

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Análisis funcional de la proteína enolasa en la unión del DENV-2 a Midgut
de *Aedes aegypti* y células C6/36”

Tesis que presenta

M. EN C. CÉSAR ARMANDO BRITO CARREÓN
para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de la Tesis

Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno

Dra. Javiera Cervini Silva

Ciudad de México

Febrero 2021

Índice

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	1
Resumen	4
Abstract.....	5
1.- Introducción.....	6
1.1.- Características del virus del dengue.	8
1.2 Mosquitos vectores del DENV.	9
1.2.1 Taxonomía.....	11
1.2.2 El ciclo de vida del vector.	11
1.2.3 Importancia como vector del dengue.	14
1.3 Definición de la enfermedad por el virus del dengue.	16
1.3.1 Dengue en México.	16
1.3.2 Mecanismo de transmisión.	17
1.3.3 Estabilidad del RNA genómico.....	17
1.3.4 Inmunidad	17
1.3.5 Diagnóstico.....	19
1.3.6 Magnitud del problema	19
1.4 Unión del DENV al receptor celular.	21
1.4.1 Receptores putativos en células de mamíferos.....	21
1.4.2 Receptores putativos en células de mosquitos.	25
1.4.3 Funciones descritas para la proteína Enolasa.....	29
1.5 Antecedentes Directos.....	33
1.6 Justificación	35
1.7 Hipótesis.....	35
1.8 Objetivo General.....	35
1.9 Objetivos particulares.....	35
2.- Materiales y Métodos	36
2.1 Línea celular y cepa viral	36
2.2 Serotipificación del DENV	37
2.3 Reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa	37

2.4 Anticuerpos.....	37
2.5 Cromatografía de afinidad	38
2.6 Inhibición de la infección e inmunoblot.....	39
2.7 Conteo de sincitios en células C6/36 infectadas con DENV	39
2.8 Viabilidad	40
2.9 Inmunofluorescencia Indirecta.....	40
2.10 Docking Molecular	41
2.11 Búsqueda de dominios transmembranales.....	42
2.12 Inmuno Microscopía Electrónica de Barrido y espectrometría de dispersión de energía de rayos X	42
2.13 Microscopía de fuera atómica	43
2.14 Análisis estadístico	43
3.- Resultados	43
3.1 Serotipificación de la muestra clínica con DENV.....	43
3.2 Cromatografía de afinidad acoplando DENV-2 a Sefarosa 4B	45
3.3 Inhibición de la infección del DENV-2 con anti-Enolasa	47
3.4 Viabilidad celular con anticuerpos anti-enolasa	49
3.5 Localización de enolasa en células C6/36	51
3.6 Colocalización de Proteína E del DENV-2 y enolasa en membrana celular	52
3.7 Colocalización de Proteína E del DENV-2 y enolasa en núcleo celular	54
3.8 Colocalización de enolasa y proteína E del DENV en midgut	55
3.9 Búsqueda <i>in silico</i> de dominios transmembranales de enolasa	56
3.10 docking molecular entre la proteína E del DENV-2 y enolasa	57
3.11 Expresión de enolasa en <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	60
3.12 Columna de afinidad acoplando el anti-ENO-Gamma a Sefarosa 4B	64
3.13 Observación del DENV mediante Inmuno Microscopía electrónica de Barrido.....	66
4. Discusión	75
Conclusión.....	83
Referencias.....	84

