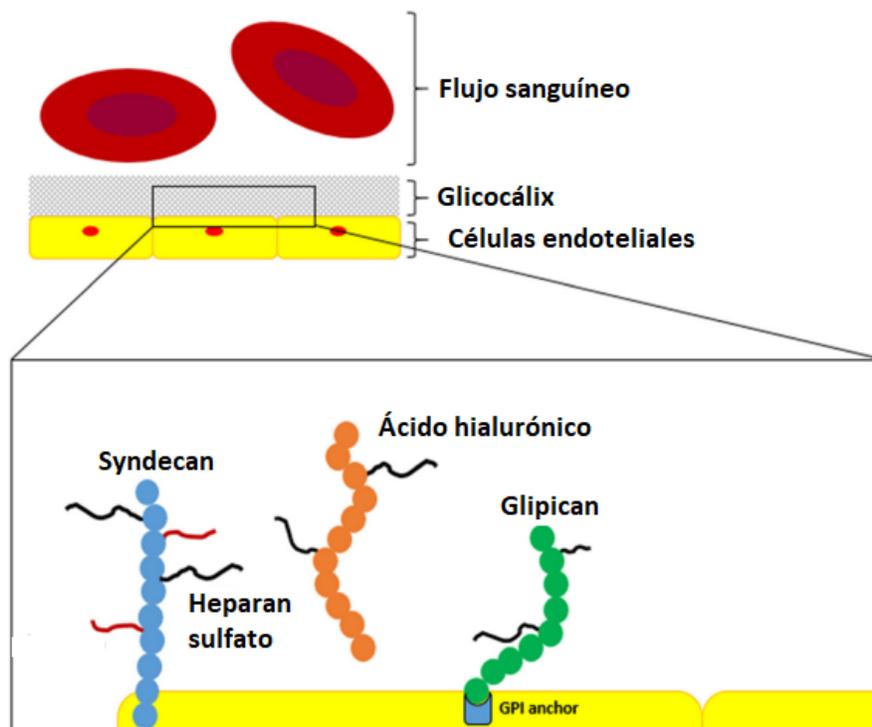
La NS1 soluble se ha asociado a la patogénesis del dengue severo a través de varios mecanismos (Libraty y otros, 2002). La fuga de plasma es causada por un aumento de la permeabilidad de los endotelios; ésta se presenta en combinación con diferentes fenómenos (títulos virales altos, liberación de citocinas pro-inflamatorias, inhibición de la cascada de coagulación) (Watterson, Modhiran y Young, 2016). La pérdida de estabilidad de la composición del glicocálix endotelial y la modificación de su estructura pueden contribuir con la patogénesis del dengue severo, fenómeno en donde NS1 tiene un papel crucial (Glasner y otros, 2018).

### Efecto de la proteína NS1 soluble en los endotelios de mamíferos

El grupo de investigación de la Dra. Eva Harris y los trabajos publicados por el Dr. Puerta-Guardo en los últimos años, han contribuido en el entendimiento de los procesos de participación de la proteína NS1 en la patogénesis del dengue. La proteína NS1 no presenta regiones que le confieran una actividad catalítica; sin embargo, los primeros estudios realizados en un modelo murino, mostraron que la inoculación de la proteína NS1 de DENV, inducía un aumento de la vascularidad de los endotelios, y la producción de proteínas proinflamatorias (Beatty y otros, 2015).

Los endotelios de los vertebrados son un tejido especializado que recubre los capilares del organismo. Este tejido es una monocapa simple de células endoteliales que forma parte del sistema circulatorio de los mamíferos. La integridad del endotelio vascular y de las uniones estrechas que lo estabilizan, son fundamentales en la homeostasis vascular. Esta barrera es altamente selectiva y la disfunción de este tejido, se presume participa en la patología de las formas severas del dengue, caracterizada por la fuga de plasma.

El endotelio vascular se encuentra recubierto a su vez por el glicocálix endotelial (Carvajal-Carvajal, 2017 (Figura 3). El glicocálix endotelial está compuesto de los siguientes elementos: componentes solubles unidos directamente a proteínas de anclaje al endotelio, como son proteoglicanos, glucosaminoglicanos y sialoproteínas. Los proteoglicanos más abundantes son el sindecan y glipicano. Los glucosaminoglicanos que adornan estas proteínas más abundantes son el ácido hialurónico y el ácido siálico. Todos estos componentes participan en la regulación de la permeabilidad endotelial, por lo que si los elementos son afectados, aumentaría la permeabilidad del endotelio (Schott y otros, 2016) (Figura 4).



**Figura 4 . Estructura del endotelio y glicocálix.** El sindecan y glipican son proteoglicanos unidos a la membrana de las células endoteliales. Los sindecanos están anclados a la membrana plasmática a

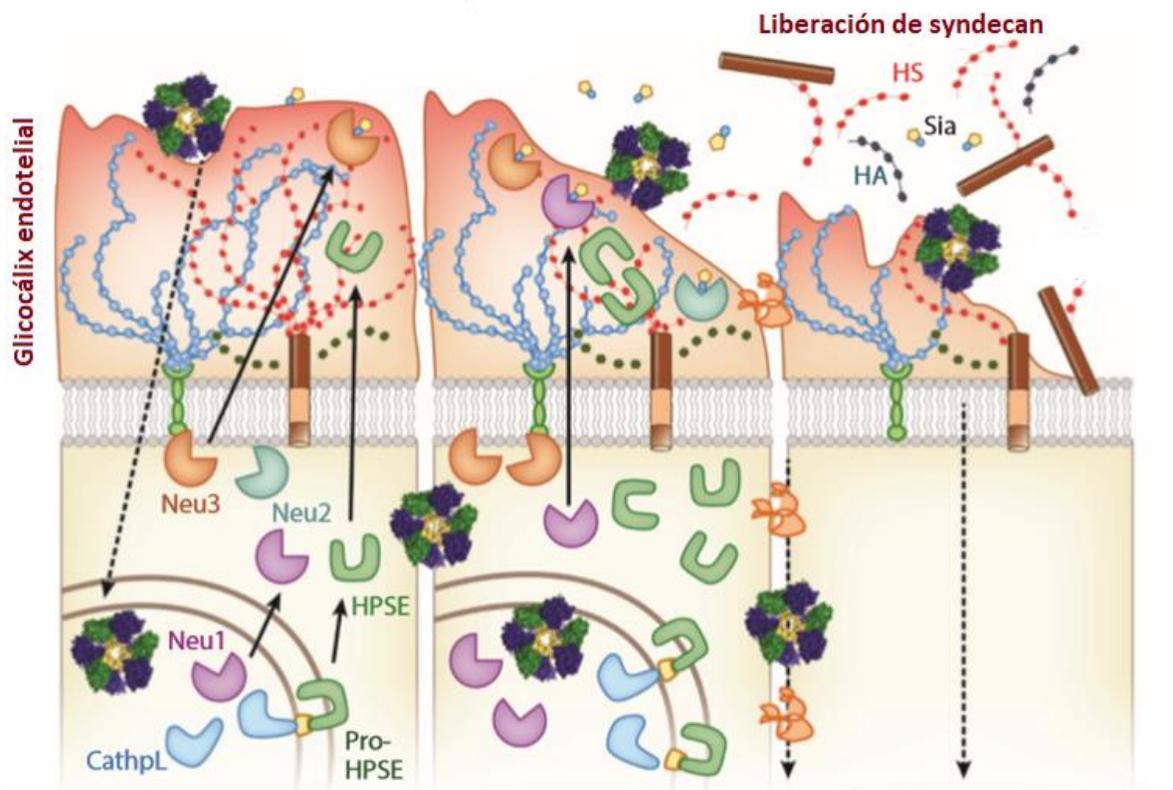
través de un anclaje GPI. Estas proteínas están acompañadas cadenas laterales de glicosaminoglicanos como son condroitín sulfato, heparan sulfato y ácido hialurónico. Tomado y modificado de (Schott y otros, 2016).

Se sabe que la NS1 además participa en la patogénesis del dengue severo a través de su interacción con el receptor TLR4, favoreciendo el fenómeno de hipervascularización a través de la activación de TLR4 y la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ - e IL-6 (Hong-Ru y otros, 2018). Además, el mecanismo de acción de la NS1 de DENV parece estar relacionado directamente con la degradación del  $\alpha$ -glicocáliz de los endotelios. Puerta-Guardo, Glasner, y Harris, (2016) mostraron que dosis crecientes de NS1 en cultivos de células de endotelio de pulmón (HPEMC), resultaban en una pérdida de la resistencia transendotelial de éstos (Puerta-Guardo, Glasner, y Harris, 2016), asociada a una degradación de glicocalix en estos cultivos.

Posteriormente, ahondando en el mecanismo de acción y en la secuencia de eventos, este mismo grupo observó que la NS1 se transloca al endotelio mediante endocitosis mediada por clatrina (Wang y otros, 2019), y esto provoca la activación de la catepsina L, la cual es una proteína lisosomal que se encuentra inactiva en los endotelios de mamíferos. La activación de la catepsina L conlleva a la maduración de heparanasas, que son translocadas al medio extracelular degradando el heparán sulfato del glicocáliz endotelial, y a su vez liberando componentes solubles como es el sindecán 1, promoviendo la liberación de más proteasas, lo que culmina con la degradación de la capa de glicocáliz que recubren los endotelios. También, existe un aumento de sialidasas (neuramidasas) y su liberación de la célula, degradando otros componentes y participando en la pérdida de la homeostasis endotelial. Al darse la ruptura de esta barrera, ocurre un fenómeno conocido como hipervascularización y posiblemente sea una de las causas de la fuga de plasma asociada a las formas graves de la enfermedad (Puerta-Guardo, Glasner y Harris, 2016; Puerta-Guardo y otros, 2019) (Figura 5).

Recientemente, se ha descrito que las proteínas NS1 de otros flavivirus, tales como el virus del Zika (ZIKV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV), también tienen la capacidad de desestabilizar las uniones estrechas de endotelios, de manera tejida específica; por ejemplo, la NS1 del ZIKV mostró actividad desestabilizante de las uniones estrechas de tejidos placentarios, y la NS1 del YFV, mostró actividad en tejidos de hígado, sugiriendo que de esta manera NS1 participa no solo en la fuga de plasma observada en los pacientes con dengue severo, sino que también favorece la dispersión de la

infección de los diferentes flavivirus hasta el tejido blanco (Glasner y otros, 2018; Puerta-Guardo y otros, 2019)..



**Figura 5. Esquema general del mecanismo de acción ocasionado por la NS1 de DENV.** La translocación de la proteína NS1 de DENV a las células endoteliales induce una mayor expresión y activación de la cathepsin L (CathpL), heparanasas (HPSE) y las sialidasas (Neu 1,2 y 3), provocando la afectación del glicocálix endotelial. HA: Ácido hialurónico; Sia (Ácido siálico). Tomado y modificado de (Glasner y otros, 2018).

La NS1 soluble también puede modular las uniones adherentes del tejido endotelial. De manera indirecta, puede inducir la movilización de las proteínas que conforman estas uniones, como ZO-1, VE-cadherina (Modhiran y otros, 2015; Chen y otros, 2016).

## Diseminación del virus en el mosquito

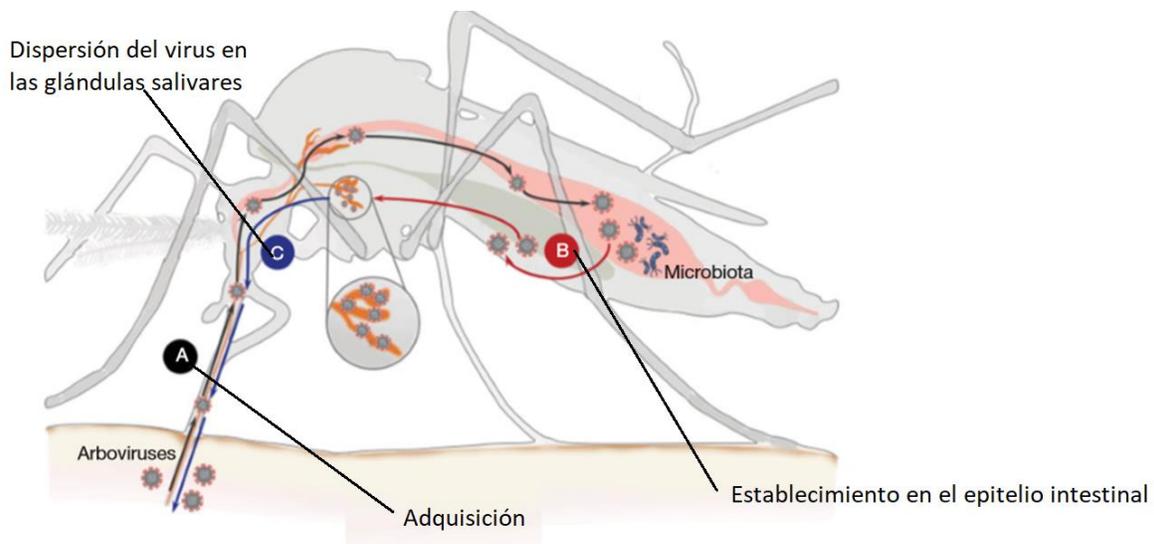
Las proteínas virales poseen la capacidad de actuar en múltiples procesos para el establecimiento de la infección en los organismos, y estos mecanismos generalmente se encuentran conservados a lo largo de la evolución. Esta capacidad de alterar los componentes que median la permeabilidad en los tejidos del vertebrado podría también darse en los tejidos del mosquito, favoreciendo así la dispersión del virus dentro de éste.

Entender la biología del mosquito es crucial para también entender la biología del virus. El establecimiento de la infección en el mosquito presenta una interacción compleja entre los componentes físicos, químicos y biológicos que se encuentran dentro del vector. Podemos dividir este proceso en tres pasos (Figura 6):

- A) La adquisición del virus a través de la alimentación sanguínea de mosquitos hembra. Se tiene estimado una ingesta de virus de un aproximado a  $10^4$ - $10^6$  partículas infectivas (Novelo y otros, 2019). El mosquito cuando se alimenta adquiere, además del virión, a la proteína NS1 (Wu y otros, 2019). NS1 puede inmunomodular de manera negativa la respuesta antiviral en los vectores, favoreciendo la adquisición del virus (Liu y otros, 2016).
- B) La salida del virus del intestino del mosquito. La primera barrera física a la cual se enfrentan los arbovirus (*Arthropod-borne viruses* en inglés) en el mosquito es el epitelio intestinal. La conformación de este tejido presenta diversas barreras que serán explicadas con detalle más adelante. El establecimiento del virus en las células del epitelio intestinal es un paso crucial para la generación de nuevos entes infectivos; superar esta barrera conlleva la invasión del virus a todos los tejidos del vector (Franz y otros, 2015). Se sabe que DENV invade todos los tejidos del vector en una temporalidad diferencial. Trabajos reportados por Salazar y colaboradores (2007) demostraron que la invasión del epitelio intestinal se da en las primeras 24-72 horas post-infección, y posteriormente se invade el tegumento y las glándulas salivares. La presencia del virus dentro del insecto se mantiene a lo largo de su vida. Estudios más recientes demostraron que una ingesta alta de partículas virales ingeridas por el mosquito contribuye a un mejor establecimiento del virus en el vector; sin embargo, además el serotipo de DENV y el órgano que invade influyen en el establecimiento del virus y los tejidos presentan una infección diferencial a lo largo de la vida del mosquito (Novelo y otros, 2019). Se desconoce si la capacidad

reportada de NS1 de permeabilizar a los endotelios, también pueda ocurrir en el epitelio intestinal del mosquito al ingerir la NS1 presente en la sangre de los vertebrados infectados, y así, facilitar también la diseminación del virus dentro del mosquito.

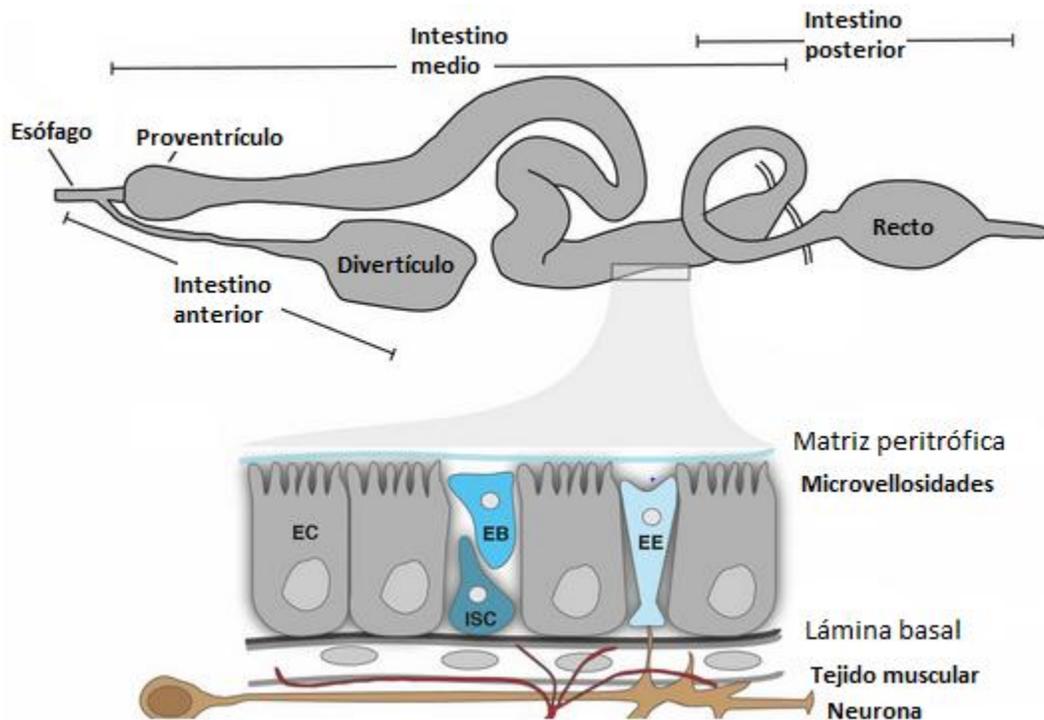
- C) Diseminación de la infección por todo el cuerpo del mosquito. Por último, una vez superada esta barrera física que es el epitelio intestinal, la dispersión del virus se da a través de la hemolinfa del mosquito. El sistema de circulación de los insectos facilita la invasión al cuerpo graso, ovarios, glándulas salivares y al sistema nervioso. Estos tejidos son permisivos al establecimiento del virus (Wu y otros, 2019). Una vez que las glándulas salivares de los mosquitos han sido infectadas, el virus puede transmitirse a un nuevo huésped vertebrado, a través de la saliva inyectada tras la picadura para la alimentación (Franz y col., 2015).



**Figura 6. Establecimiento del virus DENV dentro del vector.** El virus es adquirido por la ingesta sanguínea (A), donde se enfrenta a la primera barrera donde tiene que establecerse, la cuál es el epitelio intestinal (B), una vez superado este órgano, puede distribuirse a través de la hemolinfa a diferentes tejidos dentro de la cavidad hemocélica, el más importante son las glándulas salivares, donde una vez establecido ahí, puede transmitirse por la picadura de mosquitos infectados (C). Tomado y modificado de (Wu y otros, 2019).

## Epitelio intestinal y matriz peritrófica en insectos

El epitelio en todas las regiones del intestino es de tipo simple, con una lámina basal rodeado de músculos circulares y algunos longitudinales. Este órgano secreta un *film* llamado matriz peritrófica, formada por una conexión de fibras de quitina sobre las cuales se ensamblan proteínas (peritrofinas) y glicosaminoglicanos. Esta matriz se forma aproximadamente 4-8 h post alimentación en los mosquitos del género *Aedes* (Figura 7) (Lehane y Billingsley, 1996; Villalon, Ghosh y Jacobs-Lorena, 2003). Las funciones de esta matriz son la de una barrera e incluyen la prevención o reducción de la invasión por patógenos, la modulación de la digestión de la sangre y la protección ante daños físicos y/o químicos (Beaty y Marquardt, 1996). Las células epiteliales, ubicadas debajo de la matriz peritrófica, se encuentran modificadas en la región apical, teniendo proyecciones llamadas microvellosidades. Éstas se encuentran recubiertas por restos de carbohidratos de proteínas integrales y glicolípidos formando el glicocálix (Terra y otros, 2019). De igual manera, la principal función del glicocálix es la de proteger a las células contra los daños mecánicos, químicos y la invasión de patógenos (Shao, Devenport y Jacobs-Lorena, 2011).



**Figura 7. Esquema general del tracto digestivo de un díptero.** El intestino está dividido en tres regiones: a) Intestino anterior que lo conforma el esófago, proventrículo y divertículo, b) intestino medio y c) intestino posterior. El intestino consta de una monocapa epitelial conformado por cuatro tipos de células: células intestinales troncales (ISCs), absorbivas (ECS), células secretoras (EE) y enteroblastos (EBs), una célula postmitótica. En el intestino medio se forma la matriz peritrófica. Por debajo del epitelio se encuentra una lámina basal, una serie de músculos y una red neuronal. Tomado y modificado de (Miguel-Allaga, Jasper y Lemaitre, 2018).

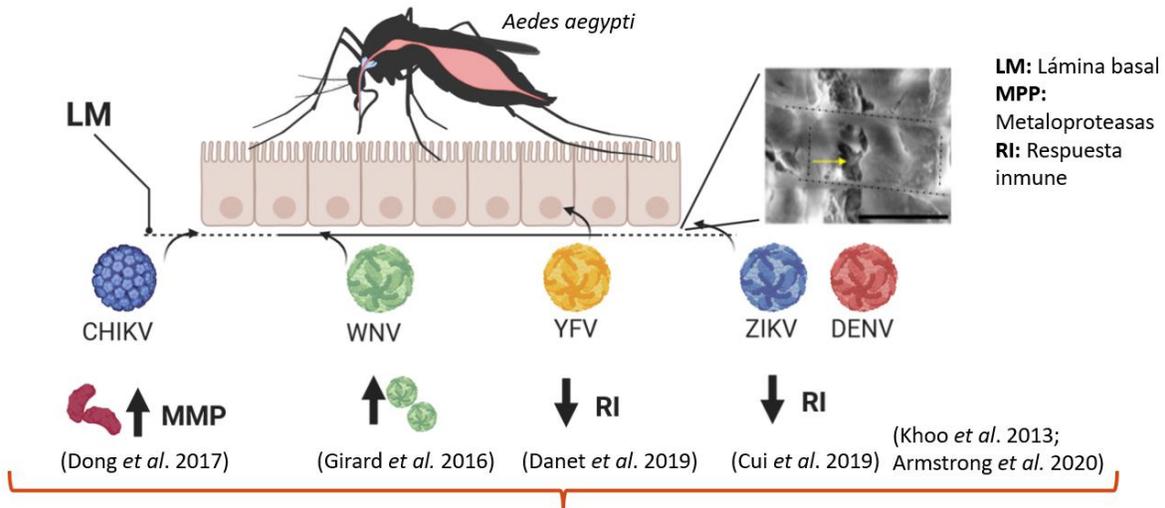
La permeabilidad del intestino del mosquito también es regulada por uniones intercelulares en la región subapical. A diferencia de los cordados, en los insectos existen otro tipo de uniones llamadas septadas (*septate junctions*). Morfológicamente, las uniones septadas se encuentran en la región apical y basolateral de las células epiteliales. Se tienen identificado en *Drosophila* aproximadamente 20 proteínas asociadas a las uniones septadas. Estas uniones son semi-permeables, a comparación de las uniones estrechas de vertebrados, dejando pasar moléculas de hasta 10 kDa (Izumi y Furuse, 2014); sin embargo, partículas con un tamaño mayor o similar al de un virus son impermeables para el epitelio intestinal (Edwards y Jacobs-Lorena, 2000). No obstante, también se ha demostrado que cuando son afectadas pueden dejar paso a partículas con un tamaño similar al de los virus (Edwards y Jacobs-Lorena, 2000).

Por último, la lámina basal de los dípteros es del tipo no celular, conformándose principalmente por colágeno tipo IV y laminina. Esta barrera es altamente selectiva, no dejando pasar partículas menores a 10 nm de diámetro (Miguel-Allaga, Jasper y Lemaitre, 2018).

Los arbovirus han desarrollado diferentes estrategias para evadir cada una de las barreras que enfrentan para su dispersión en el cuerpo del mosquito.

### Mecanismos de salida del intestino de diferentes arbovirus

Los arbovirus utilizan estrategias similares para su establecimiento en el intestino del vector, y para poder posteriormente escapar del intestino y alcanzar la hemolinfa del mosquito (Figura 8).



**Figura 8. Estrategias de escape de los arbovirus.** El virus de Chikungunya (CHIKV por sus siglas en inglés) primeramente se replica en las células epiteliales del intestino, este virus también necesita superar esta barrera para infectar tejidos secundarios, incluidas las glándulas salivares. El mecanismo es poco estudiado, en el mosquito *A. aegypti*. La lámina basal y la matriz extracelular son una barrera física importante para detener la salida de este virus. La presencia del virus induce la expresión de una metaloproteína (MMP) de tipo I que degrada componentes de estas capas, permitiendo una desestabilización temporal de estas barreras y el escape de CHINKV al hemocele (Dong y otros, 2017).

En el mosquito *Culex pipiens* se analizaron los cambios estructurales ocasionados por una infección con el virus de West Nile (WNV), observando una proliferación de los viriones en las células del epitelio intestinal, modificando la arquitectura del retículo endoplásmico, aunque el mecanismo de salida fue poco estudiado; la hipótesis sugerida es la degradación de los tejidos y la inducción de una muerte celular que permita la salida de WNV al hemocele (Girard y otros, 2005).

Para el YFV se sabe que este virus es capaz de modificar la respuesta inmune del mosquito, logrando establecerse en su intestino. Sin embargo, el mecanismo de salida sigue siendo poco entendido (Danet y otros, 2019). ZIKV y DENV también son capaces de inmunoregular la respuesta inmune de su hospedero insecto (Taracena y otros, 2018). Se conoce que existen mosquitos refractarios a la infección, es decir, que logran esclarecer la infección viral en sus tejidos, posiblemente por una activación de las vías de RNA interferentes que impiden el establecimiento del virus (Taracena y otros, 2018); así que, regulando estos mecanismos, también contribuyen a la diseminación de los flavivirus en el vector.

Por otro lado, la alimentación sanguínea contribuye de manera indirecta el escape de los flavivirus al hemocele del insecto. La alimentación sanguínea induce múltiples procesos y cambios morfológicos en el epitelio intestinal de *A. aegypti*. La ingesta de sangre es un proceso continuo fisiológicamente, donde se almacena la sangre en la sección anterior del intestino. Esto provoca un aumento de tamaño del órgano, y una distensión de sus tejidos. El estrés mecánico inducido por la presencia de sangre provoca microfracturas en la lámina basal, y éstas pueden servir de escape para ZIKV y DENV (Cui y otros, 2019; Armstrong y otros, 2020). Este proceso es dinámico, ya que primeramente el virus necesita establecerse en las células del intestino del mosquito, y al ocurrir una alimentación sanguínea, se provocan los daños en el tejido, permitiendo la salida del virus en el hemocele. Estas microfracturas se restauran veinticuatro horas post-alimentación, por lo que la temporalidad de la infección es crucial para entender este fenómeno. Otros factores que influyen en la salida de los arbovirus al hemocele, son la genética del vector, la genética del DENV (Khoo y otros, 2013) y probablemente la presencia de la proteína NS1.