Resumen

El dengue es una infección causada por el virus del dengue (DENV), se han descrito 4 serotipos que son transmitidos principalmente por los mosquitos vectores *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) y *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*). Actualmente, no existen antivirales para tratar la enfermedad causada por el virus del dengue (DENV), la cual solo se trata con reposo en cama e hidratación oral. Uno de los esfuerzos para detener la transmisión se centra en los receptores al DENV en el mosquito *Aedes sp.* y con ello controlar la transmisión del vector. Hasta la fecha, se han descrito diferentes receptores putativos, incluida la enolasa. Sin embargo, la unión del DENV en la célula no se ha demostrado directamente en células de mosquitos o en el intestino medio de mosquitos *Ae. aegypti*. En consecuencia nosotros determinamos si la enolasa es una proteína de membrana que se une específicamente al DENV, para ello se utilizaron anticuerpos específicos anti-enolasa que fueron probados en; ensayos de inhibición viral y en ensayos de co-localización de enolasa con la proteína E de DENV. Además, tres modelos de predicción de dominios transmembranales nos indican que la proteína enolasa tiene secuencias aminoácidas que pueden localizarla en la membrana celular. También, la interacción entre enolasa y la proteína E del DENV se modeló *in silico* utilizando los programas PatchDock y FireDock. Nuestros resultados demostraron que la enolasa se encuentra en la membrana de las células C6/36 y midgut de mosquitos *Ae. aegypti*; el DENV y enolasa co-localizan en la membrana celular; y que anticuerpos específicos anti-enolasa inhiben la infección en células de mosquito C6/36. Esto sugiere que la enolasa participa en el mecanismo de entrada de DENV-2 en las células de mosquito.

Abstract

Dengue is an infection caused by the dengue virus (DENV), 4 serotypes have been described that are mainly transmitted by the vector mosquitoes *Aedes aegypti* (*Ae. Aegypti*) and *Aedes albopictus* (*Ae. Albopictus*). Currently, the disease is treated with bed rest and oral hydration since there are no effective antivirals to cure it. One of the efforts to stop transmission is focused on DENV receptors in the mosquito *Aedes sp.* to control vector transmission. Up to date, there are different putative receptors described including the protein enolase. However, the binding of DENV with the cell has not been demonstrated directly in mosquito cells or in the midgut of the *Ae. aegypti* mosquitoes. Consequently, we determined whether enolase is a membrane protein that binds specifically with DENV using anti-enolase specific antibodies and by co-localisation of enolase and E protein of DENV-2. In addition, three models for the prediction of transmembrane domains indicate that enolase protein has amino acid sequences that can locate it in the cell membrane. Additionally, the interaction of enolase with DENV E protein was modelled *in silico* using the programs PatchDock and a refinement by FireDock . Our results demonstrated that enolase is located in the membrane of C6/36 cells and midgut cells of *Ae. aegypti* mosquitoes; the DENV and enolase co-localized; and specific antibodies against enolase inhibited cell infection. This suggests that enolase protein participates in the entry mechanism of DENV-2 into the cells.

1.- Introducción.

El dengue es una infección causada por el virus del dengue (DENV), se han descrito 4 serotipos, que son transmitidos principalmente por los mosquitos vectores *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) y *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) (Mousson, 2005; Gubler, 2002). Conforme a la estimación más reciente, se ha calculado que se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año (intervalo creíble del 95%: 284 a 528 millones), de estos, 96 millones (67 a 136 millones) se manifiestan clínicamente (Bhatt et al., 2013). Otro estudio sobre la prevalencia del dengue estimó que más de 3,970 millones de personas, de 128 países están en riesgo de contraer la enfermedad (Brady et al., 2012).

La enfermedad del dengue se puede presentar como; dengue o dengue severo (WHO, 2015; Barniol et al., 2011; Amin et al., 2018). El dengue es una enfermedad viral sistémica aguda que se ha establecido en casi todo el mundo generando ciclos de transmisión endémicos y epidémicos (Bhatt et al., 2013).

La infección con DENV en humanos se presenta a menudo sin síntomas de la enfermedad (Simmons et al., 2012), pero en ocasiones las manifestaciones clínicas van desde una fiebre leve hasta el síndrome de choque por dengue que puede ser mortal (WHO, 2009). La diversidad de los signos y síntomas pueden deberse en parte, a que después de la infección por dengue de uno de los 4 serotipos se genera inmunidad contra ese serotipo específico (Halstead, 1988; De Alwis, 2014) y es frecuente que una infección secundaria por otro serotipo del DENV cause una infección de mayor severidad (Simmons et al., 2012).

La infectividad del virus depende de factores del hospedero (Navarro et al., 2003) tales como; sistema inmune (Tang et al., 2015), capacidad de

glicosilar viriones (Naik & Wu, 2015), o infecciones por un segundo serotipo del mismo DENV en el cual ocurre el mecanismo llamado “Antibody-dependent enhancement” (Halstead, 1988; Simmons et al., 2012; De Alwis, 2014; Katzelnick, 2017).