## Antecedentes

Son pocos los estudios reportados para la proteína NS1 de DENV en los insectos. De hecho, hasta relativamente hace poco tiempo, la noción en el campo era que la proteína NS1 no era secretada de células de mosquito infectadas con DENV, solo de células de vertebrado y se desconocía si esta proteína era capaz de ser secretada por las células de insecto infectadas. Se sabe, por investigaciones en nuestro grupo de trabajo que en células de insecto C6/36 (derivadas de la especie *A. albopictus*) y Aag2 (derivadas de la especie *A. aegypti*), esta proteína es secretada de manera eficiente y a tiempos más tempranos (6 h post-infección), en comparación con las células de vertebrado (12 h post-infección). Además, también se sabe que la conformación estructural de la proteína es hexamérica, pero que difiere en el patrón de glicosilaciones dadas en los mamíferos (Alcalá y otros, 2016, 2017). Las diferencias en estas modificaciones post-traduccionales no impide que la NS1 sea secretada, aunque lo hace utilizando una vía de secreción no-clásica, dependiente de caveolin-1 (Alcalá y otros, 2017; Rosales y Ludert, 2019).

Ahora bien, se sabe que los mosquitos infectados producen altos niveles de NS1, pero se desconoce si en mosquitos infectados, NS1 se encuentra soluble y circulante. No obstante, la detección de la NS1 en glándulas salivares mediante ELISA, por varios grupos de trabajo (Cheong-Huayt y otros,

2011; Voge y otros, 2013; Thiemmecca y otros, 2016; Serrato-Salas y otros, 2018), sugiere que efectivamente la proteína NS1 podría encontrarse en forma soluble y estar circulando en el mosquito vector.

Acerca de su función de la NS1 soluble en el mosquito vector es muy poco lo que aún se conoce. Liu y colaboradores (2016) evaluaron la capacidad de la proteína NS1 ingerida con la toma de sangre, de inmunoregular la respuesta inmune del vector. Utilizando viriones purificados de DENV-2, (separados de NS1) a partir de sobrenadantes de células de mamíferos infectadas y administrando una dosis de NS1 recombinante previo a la infección, estos autores observaron que la presencia de la proteína NS1 de DENV contribuyó a una mayor proporción de mosquitos infectados (hasta tres veces mayor el número de mosquitos infectados en presencia de la proteína NS1), de manera dependiente de la dosis (se utilizaron hasta 2 µg de proteína recombinante). Además, la carga viral en los mosquitos que tuvieron contacto con la proteína recombinante fue mayor comparándolos con los mosquitos infectados con los viriones purificados (una unidad logarítmica más alta en la cuantificación del virus por UFP). Para conocer el mecanismo de acción que explicará este fenómeno, se evaluaron algunos componentes de la respuesta inmune del vector. Utilizando PCR en tiempo real, se determinó que algunos componentes de las vías de señalización de la respuesta inmune y estrés oxidativo estaban reguladas a la baja. En otro trabajo más reciente, se observó que una mutación en la posición 53 (G53D), en la proteína NS1 de una cepa vacunal de DENV-2, es esencial para que se den las glicosilaciones correctamente, lo cual resulta en una limitada infección del epitelio intestinal y en limitada dispersión del DENV dentro del mosquito. Al evaluar los genes de la respuesta inmune, la mayoría estaban regulados a la baja, específicamente los genes involucrados en la maquinaria de RNA de interferencia, por lo que la presencia de la NS1 es importante para el establecimiento del virus dentro del vector, y ésta necesita las glicosilaciones que se dan en las células de mamífero, por lo que también se sugiere que existe una actividad diferencial de la proteína NS1 de DENV secretada en células de insecto y en células de vertebrado (Choy y otros, 2020). Estos resultados indican un papel importante como inmunoregulador negativo a la NS1 en los mosquitos.

## Justificación

La proteína NS1 del DENV es una proteína multifuncional que participa en varias etapas del ciclo infeccioso del virus. En vertebrados, NS1 participa además en la patogénesis de la enfermedad, y su capacidad de alterar las uniones estrechas de tejidos se ha señalado como parte del mecanismo de acción de NS1. En mosquitos, existe evidencia de que NS1 tiene la capacidad de inmunoregular negativamente componentes de la respuesta inmune; sin embargo, se desconoce si la NS1 tiene la capacidad de alterar la permeabilidad del epitelio intestinal de mosquitos de una manera similar a como ha visto en células de vertebrados. Por tal motivo, resulta importante investigar el efecto de la NS1 en el vector *A. aegypti*, su capacidad de alterar barreras y cómo repercute en el establecimiento de la infección viral en este organismo.

## Hipótesis

La proteína NS1 de DENV altera la permeabilidad y la integridad del epitelio intestinal en el mosquito, facilitando la diseminación del virus dentro del vector.

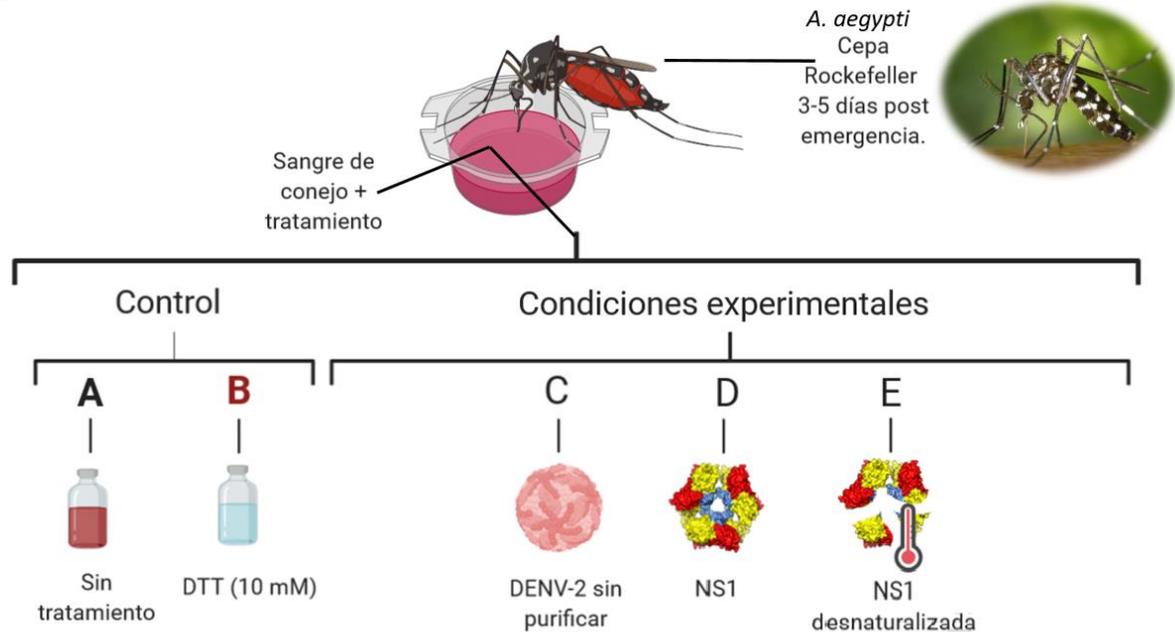
## Objetivo general

Determinar si la proteína NS1 de DENV altera la permeabilidad del intestino del mosquito *A. aegypti*.

## Objetivos particulares

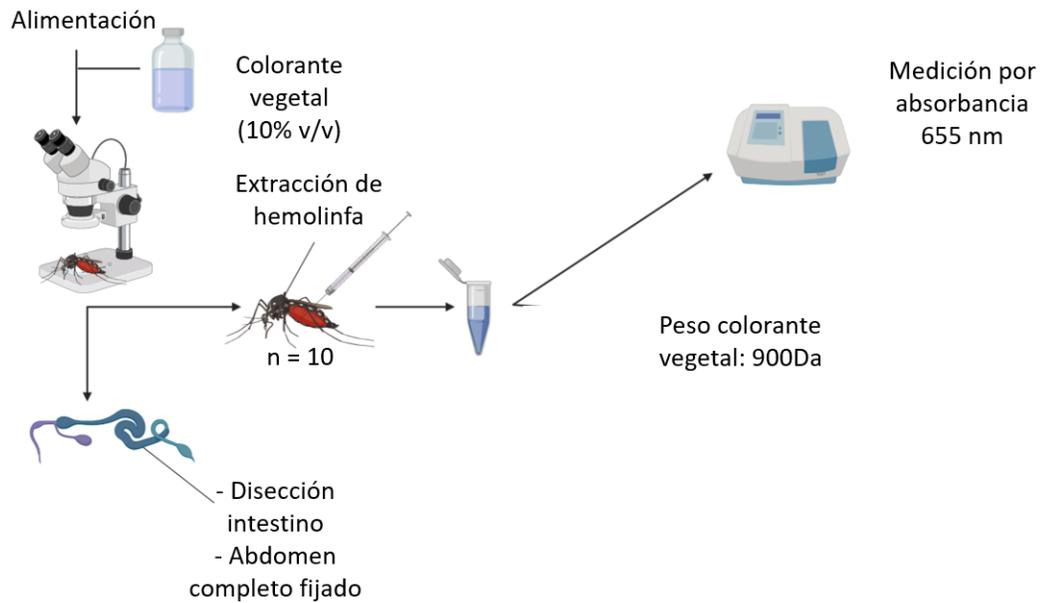
1. Evaluar cambios en la permeabilidad del intestino causada por la proteína NS1.
2. Evaluar la diseminación de la infección por DENV dentro del mosquito en presencia o ausencia de la proteína NS1.

## Esquema de alimentación.



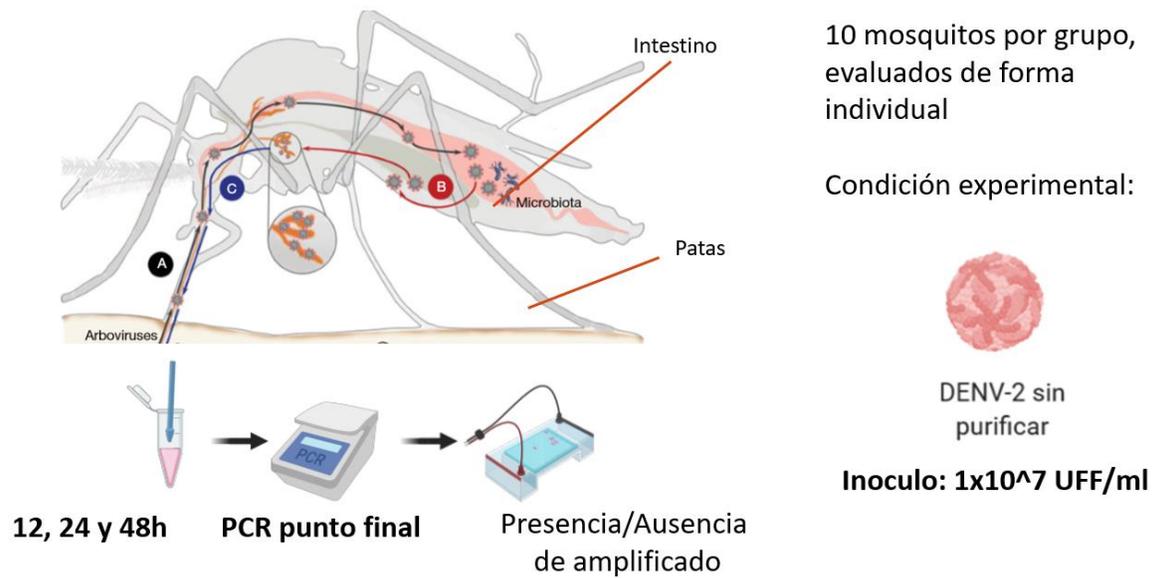
**Figura 9. Esquema de alimentación y condiciones experimentales utilizadas.** Los mosquitos utilizados para los experimentos fueron de la especie *Aedes aegypti*, cepa *Rockefeller*. Los tratamientos fueron administrados por la vía oral, combinándolos con sangre de conejo. Los tratamientos fueron: A. Control negativo, únicamente sangre de conejo estéril. B. Control positivo, agente permeabilizante (DTT); los tratamientos experimentales fueron: C. Sobrenadante de células infectadas con DENV con presencia de la NS1, D. Proteína NS1 recombinante, E. Proteína NS1 recombinante desnaturalizada por calor.

## Objetivo 1. Ensayo de permeabilidad.



**Figura 10. Estrategia experimental para el objetivo 1. Ensayo de permeabilidad.** Los mosquitos fueron alimentados con los tratamientos en combinación de colorante vegetal al 10%. Se les extrajo la hemolinfa y posteriormente la salida del colorante fue medida por absorbancia a una longitud de 655. Se realizó un pool de 10 mosquitos por tratamiento, algunas muestras fueron fijadas para su procesamiento.

## Objetivo 2. Diseminación del virus dentro del mosquito.



**Figura 112. Estrategia experimental para el objetivo 2. Diseminación del virus dentro del mosquito.** Los mosquitos fueron alimentados con sobrenadante de células infectadas con DENV-2. El título viral utilizado fue de  $1 \times 10^7$  UFF/ml. Se realizó una cinética de infección a las 12, 24 y 48h disectando el intestino y las patas de los mosquitos por individuo. Se utilizaron diez mosquitos por punto. La infección fue determinada por una RT-PCR punto final.

## Materiales y Métodos

### Mosquitos

Se utilizaron mosquitos de la especie *Aedes aegypti*, cepa *Rockefeller*, criados en el insectario del Instituto Nacional de Salud Pública Morelos. Los vectores fueron mantenidos a 28-31°C con 70% de humedad relativa, alimentados con una solución azucarada al 10% hasta su uso (Proyecto ZIKA AIRS, 2019). Para los experimentos se utilizaron mosquitos de 3-5 días post-emergencia.

Para la alimentación de los mosquitos con los tratamientos, éstos fueron sometidos a ayuno durante 4 h. Posteriormente se realizó la preparación de los tratamientos combinado con sangre de conejo, llevándose a un volumen final de 1 ml, colocándose en campanas de vidrio con una membrana de parafilm M. Por la campana de vidrio se recirculó agua a una temperatura de 37°C. Los mosquitos fueron alimentados durante 30 min, asegurándose que hayan consumido el tratamiento, y separando visualmente a los mosquitos completamente alimentados.

### Cultivo celular

Para realizar los ensayos requeridos para la propagación y titulación del virus, se cultivaron células de mamífero de las líneas celulares Vero (VE6) provenientes de riñón de mono. Éstas fueron cultivadas en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino con 5% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37°C.

### Virus

Para las infecciones de los mosquitos, se utilizó la cepa Nueva Guinea del DENV-2, donada por el InDRE. Este virus fue propagado en células Vero y cosechados 5 días post-infección. Para determinar la presencia de NS1 en el sobrenadante se realizó un ensayo de ELISA desarrollado en nuestro laboratorio (Rosales y Ludert, 2019). Los virus se titularon mediante un ensayo de foco clásico utilizando células Vero. Para normalizar la cantidad de virus ingerida por los mosquitos, éstos se alimentaron con  $1 \times 10^7$  Unidades Formadoras de Focos por mililitro (UFF/ml).

## Ensayo de foco

Para la titulación del virus se utilizó una placa de 96 pozos (Padmanabhan y Vasudevan, 2014). Las células VE6 fueron sembradas hasta alcanzar una confluencia del 80%. Se realizaron diluciones seriadas del virus de  $10^1$  a  $10^8$ , utilizando 180  $\mu$ l de medio MEM sin suero y 20  $\mu$ l del sobrenadante a cuantificar. Posteriormente se retiró el medio, se lavaron las monocapas con buffer PBS y se añadieron 50  $\mu$ l de las diluciones seriadas preparadas del virus a titular ( $10^1$  a  $10^8$ ). Éstos fueron incubados por dos horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después, se añadieron 100  $\mu$ l de medio MEM con 5% de suero y los pozos se dejaron incubando en las condiciones explicadas anteriormente durante 48 h para continuar con el ensayo.

Pasadas las 48 h, se fijaron las células con una solución de formaldehído al 4%, y se añadieron 100  $\mu$ l de esta solución, incubándolo durante 10-15 min. Se realizaron lavados con PBS (2 a 3 veces) y se agregó metanol frío (-20°C) con el fin de permeabilizar las células, durante 15-20 min. Se volvió a realizar lavados con PBS-Tween al 0.1% y se añadió la solución de bloqueo (SFB al 5% con PBS-Tween al 0.1%), se dejó incubando durante dos h y posteriormente se añadió el anticuerpo anti-E y se incubó durante 2 h a 37°C o toda la noche a 4°C. Se realizaron varios lavados con PBS-Tween al 0.1% y se añadió el anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa de rábano. Se dejó incubando durante 1 h y se añadió la solución de revelado, se detuvo la reacción y se cuantificaron los focos formados en el microscopio, teniendo la siguiente fórmula matemática:

Factor de dilución (UFF/ml) = # focos x 5 (corrección del volumen inicial) x df (factor de dilución).

Donde UFF fueron las unidades formadoras de placas, df fue el factor de dilución, 5 fue el factor de corrección correspondiente a 0.05 ml del inóculo viral.

## Obtención de la proteína NS1 recombinante y su desnaturalización por calor

La proteína NS1 recombinante de DENV-2 expresada en células CHO fue donada por la Dra. Ana Alcalá del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Brevemente, las células fueron transfectadas con un plásmido que expresa la NS1 de DENV-2, con una bandera de HA en el extremo carboxilo. Luego de 48 h post-transfección, la proteína fue purificada del sobrenadante por cromatografía de afinidad y mantenida en buffer PBS. Los niveles de proteína NS1 se cuantificaron mediante un ELISA cuantitativo y utilizando una curva estándar. Ensayos previos de microscopía electrónica indicaron

que la proteína recombinante es secretada en forma hexamérica. Para normalizar la cantidad ingerida por los mosquitos, éstos se alimentaron con 400 ng de NS1 recombinante en cada uno de los tratamientos. A manera de control, se utilizó la misma cantidad de proteína, pero previamente desnaturalizada por calor, tratándola durante 15 min en baño de María.

### Testigos y tratamientos experimentales

A continuación, se explica en detalle cada uno de los tratamientos mostrados en la Figura 9.

- A.** Testigo negativo; los mosquitos únicamente se alimentaron con sangre de conejo.
- B.** Testigo positivo; trabajos del grupo de Jacobs-Lorena (2001 y 2003) demostraron que se puede aumentar la permeabilidad del tracto digestivo utilizando Dithiothreitol (DTT) al 10 mM; por tal motivo se utilizó este reactivo a la misma concentración y colorante vegetal azul como indicador. Se realizó una estandarización utilizando varias concentraciones de DTT, para obtener las condiciones óptimas.
- C.** Mosquitos infectados con DENV-2; como se mencionó anteriormente, para normalizar la cantidad de virus ingerida por los mosquitos, éstos se alimentaron con  $1 \times 10^7$  UFF/ml. Es importante resaltar que esta preparación también contiene la NS1 secretada por las células al sobrenadante de cultivo.
- D.** NS1 recombinante; 400 ng de proteína en 1 ml de sangre; esta condición pretende evaluar el efecto de la NS1 pura sobre la permeabilidad.
- E.** NS1 recombinante desnaturalizada por calor; para asegurarse que los efectos esperados (aumento de permeabilidad y modificación de la matriz peritrófica) sean ocasionados por la NS1 recombinante, ésta se desactivó por calor, esperando una pérdida de función de la proteína.

### Ensayos de permeabilidad

Para evaluar si existe un aumento de la permeabilidad en el intestino del vector ocasionada por la ingesta de viriones y/o la NS1 del DENV, se alimentaron a los mosquitos con los tratamientos señalados en la Figura 9. Los mosquitos se alimentaron con sangre de conejo, en combinación de colorante vegetal azul (masa molecular de 900 Da) (Fontaine y otros, 2016). Para la elección del colorante y la concentración, se realizó una estandarización empleando diferentes colorantes. Para

determinar el tiempo óptimo de permeabilidad se realizó una cinética a las 12, 24, 48 y 72 h post-alimentación, con el fin de determinar el punto donde se observó una salida significativa del colorante hacia el hemocele. Posteriormente se analizaron los intestinos para observar si hubo una tinción del epitelio intestinal, además de realizar un ensayo de perfusión para determinar si las trazas del colorante vegetal llegaron a la cavidad celómica (Edwards & Jacobs-Lorena, 2000). Antes de realizar la disección, los mosquitos fueron adormecidos colocándolos en cajas Petri con una base de hielo y posteriormente fueron inoculados intrahemocélicamente mediante la ayuda de un microinyector manual con 5  $\mu$ L de PBS. Con ayuda de unas pinzas se apretó el abdomen sin romper el tejido y la hemolinfa se recuperó con ayuda de una micropipeta. Para este ensayo se utilizó un pool de 10 mosquitos por tratamiento. Por último, la hemolinfa fue centrifugada para retirar los hemocitos y cuerpo graso y la absorbancia se midió en un espectrómetro a una longitud de onda de 655 nm (Figura 10). Los valores fueron expresados directamente en absorbancia. Los ensayos fueron realizados por triplicado para obtener muestras biológicas independientes y analizarlas estadísticamente.

### Diseminación del virus dentro del mosquito

Para evaluar la diseminación del virus dentro de mosquito, éstos se alimentaron con sangre conteniendo un título de  $1 \times 10^7$  UFF/ml. A las 12, 24 y 48 h post-ingesta, se evaluaron 10 mosquitos individuales, por cada punto de tiempo, se tomaron las seis patas de cada mosquito y posteriormente se realizó la disección del intestino como se explicó anteriormente. Las muestras se mantuvieron en un volumen de 100  $\mu$ l de Trizol hasta su extracción. La extracción de RNA de patas de mosquitos y la detección de genomas virales por RT-PCR de tiempo final, se tomó como evidencia de que el virus pudo escapar del intestino (Amstrong y otros, 2020) (Figura 11).

### Extracción de ARN y RT-PCR punto final

La extracción del RNA se realizó con una técnica convencional de Trizol/Cloroformo (Paula y otros, 2001; Amstrong y otros, 2020). Se siguió el protocolo indicado por el proveedor (TRI Reagent® RNA Isolation Reagent de Sigma-Aldrich, No. de catálogo: 93289). Se realizó una RT-PCR punto final para determinar la positividad de las muestras extraídas por individuo y por órgano de los mosquitos evaluados. Se utilizó el Kit RT-PCR SuperScript III One-Step con ADN polimerasa Platinum Taq por

ThermoFisher Scientific (No. de catálogo: 12574018,) siguiendo las indicaciones del proveedor. Se cargaron 5 µl de las muestras extraídas por el método de Trizol (100ng de RNA aproximadamente). Los primers utilizados para el ensayo fueron los primers DENVall, diseñados por nuestro laboratorio y dirigidos a la región 5'UTR y parte del gen de la cápside de DENV-2 (Fw: 5'-CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AA-3'; Rv: 5'-CCC CAT CTA TTC AGA ATC CCT GC-3'), los cuales generan un amplicón de 200 pb. El amplicón fue visualizado con electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con Sybrgreen, y los resultados fueron registrados fotográficamente, con ayuda de un transiluminador.

### Disección del intestino y patas del mosquito

Los mosquitos fueron anestesiados colocándolos en cajas Petri con una base de hielo, posteriormente transferidos a portaobjetos con una gota de PBS. La disección se realizó utilizando un microscopio estereoscópico. Utilizando unas pinzas, se realizó un corte transversal en la cabeza y el antepenúltimo segmento abdominal, al separar el cuerpo del mosquito desde ambos puntos el intestino se obtiene de manera íntegra (Coleman, Juhn y James, 2007). Una vez disectados, los intestinos fueron lavados con PBS hasta retirar la sangre ingerida y por último fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5ml. Las patas se retiran con ayuda de unas pinzas antes de realizar la disección del intestino, esto con el fin de evitar la salida de sangre a la cavidad hemocélica y que las muestras se contaminen con copias virales del alimento ingerido. Se obtuvieron imágenes de los intestinos extraídos con ayuda de un microscopio estereoscópico.

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los ensayos de permeabilidad fueron analizados utilizando la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una comparación múltiple de Dunnett's, utilizando el software GraphPad Prism versión 7.00 para Windows. Se realizó un promedio de cada una de las condiciones con los datos obtenidos de tres experimentos, con muestras biológicas independientes. Las varianzas fueron comparadas respecto al control negativo. Los gráficos fueron contruidos en el mismo software.

## Resultados

### Estandarización del modelo de permeabilidad intestinal

La proteína no estructural 1 (NS1) del DENV participa en el ciclo infectivo del virus, además de ser fundamental en la patogénesis de la enfermedad. Existe evidencia de que esta proteína tiene la capacidad de inmuno-regular negativamente componentes de la respuesta inmune del mosquito; sin embargo, se desconoce si la NS1 tiene la capacidad de alterar la permeabilidad del epitelio intestinal. Por tal motivo, resulta importante investigar el efecto de la NS1 en el vector *A. aegypti* y cómo repercute en el establecimiento de la infección viral en este organismo.

El primer paso para llevar a cabo los experimentos de permeabilidad fue la elección del colorante. Así, se evaluaron 5 diferentes colorantes reportados en la literatura y a las concentraciones recomendadas, los cuales se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Colorantes evaluados en el ensayo de permeabilidad.