Las partículas virales del DENV contienen RNA de cadena simple de polaridad positiva, son envueltas y tienen aproximadamente 44-52 nm de diámetro, pertenece a la familia *Flaviviridae* del género, *Flavivirus* (Acosta et al., 2008; Murphy & Whitehead, 2011).

No existen antivirales para el tratamiento de la enfermedad producida por el DENV (Flipse et al., 2015) y el tratamiento es solo de apoyo, a base de reposo y rehidratación (WHO, 2009) La transfusión de sangre está indicada solamente cuando una hemorragia intensa ocasiona un descenso real del índice de hematocrito (Benenson, 1997).

Además hasta la fecha no hay una vacuna efectiva contra los 4 serotipos del virus del dengue (Stephen, 2014; Enahoro et al., 2018). Por ello los esfuerzos para frenar la transmisión del virus del dengue se basan en la eliminación del vector utilizando agentes químicos, biológicos y en la destrucción de criaderos (WHO, 2009).

El ciclo de infección del DENV inicia cuando las proteínas de la envoltura del virus se unen a su receptor, este reconocimiento del virus por su célula blanco permite la internalización del virus que generalmente ocurre por endocitosis (Acosta et al., 2008). Posterior a la internalización el RNA viral se libera al citoplasma (Pierson & Keilian, 2013), este RNA es de cadena sencilla y de sentido positivo, el cual funciona como RNA mensajero y subsecuentemente es traducido por la maquinaria celular (Talarico & Damonte, 2007), después se da la replicación y se generan viriones de novo (Heaton & Randall, 2011) al ensamblarse en el retículo endoplasmático, estos viriones pasan al aparato de Golgi donde son

transportados por la red trans Golgi y son secretados, con lo cual se vuelve a iniciar el ciclo del virus (Yu et al., 2009).

El reconocimiento del DENV por sus células blanco depende de la interacción entre proteínas virales y componentes de la membrana plasmática (Cruz et al., 2015) por ello conocer las moléculas que actúan como receptor al DENV nos permitirá desarrollar antivirales específicos o generar mosquitos transgénicos carentes de receptores para el DENV o modificados estructuralmente.

Ya que un estudio previo identificó a enolasa como una proteína de unión al DENV o al Dominio III de la proteína de la Envoltura (E) mediante cromatografía de afinidad y espectrometría de masas (Muñoz et al., 2013), en este trabajo nos enfocaremos a estudiar la interacción de la enolasa con el DENV al inicio de la infección, para poder discernir el papel de esta proteína en el reconocimiento e internalización del virus del dengue.

1.1.- Características del virus del dengue.

El dengue es una enfermedad causada por el dengue virus (DENV) el cual pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, es un virus de RNA de cadena simple y positiva (ssRNA+), de aproximadamente 11 kilobases, el genoma esta insertado en una nucleocápside icosaedral y con envoltura lipídica, (Talarico & Damonte, 2007) se conocen 4 serotipos de este virus (Heaton & Randall, 2011); DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Este virus es transmitido principalmente por los vectores *Ae. aegypti* o *Ae. albopictus* (Heaton & Randall, 2011). El ciclo replicativo del DENV en células Vero es efectuado entre las 12 y 16 horas (Talarico & Damonte, 2007).

Mediante microscopia electrónica de transmisión se ha determinado que el tamaño de la partículas virales unidas a invaginaciones electrodenudas en la membrana plasmática es de 44-52 nm en células de mosquito C6/36, estas partículas virales requiere endocitosis mediada por clatrina, lo que

sugiere que el DENV-2 requiere el reconocimiento de receptores para su internalización en células C6/36 (C6/36); también se demostró que este endosoma requiere de un pH ácido para la desencapsidación del genoma viral e infección productiva (Acosta et al., 2008).