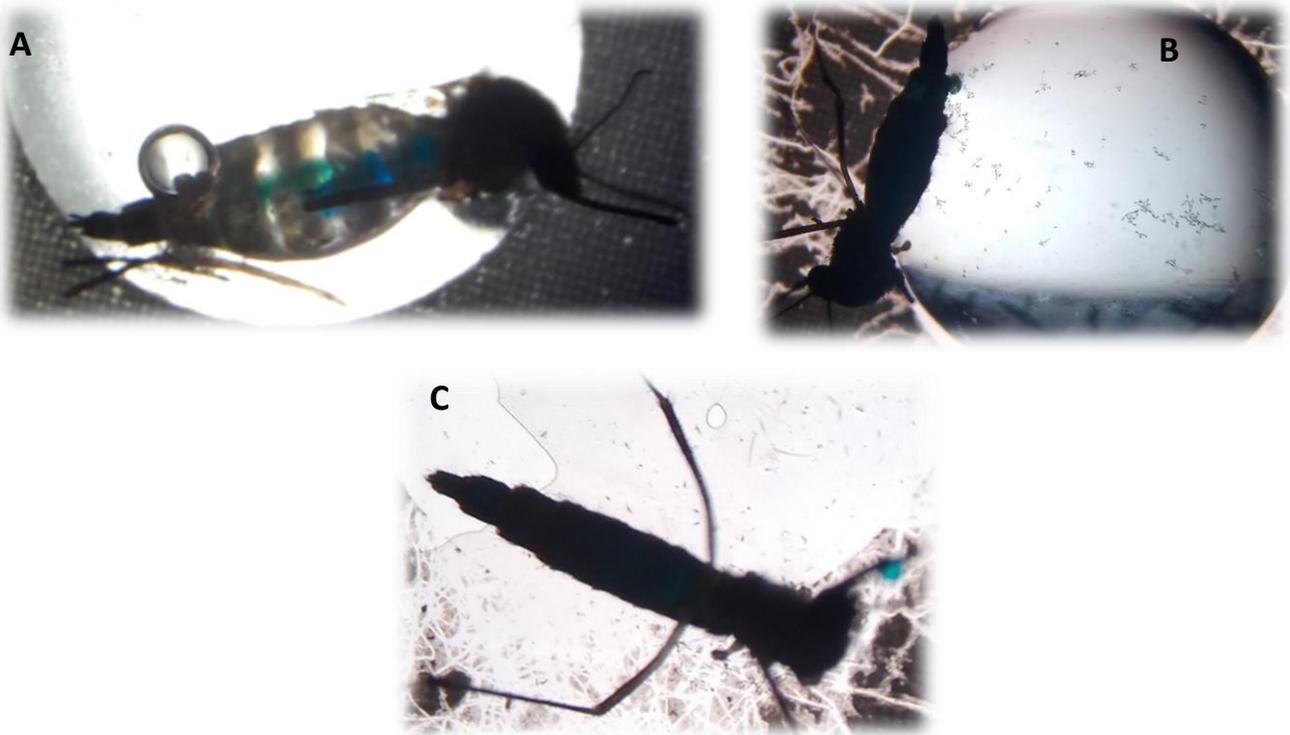
Colorante	Concentración	Referencia
Azul de dextrano	1% m/v	(Edwards y Jacobs-Lorena, 2000)
Safranina	1% m/v	(Hyllested, Veje y Ostergaard, 2002)
Azul de Evans	2% m/v	(Radu y Chemoff, 2013)
Azul de triptano	1% m/v	(Tyran y otros, 2011)
Colorante vegetal azul	10% v/v	(Fontaine y otros, 2016)

Los resultados de los ensayos mostraron que el colorante vegetal fue el mejor colorante para los efectos de los experimentos de permeabilidad, ya que mostró ser inocuo para el mosquito a concentraciones de 10% v/v. Además, se observó un claro contraste de sus partes, y al hacer disecciones del intestino de los mosquitos alimentados con el colorante, se pudo observar una completa tinción del epitelio intestinal (Figura 12). Los demás colorantes probados no lograron difundir hacia la hemolinfa de los vectores, y no tiñeron por completo el intestino de éstos (datos no mostrados).



**Figura 12.** Alimentación de mosquito *A. aegypti* con el colorante vegetal al 10% v/v. Se observa una distribución homogénea del colorante en el intestino del vector. Aumento de microscopio estereoscópico al 10x.

Al realizar la perfusión de la hemolinfa, en los mosquitos control – (mosquitos alimentados únicamente con sangre de conejo + colorante vegetal 10% v/v) se observó que el colorante no logró difundir a la hemolinfa de los mosquitos. Sin embargo, al añadir DTT a una concentración de 10 mM, como agente permeabilizante (Edwards y Jacobs-Lorena, 2000), el colorante vegetal se observó en la hemolinfa de los mosquitos, e incluso se pudo apreciar en la saliva de los vectores (Figura 13).

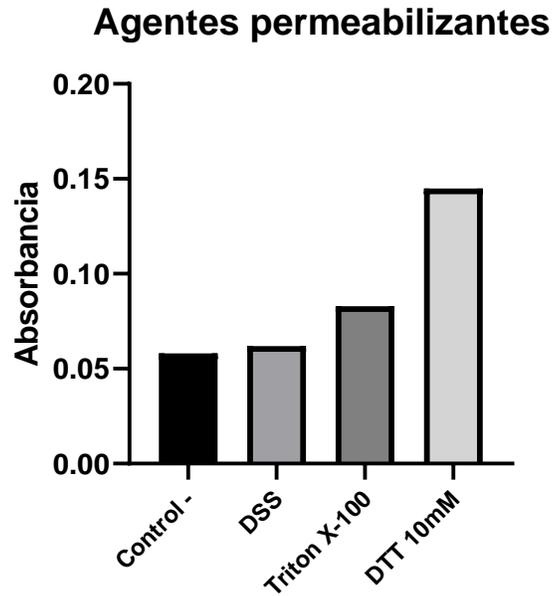


**Figura 13.** Alimentación y perfusión de mosquitos *A. aegypti* con el colorante vegetal al 10% v/v. Se observa la salida de la hemolinfa en ambos especímenes. **A.** Control negativo, no se observa una salida del colorante en la hemolinfa. **B.** Control positivo. Se observa el colorante perfundido en la hemolinfa del mosquito, **C.** Se logra observar el colorante vegetal en la saliva del vector. Aumento de microscopio estereoscópico al 10x.

Posteriormente, se analizaron dos agentes permeabilizantes mas, también reportados en la literatura y comparados con el DTT, para evaluar la salida del colorante vegetal del intestino (Tabla 2). El tiempo de medición fue a las 24 hpt. Al analizar la hemolinfa de diez mosquitos perfundidos con cada uno de los reactivos, los resultados mostraron que con Dextran Sulfato de Sodio al 2% se obtuvo una absorbancia de 0.062; con Triton X-100 al 1% m/v, 0.083 de absorbancia y al utilizar Dithiothreitol a una concentración de 10 mM se obtuvo un valor de 0.145 (Figura 1). Estos resultados sugieren que tal y como lo reportan Edwards y Jacobs (2000), el DTT es el mejor agente permeabilizante para uso en intestinos de mosquito y por eso fue el agente elegido.

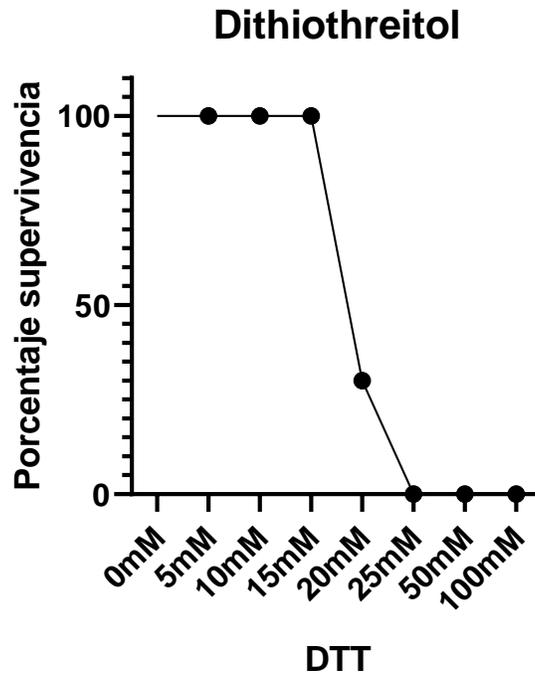
**Tabla 2** Agentes permeabilizantes evaluados en el modelo de permeabilidad en *A. aegypti*.

Agente	Concentración	Referencia
Dextran sulfate sodium (DSS)	2% m/v	(Poritz y otros, 2007)
Triton X-100	1% v/v	(Balimane y Chong, 2005)
Dithiothreitol (DTT)	10 mM	(Edwards y Jacobs-Lorena, 2000)



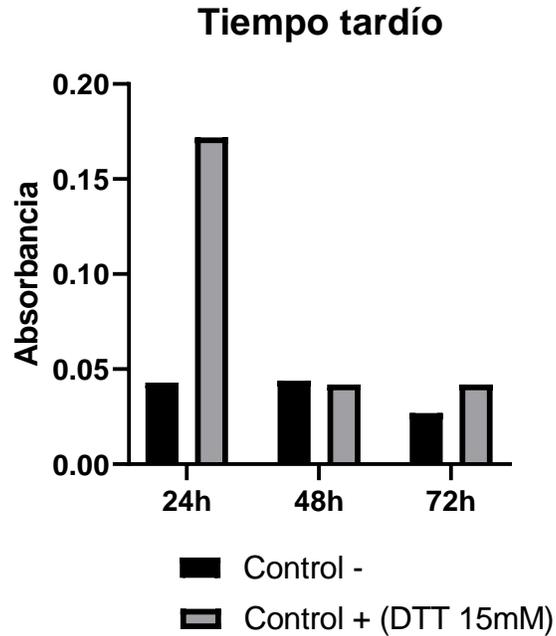
**Figura 14.** Salida del colorante a la hemolinfa de *A. aegypti* utilizando tres agentes permeabilizantes. DSS: Dextran Sulfato Sodio, Triton X-100 y DTT: Dithiothreitol. Promedio de absorbancia de hemolinfa de diez mosquitos perfundidos por tratamiento a las 24 hpt. Se cuantificó la salida del colorante en la hemolinfa del vector por absorbancia a 655nm.

Dado que el DTT fue el agente que permitió una mayor salida del colorante al hemocele, obteniendo el valor de absorbancia más alto respecto a los otros dos agentes químicos, seguidamente se realizó una curva de supervivencia para determinar la mayor concentración de DTT que podía emplearse en el modelo de mosquito. Se utilizaron diez mosquitos por concentración, partiendo desde 0 hasta 100mM. Los mosquitos se alimentaron con sangre y DTT en concentraciones ascendentes, teniendo la dosis máxima de 15 mM una supervivencia del 100% de los mosquitos. Los resultados mostrados en la Figura 15 indicaron que concentraciones de DTT por encima de 15 mM, afectaron severamente la viabilidad de los mosquitos.



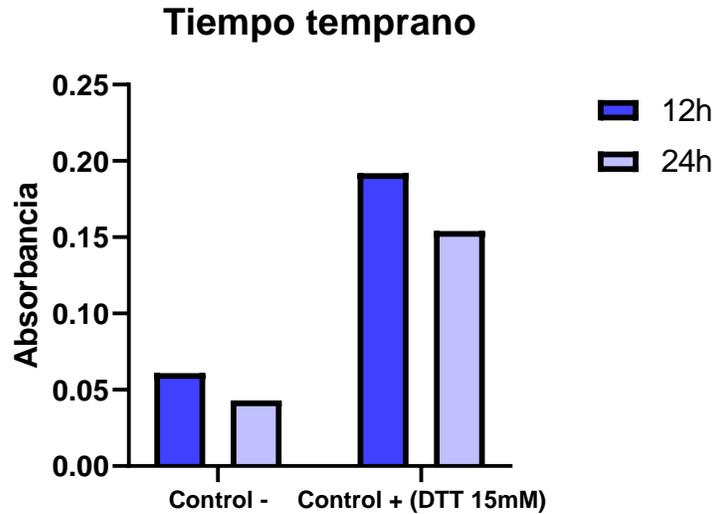
**Figura 15.** Curva de supervivencia del Dithiothreitol (DTT). Se determinó la concentración máxima posible con el agente reductor; así para 15 mM sobrevivieron el 100% de los mosquitos. Porcentaje obtenido de diez mosquitos por tratamiento.

Para finalizar la estandarización del modelo, se prosiguió a determinar el tiempo óptimo de evaluación de los tratamientos. Se realizó una cinética de 24, 48 y 72 hpt únicamente con sangre de conejo, en ausencia (control negativo) y en presencia del agente permeabilizante, a una concentración de 15 mM (Figura 15). A las 24 horas post-alimentación, se observó una clara presencia del colorante vegetal en la hemolinfa de los mosquitos (O.D. 0.172 en presencia del DTT versus 0.043 en la condición control). Sin embargo, a tiempos más tardíos de 48 y 72 h, ya no se observan trazas del colorante en la hemolinfa, obteniéndose valores de O.D. muy similares al control, en ambos tiempos (Figura 16).



**Figura 16.** Cinética de 24, 48 y 72 h del ensayo de permeabilidad. En un tiempo posterior a las 24 h ya no pudo detectarse el colorante en la hemolinfa. Se cuantificó la salida del colorante en la hemolinfa del vector por absorbancia a 655 nm.

Los resultados anteriores sugirieron que la proteína NS1 actuó a tiempo temprano en el intestino del mosquito, y que su efecto pudo ocurrir aún antes de las 24 h, por lo que se determinó la salida del colorante a las 12 hpt (Figura 17). Los resultados mostraron que también a las 12 se observaron cambios en la permeabilidad del colorante inducidos por DTT, inclusive aún más pronunciados que los detectados a las 24h.



**Figura 17.** Ensayo de permeabilidad en tiempo temprano (12 y 24 h). En un tiempo temprano se observó una mayor salida del colorante en todas las condiciones evaluadas. Se cuantificó la salida del colorante en la hemolinfa del vector por absorbancia a 655 nm.

Los resultados de las pruebas de estandarización mostraron que el uso del colorante vegetal como marcador y el DTT como agente permeabilizante, a una concentración de 15 nM y 12 h de tratamiento, resultaban en un ensayo robusto y reproducible y por ello se adoptaron estas condiciones para los ensayos con DENV y NS1.

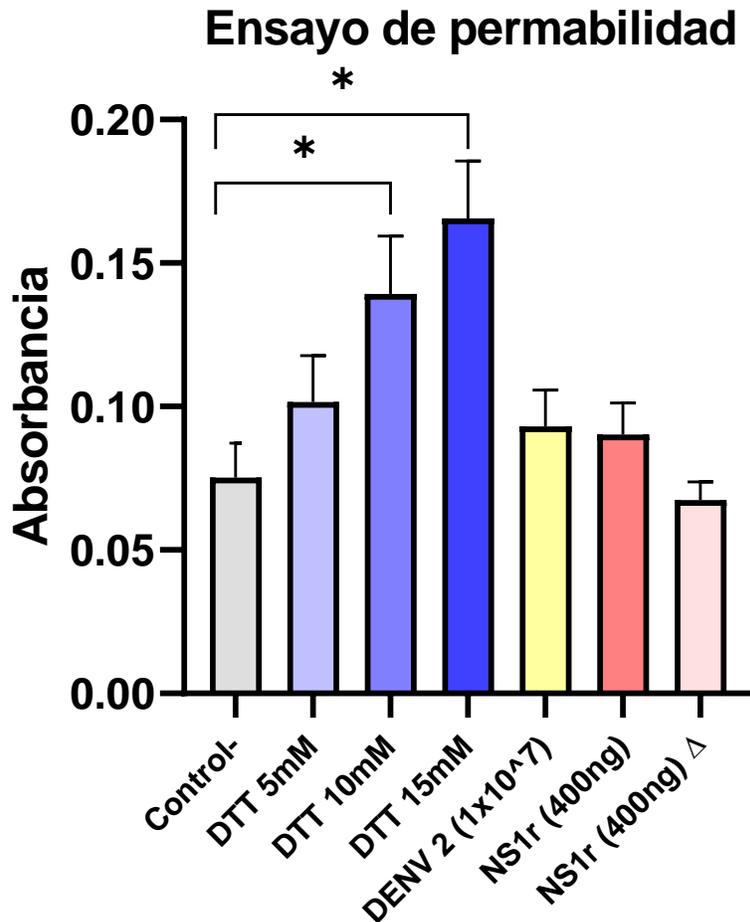
### Ensayo de permeabilidad intestinal

El ensayo de permeabilidad intestinal se llevó a cabo con las condiciones estandarizadas para el modelo. Los tratamientos fueron administrados como se describió en la metodología (Figura 8) y se utilizaron 3 concentraciones de DTT como controles positivos y sin PBS ni DTT, como control negativo. Se realizaron tres experimentos de muestras biológicas independientes. Los resultados de las O.D. obtenidos se presentan en la Tabla 3 y la forma graficada de los mismos en la Figura 18.

**Tabla 3** Valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de permeabilidad intestinal.

<b>Control-</b>	<b>DTT 5mM</b>	<b>DTT 10mM</b>	<b>DTT 15mM</b>	<b>DENV 2 (1x10<sup>7</sup>)</b>	<b>NS1r (400ng)</b>	<b>NS1r (400ng) Δ</b>
0.061	0.08	0.102	0.205	0.076	0.094	0.08
0.099	0.092	0.171	0.152	0.085	0.107	0.061
0.066	0.133	0.145	0.14	0.118	0.07	0.061

Con el modelo estandarizado, utilizando el agente reductor (DTT) se observó una salida de colorante a la hemolinfa de los vectores de una manera dosis-dependiente, siendo estadísticamente significativo para 10 y 15 mM ( $p = 0.0375$  y  $p = 0.0034$ , respectivamente), respecto al control negativo (Figura 17). Al utilizar los sobrenadantes de cultivo de células infectadas con DENV se observó una tendencia al aumento en la salida del colorante. Así mismo, en las muestras donde se encuentra presente la NS1 soluble, existió una tendencia al aumento de la salida del colorante en las condiciones experimentales (sobrenadante de células sin purificar y NS1r). Esta tendencia no se observó al utilizar a la proteína NS1r desnaturalizada mediante calor, lo cual sugiere que los aumentos observados pudieran deberse al efecto de la NS1 sobre el intestino. Sin embargo, las tendencias al aumento no mostraron diferencias significativas respecto al control negativo ( $p=0.89$  y  $p = 0.94$ ) (Figura 18).

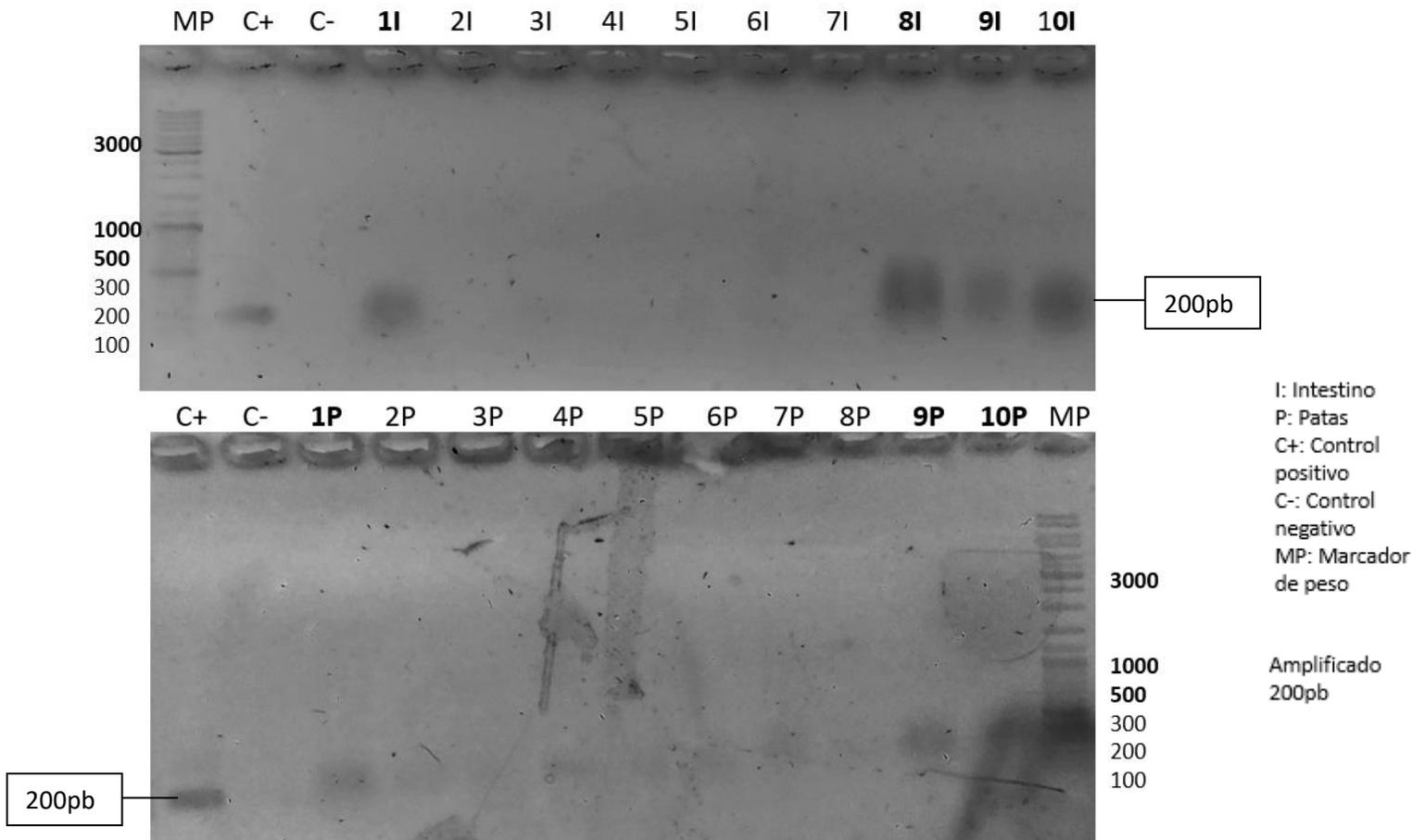


**Figura 18.** Ensayo de permeabilidad en *A. aegypti*. Se cuantificó la salida del colorante en la hemolinfa del vector por absorbancia a 655 nm. Tres experimentos independientes. Análisis de varianza (ANOVA) respecto al control negativo. 10 y 15 mM de DTT,  $p = 0.0375$  y  $p = 0.0034$  respectivamente. No existe diferencia significativa de las condiciones experimentales.

### Diseminación del virus dentro del mosquito

Para determinar si la presencia de la NS1 podía contribuir a la dispersión del virus dentro del vector, se diseñó el experimento con base a lo reportado en la literatura (Figura 10). Para este ensayo se evaluó el sobrenadante de células infectadas sin purificar, es decir, con la presencia de la proteína NS1. El título viral fue de  $1 \times 10^7$  UFF/ml. La positividad de las muestras a la presencia del virus fue determinada a las 12, 24 y 48 post-inóculo, en mosquitos analizados individualmente, por RT-PCR y la presencia del amplicón de 200 pb visualizado en una electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

Como imágenes representativas, se muestran los geles de la RT-PCR del intestino y patas colectadas a las 12 hpi (Figura 19).

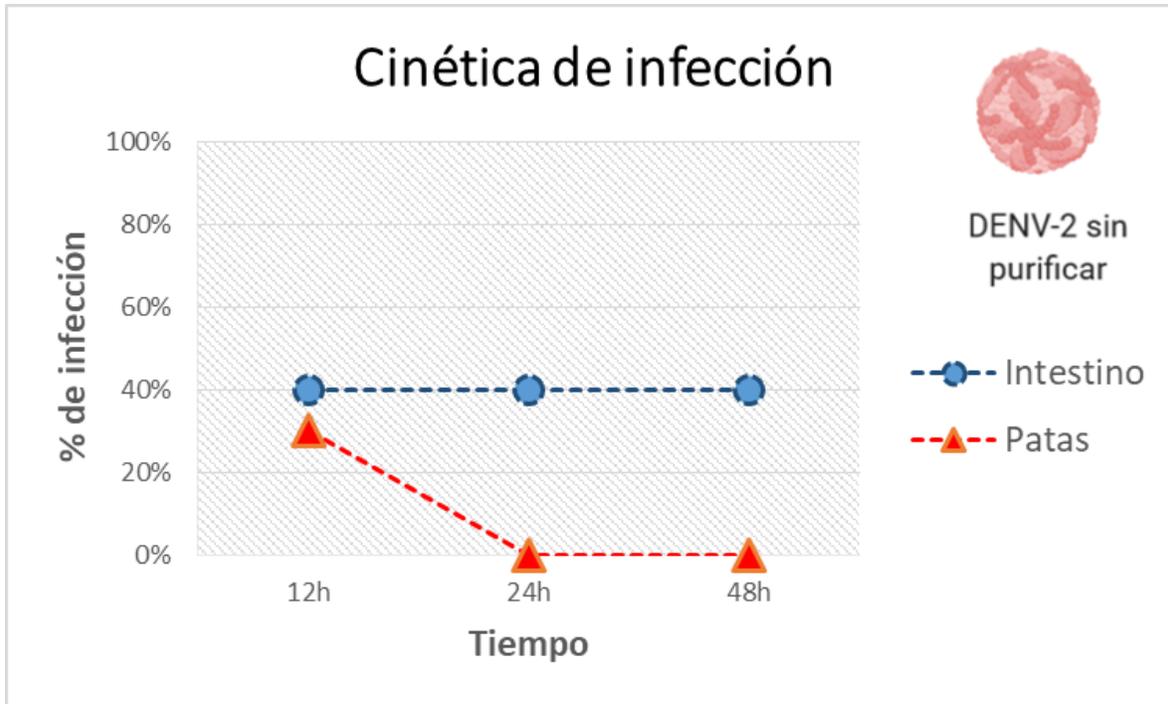


**Figura 19.** Imagen representativa de las electroforesis realizadas para determinar las muestras positivas para DENV-2. Muestras por individuo y por tejido (I-Intestino, P-Patas). Se procesaron diez individuos por tejido. Amplificación: 200pb.

Se obtuvo el porcentaje de infección a través del cálculo de individuo positivo para DENV-2 ( $x$ ) entre el número total por punto (10), es decir:  $\% = x/10$  para cada uno de los puntos evaluados. Los resultados mostraron que a las 12 hpi, se obtuvo un 40% de muestras positivas para intestino y 30% para las patas; mientras que a las 24 y 48 h se obtuvo un 40% de infección en los intestinos y ninguna muestra positiva en las patas de estos mosquitos (Figura 20).

Con estos resultados, se determinó una cinética de infección similar a lo reportado por otros autores. La evidencia sugiere la participación de la proteína NS1 en el establecimiento del virus

dentro del vector, con una posible afectación de la permeabilidad intestinal causada por esta proteína.



**Figura 20.** Cinética de infección a las 12, 24 y 48 h utilizando sobrenadantes de células sin purificar. Se obtuvo un porcentaje de infección para el intestino de los mosquitos de 40% en los tres puntos evaluados. Para las patas de mosquitos, se obtuvo un 30% de infección a las 12 hpt.

## Discusión

Es importante entender la fisiología del mosquito para analizar los fenómenos que pueden alterar su función. La permeabilidad del intestino está regulada por diversas barreras que lo componen. Se sabe que la alimentación sanguínea por sí sola puede alterar esta permeabilidad (Amstrong y otros, 2020). Además, existe filtración de los componentes de la sangre a la hemolinfa, como son proteínas y otros componentes (Lehane y Billingsley, 1996). Dependiendo de la fuente de alimentación, está es procesada en diferentes compartimentos del intestino; por ejemplo, se sabe que los azúcares se mantienen en el divertículo de los dípteros, mientras la sangre o componentes proteícos son primeramente almacenados en la parte anterior del intestino, donde se da una importante liberación de proteasas para su degradación y procesamiento (Miguel-Allaga, Jasper y Lemaitre,

2018; Terra y otros, 2019). Es muy probable que los colorantes evaluados no difundieran a la hemolinfa del mosquito y no pudieran distribuirse en todo el intestino por causa de este procesamiento diferencial. El colorante vegetal es un reactivo inocuo que ya ha sido utilizado previamente en el vector *A. aegypti* (Fontaine y otros, 2016). Éste presenta un bajo peso molecular (900 Da), por lo que puede difundir hacia el hemocele del insecto. En *Drosophila* se ha utilizado este colorante observando su salida al hemocele del insecto cuando las barreras del intestino se ven comprometidas (Rera, Clark y Walker, 2012). Los resultados demostraron que, si no se altera la permeabilidad intestinal con algún componente externo, el colorante no logra difundir a la hemolinfa de los vectores. Además, observaciones bajo la lupa indican que es inocuo para los mosquitos.