El RNA viral es traducido en un solo marco de lectura abierto (Talarico & Damonte, 2007) y es subsecuentemente cortado por proteasas virales y celulares, que da como resultado la liberación de 10 proteínas virales; 3 estructurales que mantienen la forma y estructura de la partícula viral y 7 proteínas no estructurales, que se encargan de mediar los procesos replicativos, de transcripción, traducción, ensamblaje y evasión de la respuesta inmune mediada por la célula hospedera (Heaton & Randall, 2011) (Tabla 1).

La replicación del DENV ocurre en invaginaciones del retículo endoplasmático (Wang et al., 2009). Por otro lado la autofagia modula la fisiología celular al tener un papel indirecto en la replicación del DENV al modular el metabolismo lipídico de la célula, DENV induce la formación de autofagosomas que eliminan los triglicéridos celulares contenidos en gotas lipídicas produciendo el incremento de β -oxidación y producción de energía (Heaton & Randall, 2011). Además se ha propuesto que el DENV-2 y DENV-3 puede replicar en anfisomas de células HepG2 (Panyasrivanit et al., 2009; Khakpoor et al., 2009).

El ensamblaje de las partículas virales infecciosas requiere del empaquetamiento del genoma dentro de la nucleocápside. DENV ha sido encontrado en vesículas dentro de la vía secretora del Golgi lo que indica que este ensamblaje puede ocurrir en este organelo para su posterior secreción por la vía de secreción trans Golgi. (Wang et al., 2009).

1.2 Mosquitos vectores del DENV.

El mosquito *Aedes. aegypti* Linnaeus, 1762 (*Ae. Aegypti*), es el principal vector del DENV, el cual produce la enfermedad del dengue, que ha

estado presente durante siglos en América, esta enfermedad es principalmente urbana (Nelson, 1986; Lee & Rohani, 2005; Mercado et al., 2008; Kamgang et al., 2019), el ciclo de transmisión es hombre - *Ae. aegypti* - hombre, sin antecedentes de ciclos silvestres en el continente (Nelson, 1986). El vector secundario de esta enfermedad es *Ae. albopictus* (Ibáñez & Martínez, 1994; Lee & Rohani, 2005; Kamgang et al., 2019).

Tabla 1. Funciones descritas de las proteínas estructurales y no estructurales del DENV.

	Proteína	Función	Referencia
Estructurales	C; Capside	Forma el core del DENV, se une a RNA de simple cadena, además puede translocar ácidos nucleicos a través de las membranas celulares.	Ma et al., 2004; Freire et al., 2013; Zhang et al., 2003
	prM; Precursor a de membrana	Interactúa y estabiliza a la proteína E, el prM se mantiene unido al Dominio II de la proteína E hasta la secreción del virion. Mientras que M se mantiene unida a la proteína E hasta la nueva infección, M también da forma y estructura al virion.	Zheng et al., 2010; Yu et al., 2009
	E; Envoltura	Se une a la proteína C y forma la envoltura viral, el ectodominio contiene 3 dominios; Dominio I participa en el cambio conformacional en el endosoma ácido en el inicio de la infección, Dominio II involucrado en la fusión a la membrana celular, Dominio III se une a receptor celular.	Zhang et al., 2013; Modis et al., 2005; Modis et al., 2004; Mondotte et al., 2007.
No estructurales	NS1	Participa en la replicación y traducción del RNA genómico del DENV, su función específica no se ha descrito.	Cervantes et al., 2015.
	NS2A	Replicación del RNA viral, ensamblaje del virion, participa en la secreción del virion, media respuesta antiviral del hospedero	Wu et al., 2015
	NS2B	Es cofactor de la proteasa viral NS3. Interviene en la replicación viral.	Kim et al 2013. Yu et al., 2012.