Posteriormente, se decidió realizar una búsqueda bibliográfica de diferentes agentes permeabilizantes probados en epitelios intestinales. Existen pocos reportes en insectos, por lo que se evaluaron algunos agentes reportados para mamíferos, encontrándose que el dextrán sulfato de sodio es utilizado para inducir procesos inflamatorios en ratas, produciendo cambios en la permeabilidad intestinal (Poritz y otros, 2007). Sin embargo, al ser ensayado en mosquitos, fue el agente menos efectivo, y el que presentó el menor valor de absorbancia en la hemolinfa. Otro agente utilizado fue el Triton X-100, el cuál es un detergente que puede causar poros en las membranas celulares, facilitando la salida de colorantes en los epitelios intestinales (Balimane y Chong, 2005). Con este detergente sí se logró difundir el colorante vegetal al hemocele, pero se observó un alto nivel de mortalidad con nuestros especímenes. Por último, al emplear el agente reductor ditritotriitol (DTT), el cual ya había sido estudiado en larvas de mosquito de la especie *A. aegypti* y en *Anopheles stephensi* (Edwards y Jacobs-Lorena, 2000; Villalon, Gosh y Jacobs-Lorena, 2003), se obtuvieron altos valores de absorbancia de manera dosis dependiente y a la concentración reportada en la literatura (10 mM), no se observó ningún tipo de mortalidad en los insectos. Se sabe que el mecanismo de acción del DTT consiste en la reducción de puentes disulfuro, presentes en las proteínas que constituyen las uniones septadas de las células epiteliales del mosquito; por ejemplo, se sabe que éstas presentan proteínas como la tetraspaninas (TSP2a), la cuál ha sido reportada en *Drosophila* y la pérdida de su estructura provoca un aumento de la permeabilidad intestinal (Izumi y otros, 2016). Otras proteínas involucradas son Mesh y Tsp2A (Izumi y Furuse, 2014), las cuáles además no permiten una correcta síntesis de la matriz peritrófica del intestino. Por tal motivo se utilizó este químico como agente permeabilizante y como control positivo.

La presencia de la proteína NS1 puede contribuir a la desestabilización del epitelio intestinal y de las barreras que lo conforman. Para elegir el tiempo de medición de los ensayos, estos se estandarizaron en los controles (negativo y positivo), en una cinética de 24, 48 y 72 hpt. En las primeras horas se observó la desestabilización de las barreras que median la permeabilidad intestinal, sin embargo, este efecto se perdió a las 48 y 72 h. Esto puede deberse a la fisiología del vector. Se sabe que en las primeras horas de alimentación se induce la síntesis de la matriz peritrófica, la cual es una barrera contra agentes físicos, químicos y biológicos (Kato y otros, 2006). En las primeras horas, la presencia del DTT impide una correcta síntesis de la matriz, por lo que el colorante puede detectarse en el hemocele del insecto; sin embargo, la síntesis de la matriz peritrófica es continúa, por lo que en horas posteriores puede continuar con su correcta síntesis, impidiendo de nuevo la salida del colorante. Otro factor que considerar es la digestión del colorante y su salida por las heces del vector. A las 48 h, ya se encuentra procesado casi en su totalidad todo el alimento ingerido por el vector, además de que participan otros órganos que funcionan en la osmorregulación de los componentes de la hemolinfa (túbulos de Malpighi), pudiendo eliminar el colorante presente en ésta en esos tiempos post-tratamiento (Lehane y Billingsley, 1996).

La proteína NS1 puede actuar en un tiempo temprano, anterior a las 24 horas del ensayo. Se sabe que una de las estrategias que tienen los patógenos para establecerse en el intestino de *A. Aegypti*, es la invasión temprana de este órgano antes de que se formen las barreras físicas que impidan su paso y además, retrasar su formación para la continua invasión a lo largo del intestino (Beaty y Marquardt, 1996). Por tal motivo, se realizó una estandarización en tiempos tempranos (12 y 24 h). El resultado obtenido fue una salida del colorante al tiempo corto (12 h), aún mayor que la observada a las 24 h. La reparación de las barreras físicas ha sido reportada en las primeras horas post-infección en estos mosquitos, sugiriendo que en tiempos tempranos pueda verse un cambio más evidente en el modelo, antes de que actúen los mecanismos de reparación involucrados en la homeostasis del intestino (Jahen, Osman y Kambris, 2017). No existe ningún modelo que pueda medir los cambios de permeabilidad en el epitelio intestinal del mosquito *A. aegypti*, por lo que el presente trabajo contribuyó a estandarizar las condiciones necesarias para poder evaluar este fenómeno.

Una vez estandarizando el modelo, se prosiguió a evaluar la capacidad de la proteína NS1 de alterar la permeabilidad del intestino del vector. Los principales mecanismos de resistencia reportados en vectores refractarios para los arbovirus se centran principalmente en la maquinaria de ARN de

interferencia (Bronkhorst y Rij, 2014). Se desconoce el mecanismo exacto por el cuál es reconocido el genoma viral; sin embargo, se ha reportado la generación de siRNA y piwiRNA, los cuales están dirigidos contra el ARN viral de DENV y ZIKV (Hazitha-Samuel y otros, 2018; Wang y otros, 2018). Se sabe que la proteína NS1 de DENV tiene la capacidad de inmuno-modular de manera negativa la respuesta inmune de los vectores (Liu y otros, 2016; Choy y otros, 2020). Esto resulta importante para el establecimiento del virus en los mosquitos; sin embargo, se desconoce si el papel desestabilizante reportado para la NS1 en los endotelios de vertebrados, pueda actuar en los tejidos del mosquito.

Los resultados mostraron una tendencia al salir una mayor cantidad de trazas del colorante vegetal respecto al control negativo. Los valores de absorbancia fueron muy parecidos entre los sobrenadantes de células infectadas con presencia de la proteína NS1 y la ingesta de la proteína NS1 recombinante a 400 ng de concentración (promedio de 0.1 de absorbancia). Esto resulta interesante, ya que se sabe que DENV afecta al epitelio intestinal, induciendo las células a apoptosis, lo que le permitiría al virus escapar al hemocele de los mosquitos (Eng, 2016). Sin embargo, la proteína NS1 parecería favorecer el proceso e inducir una mayor salida del colorante en la hemolinfa de los insectos. Cuando se calentó la NS1r se perdió la tendencia observada. Se sabe que esta proteína es sensible a temperaturas altas (Muller y Young, 2013), por lo que su posible mecanismo fue abatido por este proceso. Aunque las tendencias observadas no resultaron significativas, los resultados sugieren que efectivamente, y en concordancia a lo ya previamente reportado con células de vertebrados en cultivo (Puerta-Guardo, Glasner y Harris, 2016), la proteína NS1 posee capacidad desestabilizante de epitelios también en el mosquito vector. Se desconoce el posible mecanismo a través del cual NS1 está desestabilizando las uniones intraepiteliales en el intestino del insecto, pero cabría esperar que son los mecanismos semejantes a los que operan en la desestabilización de las células de vertebrados. Este modelo tal vez no presente la suficiente sensibilidad para evaluar los cambios de permeabilidad en el intestino; fisiológicamente el insecto sufre cambios en la homeostasis del epitelio intestinal inducidos por la alimentación sanguínea (Amstrong y otros, 2020). En otros trabajos, para elucidar el papel de la proteína NS1 como inmunoregulador, se utilizaron concentraciones de hasta 10 µg (Liu y otros, 2016, por lo que si se aumentara la concentración en futuros ensayos, tal vez se podría observar un cambio más evidente. Otro factor interesante que debe considerarse es que la proteína NS1 ingerida puede tener una función diferente respecto a la proteína NS1 sintetizada y liberada en los tejidos del mosquito. Se

conoce que esta proteína es detectada en los vertebrados por un receptor Tipo Toll 4 (TLR4); sin embargo, en mosquitos se desconoce cuál podría ser el receptor. Además, existen diferencias en su estructura, ya que la NS1 secretada por los insectos carece de las glicosilaciones complejas que ocurren en las células de vertebrado (Alcalá y otros, 2017). La importancia del patrón de glicosilación para las funciones de NS1 en el mosquito vector quedó demostrada, ya que se observó que la NS1 con mutaciones en sus sitios de glicosilación carece de su papel inmunoregulador en *A. aegypti* (Choy y otros, 2020). Se necesitan más estudios al respecto.

Por otro lado, la invasión de DENV a los tejidos de *A. aegypti* representa un costo en términos de fecundidad y supervivencia; aunque se desconoce el papel que pueda tener la proteína NS1 en el establecimiento viral dentro del vector. Considerando que todo el tiempo el virus está acompañado de NS1 soluble, es probable que ésta participe en el establecimiento del virus dentro del vector (Maciel y otros, 2011). En los ensayos de cinética de dispersión del virus dentro del mosquito, se utilizó un inóculo viral de  $1 \times 10^7$ . Se evaluaron infecciones a las 12, 24 y 48 hpi, obteniendo un porcentaje de infección en los intestinos de mosquitos del 40%. Esto corresponde por lo reportado por Salazar y colaboradores (2007), ya que el porcentaje de infección comienza con una tasa baja, la cuál va incrementando los días posteriores, hasta establecerse en la primera barrera que enfrenta el virus dentro del insecto. En las patas de *A. aegypti*, se encontró una positividad para las muestras del 30% a las 12 hpi. Esto resulta interesante, ya que en un tiempo muy temprano se observó una positividad que se pierde en los siguientes puntos evaluados. Se sabe que la alimentación sanguínea provoca microfaturas en el epitelio intestinal del vector, pudiéndose ser una vía de escape para algunos viriones; sin embargo, estos no pueden establecerse en tejidos secundarios (Amstrong y otros, 2020). Se sabe que es necesario el establecimiento de diferentes arbovirus para que se generen nuevas copias virales y puedan invadir otros tejidos secundarios (Girard y otros, 2005; Franz y otros, 2015). Además, el inóculo inicial puede modificar el establecimiento de los virus en los tejidos del mosquito. Un bajo inóculo inicial puede causar un dinamismo complejo en los títulos virales reportados en diferentes tejidos, siendo positivos en los primeros días, no detectarse posterior a las 72 h y nuevamente encontrándose copias virales en tiempos tardíos (Novelo y otros, 2019).

La proteína NS1 es una proteína multifuncional, que solamente es expresada en flavivirus transmitidos por mosquitos y que posee la característica poco común entre los agentes virales, de ser secretada abundantemente al medio extracelular, a pesar de ser una proteína no estructural. En

el huésped vertebrado, NS1 soluble parece ser un factor viral determinante para el establecimiento de la infección no solo del DENV, sino también de otros flavivirus de importancia en salud pública como el ZIKV y el virus de la fiebre amarilla, ya que favorece la invasión de estos virus a los tejidos blancos (Puerta-Guardo y otros, 2020). La acción facilitadora de NS1 parece estar asociada a la capacidad de la NS1 de abrir las uniones estrechas y de inducir la degradación del glicocalix de las células (Puerta Guardo y otros, 2016; 2020). Los resultados mostrados en este estudio, aunque preliminares, sugieren que también en el mosquito vector, NS1 parece ser un factor viral clave para favorecer el establecimiento de la infección, a través de su función inmunomoduladora y también por su función permeabilizante. Dado el impacto de las infecciones causadas por los flavivirus en salud pública, es importante conocer a fondo la interacción de estos virus con sus vectores, a fin de diseñar estrategias que permitan el control de estas enfermedades.

## Conclusiones

- Se logró estandarizar un modelo que desestabiliza el epitelio intestinal en mosquitos, el cual resultará útil para estudios de permeabilidad asociados a las infecciones de mosquitos con DENV o con algún otro virus o parásito que utilice a *Aedes aegypti* como vector.
- Se observó una tendencia de salida del colorante de los intestinos de mosquitos tratados con sobrenadantes de cultivo infectados con DENV y con NS1r, pero no con NS1r desnaturalizada, sugiriendo una actividad desestabilizante de NS1 sobre la barrera intestinal.
- Se observó la presencia a las 12 hpi del virus DENV en las patas, de casi el 50% de los mosquitos infectados, aunque disminuyó significativamente en tiempos posteriores (24 y 48h), sugiriendo que la infección y dispersión del virus dengue en los mosquitos es sumamente dinámica.

## Perspectivas

- Repetir los ensayos de permeabilidad aumentando el número de repeticiones biológicas y la concentración de la proteína NS1 recombinante y títulos virales, buscando observar un cambio más evidente y significativo en la permeabilidad intestinal.
- Realizar ensayos de permeabilidad utilizando virus purificados (desprovistos de NS1) y rNS1 en presencia de anticuerpos anti-NS1, con la finalidad de elucidar si por sí misma la proteína NS1 posee capacidad desestabilizante.
- Realizar análisis morfológicos por histología para explicar un posible mecanismo de acción de la NS1 dentro del vector *A. aegypti* y su papel en los cambios de permeabilidad del intestino.
- Repetir los ensayos de dispersión, incluyendo virus purificados (desprovistos de NS1) y evaluar además de intestino y patas, glándulas salivares, ya que este tejido es el de mayor relevancia para la dinámica de la enfermedad.