NS3	Actividad de helicasa, trifosfatasa y de proteasa. Inhibe la respuesta mediada por Interferón.	Benarroch, 2004; Padmanabhan et al 2006; Yu et al., 2012.
NS4A	Reorganiza la membrana del retículo endoplasmático, estructurando los complejos de replicación viral. Induce autofagia de la célula, lo que favorece la replicación viral. Inhiben síntesis de Interferón.	McLean et al., 2011; Miller et al., 2007.
NS4B	Interactúa con el dominio helicasa de la proteína NS3 viral y libera a esta proteína del RNA simple cadena. Inhibe la síntesis de Interferón.	Muñoz et al., 2005; Tajima et al., 2011.
NS5	RNA polimerasa dependiente de RNA y actividad metiltransferasa.	Zou et al., 2011; Chung et al., 2010

1.2.1 Taxonomía

Aedes sp; Clasificación taxonómica de los vectores del dengue virus:
Reino Animalia, Phylum Artropoda, Orden Diptera, Suborden Nematóceras,
Familia Culicidae, Subfamilia Culicini, Género *Aedes*, Subgénero
Stegomyia, (Bates, 1970).

Se ha postulado que *Ae. aegypti* es originaria de África (Nelson, 1986; Moore et al., 2013), y se encuentra en el Continente Americano, muy probablemente porque fueron introducidas las formas inmaduras en los barriles de agua de los barcos durante las primeras exploraciones y colonizaciones europeas en los siglos XVI y XVII (Nelson, 1986; Oldstone, 2002).

1.2.2 El ciclo de vida del vector.

El desarrollo del mosquito *Ae. aegypti* comprende huevo, cuatro estadios larvales, uno de pupa y adulto (figura 1), la duración del desarrollo larval está en función de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la

densidad de larvas en el criadero, el período desde la eclosión hasta la fase adulta es de entre 10 a 16 días (Nelson, 1986; Méndez et al., 1996; Thirión, 2010). La función más importante del adulto de *Ae. aegypti* es la reproducción (Nelson, 1986). Antes de 24 horas ambos sexos están listos para el apareamiento (Kettle, 1993). En el laboratorio los mosquitos adultos de *Ae. aegypti* viven durante meses, en condiciones naturales hasta 4 semanas (Joy et al., 2012).

El mosquito Adulto: es oscuro con bandas blancas basales en los segmentos tarsales, las escamas blancas del clípeo y las de los palpos se conservan permitiendo la identificación de la especie. El macho se distingue de la hembra por sus antenas plumosas y palpos más largos (Nelson, 1986).

El cuerpo del adulto es pequeño, menor de 5 mm de longitud, antenas con numerosos artejos, alas delgadas con venas en diferente proporción ornamentadas por escamas; la proboscis de la hembra está adaptada para alimentarse de sangre. Tienen definida la región cefálica, torácica y abdominal, y poseen exoesqueleto de quitina (Martínez, 1987).