## Bibliografía

- Ahmad, Z., & Poh, C. (2019). The Conserved Molecular Determinants of Virulence in Dengue Virus. *Int J. Med. Sci.*, 355-365.
- Akey, D., Brown, C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T., . . . Smith, J. (2014). Flavivirus NS1 crystal structures reveal a surface for membrane association and regions of interaction with the immune system. *Science*, 343: 881–885.
- Alcalá, A., Hernández-Bravo, R., Medina, F., Coll, D., Zambrano, J., del Angel, R., & Ludert, J. (2017). The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted from infected mosquito cells via a non-classical caveolin-1-dependent pathway. *Journal of General Virology*, 98: 2088-2099.
- Alcalá, A., Medina, F., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., Fragoso-Soriano, R., Vásquez, C., . . . Ludert, J. (2016). The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted efficiently from infected mosquito cells. *Virology*, 278-287.
- Alcalá, A., Palomares, L., & Ludert, J. (2018). Secretion of Nonstructural Protein 1 of Dengue Virus from Infected Mosquito Cells: Facts and Speculations. *Journal of Virology*, 92: 1-9.
- Armstrong, P., Ehrlich, H., Magalhaes, T., Miller, M., Conway, P., Bransfield, A., . . . Brackney, D. (2020). Successive blood meals enhance virus dissemination within mosquitoes and increase transmission potential. *Nature Microbiology*, 1-22.
- Balimane, P., & Chong, S. (2005). Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today*, 335: 1-9.
- Beatty, P., Puerta-Guardo, H., Killingbeck, S., Glasner, D., Hopkins, K., & Harris, E. (2015). Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Science Translational Medicine*, 7: 1-13.
- Beatty, B., & Marquardt, W. (1996). *The Biology of Disease Vectors*. Chicago, Illinois: Colorado.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., & otros., y. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496: 504-507.
- Bronkhorst, A., & Rij, R. (2014). The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. *Current Opinion in Virology*, 7: 19-28.
- Carvajal-Carvajal, C. (2017). El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34: 1-11.
- Chen, H., Chuang, Y. C., Lin, Y. S., Liu, H. S., Liu, C. C., & Perng, G. C. (2016). . Dengue Virus Non structural Protein1 Induces Vascular Leakage through Macrophage Migration Inhibitory Factor and Autophagy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10: 1-7.
- Chen, H., Lai, Y., & Yeh, T. (2018). . Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science*, 25: 1-11.

- Chen, R., & Vasilakis, N. (2011). Dengue-Quo tu et quo vadis? *Viruses*, 3:1562-1608.
- Cheong-Huat, T., Pei-Sze, J., Mei-Zhi, I., Indra, V., & Lee-Ching, N. (2011). Evaluation of the Dengue NS1 Ag Strip for Detection of Dengue Virus Antigen in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 789-792.
- Choy, M., Siriphanitchakorn, T., Ching, W., Sundstrom, K., Cheng, H., Chan, K., . . . Eong-Ooi, E. (2020). A Non-structural 1 Protein G53D Substitution Attenuates a Clinically Tested Live Dengue Vaccine. *Cell Press*, 31: 1-20.
- Chuang, Y., Wang, S., Lin, Y., Chen, H., & Yeh, T. (2013). Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *Journal of Biomedical Science*, 20: 42-49.
- Coleman, J., Juhn, J., & James, A. (2007). Dissection of Midgut and Salivary Glands from *Ae. aegypti* Mosquitoes. *Journal of Visualized Experiments*, 228: 1.
- Conde, J. N., Silva, E. M., Barbosa, A. S., & Mohana-Borges, R. (2010). The Complement System in Flavivirus Infections. *Frontiers in Microbiology*, 10: 3389.
- Conde, J., da Silva, E., Allonso, D., Coelho, D., Andrade, I., de Medeiros, L., . . . Mohana-Borges, R. (2016). Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins. *Journal of Virology*, 90: 21-33.
- Cui, Y., Grant, D., Lin, J., & Franz, A. (2019). Zika Virus Dissemination from the Midgut of *Aedes aegypti* is Facilitated by Bloodmeal-Mediated Structural Modification of the Midgut Basal Lamina. *Viruses*, 1-18.
- Danet, L., Beauclair, G., Berthet, M., Moratorio, G., Gracias, S., Tangy, F., . . . Jovenet, N. (2019). Midgut barriers prevent the replication and dissemination of the yellow fever vaccine in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1-18.
- De Oliveira, S., de Oliveira, I., de Souza, W., & Morgado-Díaz, J. (2005). Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Letters*, 579: 6179-6185.
- Dong, S., Balaraman, V., Kantor, A., Lin, J., Grant, G., Held, N., & Franz, A. (2017). Chikungunya virus dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* is associated with temporal basal lamina degradation during bloodmeal digestion. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1-26.
- Edwards, M., & Jacobs-Lorena, M. (2000). Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Journal of Insect Physiology*, 46: 1313-1320.
- Eng, M. (2016). Apoptosis-related genes control autophagy and influence DENV-2 infection in the mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 70-83.
- Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2014). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Flint, J., Racaniello, V., Rall, G., & Skalka, A. (2014). *Principles of Virology*. Washington: ASM Press.

- Fontaine, A., Jiolle, D., Moltini-Conclois, I., Lequime, S., & Lambrechts, L. (2016). Excretion of dengue virus RNA by *Aedes aegypti* allows non-destructive monitoring of viral dissemination in individual mosquitoes. *Scientific Reports*, 6: 1-10.
- Franz, A., Kantor, A., Passarelli, L., & Clem, R. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, 7: 3741-3767.
- Girard, Y., Popov, V., Wen, J., Han, V., & Higgs, S. (2005). Ultrastructural Study of West Nile Virus Pathogenesis in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 42: 429-444.
- Glasner, D., Puerta-Guardo, H., Beatty, P., & Harris, E. (2018). The Good, the Bad, and the Shocking: The Multiple Roles of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 in Protection and Pathogenesis. *Annual Review of Virology*, 5: 13.1-13.27.
- Guzman, M. G., & Harris, E. (2015). Dengue. *Lancet*, 385: 453-465.
- Hazitha-Samuel, G., Adelman, Z., & Myles, K. (2018). Antiviral immunity and virus-mediated antagonism in disease vector mosquitoes. *Trends in microbiology*, 26: 447-461.
- Heinz, F., & Stiansy, K. (2012). Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology*, 55: 289-295.
- Hong-Ru, C., Yen-Chung, L., & Trai-Ming, Y. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor: therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science*, 25: 1-1.
- Hyllested, J., Veje, K., & Ostergaard, K. (2002). Histochemical studies of the extracellular matrix of human articular cartilage- a review. *Journal of the OsteoArthritis Research Society International*, 10: 333-343.
- Izumi, Y., & Furuse, M. (2014). Molecular organization and function of invertebrate occluding junctions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36: 186-193.
- Izumi, Y., Motoishi, M., Furuse, K., & Furuse, M. (2016). A tetraspanin regulates septate junction formation in *Drosophila* midgut. *Journal of Cell Science*, 129: 1155-1164 .
- Janeh, M., Osman, D., & Kambris, Z. (2017). Damage-Induced Cell Regeneration in the Midgut of *Aedes albopictus* Mosquitoes. *Scientific Reports*, 1-10.
- Jonusaite, S., Donini, A., & Kelly, S. P. (2015). Occluding junctions of invertebrate epithelia. *Journal of Comparative Physiology*, 186: 17-43.
- Kato, N., Mueller, C., Fuchs, J., Wessely, V., Lan, Q., & Christensen, B. (2006). Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 1-9.
- Khoo, C., Doty, J., Held, N., Olson, K., & Franz, A. (2013). Isolation of midgut escape mutants of two American genotype dengue 2 viruses from *Aedes aegypti*. *Virology Journal*, 10: 1-11.

- Lanciotti, R., Gluber, D., & Trend, D. (1997). Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *Journal of General Virology*, 78: 2279-2286.
- Laureti, M., Narayanan, D., Rodrigez-Andres, J., Fazakerley, J. K., & Kedzierski, L. (2018). Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in Immunology*, 9: 1-11.
- Lehane, & Billingsley. (1996). *Biology of the Insect Midgut*. Londres: Champman & Hall.
- Libraty, D. H., Young, P. R., Pickering, D., Endy, T. P., Kalayanarooj, S., Green, S., . . . Rothman, A. L. (2002). High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 186: 1165-1168.
- Liu, J., Liu, Y., Nie, K., Du, S., Qiu, J., Pang, X., . . . Cheng, G. (2016). Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nature Microbiology*, 16087: 1-12.
- Maciel-de-Freitas, R., Koella, J., & Lourenco-de-Oliveira, R. (2011). Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 452-458.
- Miguel-Allaga, I., Jasper, H., & Lemaitre, B. (2018). Anatomy and Physiology of the Digestive Tract of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 2010: 357-396.
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D., Panetta, A., Sester, D., Liu, L., . . . Young, P. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science Translational Medicine*, 7: 1-12.
- Muller, D., & Young, P. (2013). The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic. *Antiviral Research*, 192-208.
- Novelo, M., Hall, M., Pak, D., Young, P., Holmes, E., & McGraw, E. (2019). Intra-host growth kinetics of dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLOS Pathogens*, 1-19.
- Pang, J., Chla, P., Lye, D., & Leo, Y. (2017). Progress and Challenges towards Point-of-Care Diagnostic Development for Dengue. *Journal of Clinical Microbiology*, 55: 3339-3349.
- Paula, S., Nunes, C., Matos, R., Oliveira, Z., Malta-Lima, D., & Fonseca, B. (2001). Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 98: 119-125.
- Poritz, L., Garver, K., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., & Koltun, W. (2007). Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *Journal of Surgical Research*, 12-19.
- Proyecto ZIKA AIRS, Z. (2019). Manual práctico para el funcionamiento de un insectario: Procedimientos de cría de la especie *Aedes aegypti* y principios básicos de bioseguridad. Rockville, MD: Abt Associates.

- Puerta-Guardo, H., Glasner, D., & Harris, E. (2016). Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hiperpermeability. *PLOS Pathogens*, 1-29.
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D., Espinosa, D., Wang, C., Beatty, P., & Harris, E. (2019). Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Reports*, 26: 1598-1613.
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D., Espinosa, D., Wang, C., Beatty, R., & Harris, E. (2019). Flavivirus NS1 triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Reports*, 26: 1598-1613.
- Radu, M., & Chemoff, J. (2013). An in vivo Assay to Test Blood Vessel Permeability. *Journal of Visualized Experiments*, 73: 1-4.
- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *BioMed Central*, 13: 131.
- Rera, M., Clark, R., & Walker, D. (2012). Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *PNAS*, 109: 1-6.
- Reyes-Sandoval, A., & Ludert, J. (2019). The Dual Role of the Antibody Response Against the Flavivirus Non-structural Protein 1 (NS1) in Protection and Immuno-Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, 10: 1-6.
- Rodenhuis-Zybert, I., Wilschut, J., & Smith, J. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 2773–2786.
- Rosales, R., & Ludert, J. (2019). The Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Is Secreted from Mosquito Cells in Association with the Intracellular Cholesterol Transporter Chaperone Caveolin Complex. *Journal of Virology*, 93: 1-25.
- Salazar, I., Richardson, J., Sánchez-Vargas, I., Olson, E., & Beaty, B. (2007). Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*, 7: 9-22.
- Scaturro, P., Cortese, M., Chatel-Chaix, L., Fischl, W., & Bartenschlager, R. (2015). Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLOS Pathogens*, 1-32.
- Schott, U., Solomon, C., Fries, D., & Bentzer, P. (2016). The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 24: 48-56.
- Secretaría de Salud. (21 de Agosto de 2020). Obtenido de Paronama Epidemiológico de Dengue: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/494904/Pano\\_dengue\\_37\\_2019.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/494904/Pano_dengue_37_2019.pdf)
- Serrato-Salas, J., Izquierdo-Sánchez, J., Argüello, M., Conde, R., Alvarado-Delgado, A., & Lanz-Mendoza, L. (2018). *Aedes aegypti* adaptive response against DENV-2. *Developmental and Comparative Immunology*, 84: 28-36.

- Shao, L., Devenport, M., & Jacobs-Lorena, M. (2001). The Peritrophic Matrix of Hematophagous Insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47:119–125.
- Taracena, M., Bottino-Rojas, V., Taiyuli, O., Walter-Nuno, A., Oliveira, J., Angleró-Rodríguez, Y., . . . Paiva-Silva, G. (2018). Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1-21.
- Terra, W., Barroso, I., Dias, R., & Ferreira, C. (2019). Molecular physiology of insect midgut. *Advances in insect physiology*.
- Terra, W., Barroso, I., Dias, R., & Ferreira, C. (2019). Molecular physiology of insect midgut. En *Advances in Insect Physiology* (pág. 353). Londres: Academic Press.
- Thiemmecca, S., Tamdet, C., Punyadee, N., Prommool, T., Songjaeng, A., Noisakran, S., . . . Avirutnan, A. (2016). Secreted NS1 Protects Dengue Virus from Mannose-Binding Lectin-Mediated Neutralization. *Journal of Immunology*, 197: 4053-4065.
- Tyran, S., Puhar, A., Ngo-Camus, M., & Ramarao, N. (2011). Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLOS One*, 6: 1-5.
- Villalon, J., Ghosh, A., & Jacobs-Lorena, M. (2003). The peritrophic matrix limits the rate of digestion in adult *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 49: 891-895.
- Voge, N., Sánchez-Vargas, I., Blair, C., Eisen, L., & Beaty, B. (2013). Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Infected *Aedes aegypti* Using a Commercially Available Kit. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10: 1-11.
- Wang, C., Puerta-Guardo, H., Biering, S., Glasner, D., Tran, E., Patana, M., . . . Harris, E. (2019). Endocytosis of flavivirus NS1 is required for NS1-mediated endothelial hyperpermeability and is abolished by a single N-glycosylation site mutation. *PLOS Pathogens*, 1-33.
- Wang, Y., Jin, P., Li, J., Chen, X., & Gu, J. (2018). piRNA Profiling of Dengue Virus Type 2-Infected Asian Tiger Mosquito and Midgut Tissues. *Viruses*, 10: 1-20.
- Watterson, D., Modhiran, N., & Young, P. (2016). The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Research*, 130: 7-18.
- Waver, S., & Vasilakis, N. (2009). Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 9: 523-540.
- Wilder-Smith, A., Ooi, E., Horstick, O., & Wills, B. (2019). Dengue. *Lancet*, 393: 350-363.
- Wu, P., Yu, X., Wang, P., & Cheng, G. (2019). Arbovirus life cycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 21: 1-6.