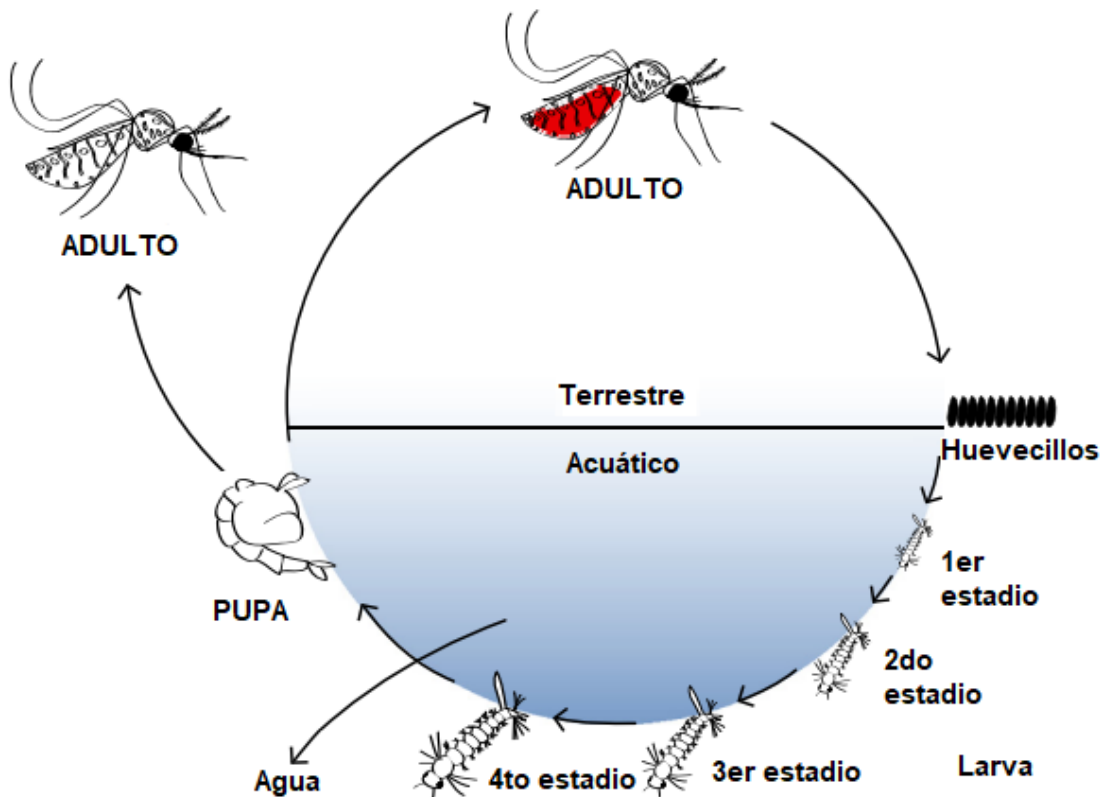


Figura 1.- Ciclo de vida del mosquito *Ae. aegypti* (Tomado y modificado de Coon et al., 2014). El mosquito hembra adulto deposita los huevecillos en un depósito acuático, éstos huevecillos eclosionan en una larva que se alimenta y crece durante 4 estadios, hasta llegar al estadio de pupa, ésta pupa realiza la metamorfosis y se convierte en un mosquito adulto que sale del medio acuático y se aparea, con lo que se inicia el ciclo.

Por lo general, el intervalo de tiempo que transcurre entre la alimentación sanguínea y la oviposición (ciclo gonotrófico) es de 48 horas. La hembra de *Ae. aegypti* no se desplaza más allá de 5,000 metros de distancia de radio de vuelo en toda su vida, permanece físicamente en donde emergió, siempre y cuando no haya algún factor que la perturbe o no disponga de huéspedes, sitios de reposo y de postura (Nelson, 1986; Kettle, 1993).

1.2.3 Importancia como vector del dengue.

La biología y la capacidad genética del mosquito es determinante en la competencia vectorial, entre los factores intrínsecos que influyen en la infección, multiplicación, diseminación y transmisión de los arbovirus, sobresalen los factores genéticos que permiten la susceptibilidad y habilidad de cada especie de mosquito a infectarse y transmitir al virus (Vazeille et al., 2001; Black et al., 2002). Las poblaciones de mosquitos y virus son genéticamente cambiantes, la susceptibilidad a infección oral y parenteral es diferente entre cepas de mosquitos de áreas geográficas distintas, las cepas africanas de *Ae. aegypti* son más resistentes a la infección oral, también hay diferentes mutantes con cambios en su morfología, hábitos alimenticios, de reproducción y resistencia a insecticidas. (Hardy, 1988; Secretaría de Salud, México 1993; Black et al., 2002; McAllister et al., 2012). Además, la temperatura ambiental influye en el desarrollo de *Ae. aegypti* y con ello se afecta la competencia y eficacia vectorial (Estallo et al., 2015)

Para que ocurra la transmisión, el huésped vertebrado necesita desarrollar una viremia que permita la infección del vector artrópodo (Joy et al., 2012). Después de ingerir sangre infectada con DENV, los títulos del virus en el artrópodo disminuyen, esta fase de eclipse dura de uno a cuatro días dependiendo de la dosis ingerida, de la especie de mosquito y la temperatura ambiente. La fase de eclipse posiblemente ocurre al recubrirse el virus durante la infección de las células epiteliales del mesenterón, por inactivación debida a las enzimas digestivas, por la oclusión de la membrana peritrófica, por carencia de receptores en las microvellosidades de la membrana o porque el virus es excretado. Posterior a esta fase viene una rápida replicación viral con efectos patológicos tolerantes, ocurrida la multiplicación en las células epiteliales mesenterales y la introducción del virus en el hemocele, pasa el umbral de la infección y la barrera mesenteral (Secretaría de Salud, México 1993). La

diseminación del virus en la hemolinfa facilita la infección y multiplicación del virus en las células de las glándulas salivales (Salazar et al., 2007).

El DENV al entrar al aparato digestivo del mosquito invade el epitelio del intestino medio (Midgut), estableciendo la infección y replicación del DENV, después este virus pasa al hemocele y de allí se da la invasión del DENV en las glándulas salivales (Black et al., 2002). Para que se logre la propagación del DENV en el mosquito, éste debe cruzar la barrera de infección del intestino medio (MIB), la cual incluye unión del DENV a su receptor celular, desencapsidación y traducción del RNA viral, posteriormente el DENV debe pasar la barrera de escape del intestino medio (MEB) la cual incluye la restricción del DENV a salir del intestino medio y pasar al hemocele, este bloqueo se presenta a nivel de la lámina basal o en el proceso de maduración viral (Black et al., 2002; Caicedo et al., 2018). Una vez que el DENV pasa la MEB puede pasar a glándulas salivales (Chen et al., 1993) y allí debe eludir la barrera de infección en glándulas salivales (SGIB) (Black et al., 2002).

Existen diferentes cepas de mosquitos *Ae. aegypti* que tienen diferente susceptibilidad a la infección por el DENV, por ejemplo la cepa DS3 carece de MIB y MEB, lo que la convierte en una cepa vector del DENV en un 95-100%, otro ejemplo es la cepa DMEB la cual tiene MEB y es infectada en células epiteliales del intestino medio, pero solo el 27 % desarrolla una infección diseminada (Bennett et al., 2005) otro ejemplo es la cepa IBO-II que es refractaria a la infección por tener MIB (Bosio et al., 1998; Caicedo et al., 2018).

El mosquito *Ae. albopictus* es considerado un vector secundario a pesar de ser más susceptible a la infección vía oral por los cuatro serotipos del dengue (Ibáñez & Martínez, 1994; Vazeille et al., 2001) y de estar mejor dotado para la transmisión transovárica o hereditaria y transestadial de los 4 serotipos del virus en la naturaleza, lo que lo convierte también en reservorio importante de la enfermedad, su frecuencia es de 2 a 14 % de

los mosquitos analizados (Hunter et al., 1973; Rosen, 1983; Lee & Rohani, 2005) es el responsable de los principales brotes de dengue ocurridos en Asia, con antecedentes de transmisión en Hawai (Pratt & Moore, 1993).

1.3 Definición de la enfermedad por el virus del dengue.

El dengue es una enfermedad vírica febril aguda, caracterizada por comienzo repentino, fiebre de tres a cinco días de duración, cefalea intensa, dolores retroorbitales, articulares y musculares, anorexia, alteraciones gastrointestinales y eritema generalizado temprano (WHO, 2009). En la fase febril pueden aparecer fenómenos hemorrágicos de poca intensidad, como petequias. La recuperación puede acompañarse de fatiga y depresión duradera. Es frecuente la linfadenopatía y la leucopenia con linfocitosis relativa, con menor frecuencia se observa trombocitopenia con menos de 100 mil plaquetas por mm^3 , e incremento de transaminasas. Las epidemias tienen carácter explosivo, con tasa de letalidad muy baja menor al 1% (Benenson, 1992, Secretaría de Salud, México, 2020). Los signos y síntomas adicionales son tos, diarrea, náusea y vómito, que lo hacen confundible con padecimientos gastrointestinales o respiratorios (Gómez & Rodríguez, 1994).

1.3.1 Dengue en México.

La historia reciente del dengue en México se inicia en 1966-1967 con la reintroducción del vector que favorece la circulación del DENV-1, su pico de actividad había sido en 1980, desde entonces la incidencia mostraba un descenso. El serotipo DENV-1 muy probablemente ha estado presente en todas las regiones del país en donde ha ocurrido este padecimiento. En 1983 son identificados los serotipos DENV-2 y DENV-4 (Narro & Gómez, 1995). La dispersión geográfica del vector ha aumentado, el número de localidades con transmisión en el 2009 es de 31 estados que han reportado ocurrencia de casos autóctonos (Thirión, 2010).

El reporte del primer caso de dengue hemorrágico en México ocurrió en un brote causado por DENV-4 en el estado de Yucatán en 1984, en el que se

reportaron seis casos hemorrágicos, de los cuales cuatro fallecieron (Montesano & Ruiz, 1995). En la figura 2 se pueden observar el número de casos de dengue presentados en México hasta Abril de 2020.

1.3.2 Mecanismo de transmisión.

La transmisión es por la picadura de mosquitos infectados *Ae. aegypti* o *Ae. albopictus*, principalmente (Nelson, 1986; Lee & Rohani., 2005; Kamgang, et al., 2019), la transmisión no ocurre directamente de una persona a otra, los enfermos suelen transmitir el virus a los mosquitos desde el cuarto hasta el doceavo día de la infección (Martínez, 2008), el mosquito se vuelve infectante de ocho a doce días después de haberse alimentado con sangre de individuos con viremias elevadas y continuará infectante durante toda su vida (Gubler, 1998; Novelo et al., 2019).

1.3.3 Estabilidad del RNA genómico.

El mapeo de ARN ha mostrado de 50 a 75% de variación en la composición de los oligonucleótidos en el serotipo DENV-1 del Sudeste Asiático, África y el Caribe, el genoma de este mismo serotipo es inestable en función del tiempo, la homología de la cepa DENV-2 Jamaica disminuyó al 86% al analizarla cuatro años después, y la homología de las cepas Nigeria bajó al 79% en un intervalo de 10 años. El serotipo DENV-2 del Caribe comparte de 80 a 90% de sus oligonucleótidos con los aislados en el Sudeste Asiático. Los serotipos DENV-4 aislados en la epidemia del Caribe en 1981-1982 resultaron diferentes a los de Filipinas, pero muy relacionados a los del Pacífico Sur y las Islas Niue (Secretaría de Salud, México; 1993; Thirión, 2010; Dwivedi et al., 2017)

1.3.4 Inmunidad

Los 4 serotipos de DENV tienen afinidad por las células mononucleares, a mayor número de células infectadas menor duración del período de incubación con aumento de la severidad de la infección (Blacksell, 2012).

Los anticuerpos de las infecciones primarias son IgM que actúan contra los determinantes antigénicos específicos del virus. Las infecciones secundarias producen anticuerpos IgG contra los antígenos del grupo *Flavivirus* (Chien et al., 2010). Los complejos formados por IgG1 e IgG3 son las subclases que más se producen en infecciones vírales, activan al complemento en su componente C1 uniéndose a los receptores Fc de monocitos y macrofágos. El complejo antígeno - anticuerpo que se forma en la infección secundaria facilita la invasión de otras células mononucleares. Los monocitos son el blanco del mecanismo inmune que al ser atacados liberan mediadores químicos que aumentan la permeabilidad capilar, activan al complemento y liberan tromboplastina, que en conjunto causan cambios fisiopatológicos característicos del dengue grave. Las defunciones se deben a los cambios fisiológicos que ocasionan el aumento de la permeabilidad capilar y la inflamación (Secretaría de Salud, México 1993; Murphy & Whitehead, 2011; Flipse & Smit, 2015).

En las infecciones por el virus del dengue se ha hallado elevada producción de interleuquina 2 y gammainterferón, evidencia de activación de linfocitos T. La inmunopatología de este padecimiento está relacionada con respuestas de células T, la activación de estos linfocitos ocurre en pacientes con dengue, pero en los casos de dengue grave los niveles de activación son superiores (Thirión, 2010).

En los pacientes con dengue severo se han encontrado anticuerpos de reacción cruzada contra el plasminógeno, que podría causar o favorecer las hemorragias, por tratarse de anticuerpos contra la glicoproteína E de la envoltura viral. La secuencia de los aminoácidos de esta proteína reveló grandes similitudes con una familia de factores de la coagulación, que incluyen la urokinasa, el factor X, la protrombina, el plasminógeno y su activador. Estos factores participan en la generación de fibrina o en la fibrinólisis (Markoff et al., 1994).

1.3.5 Diagnóstico

Las técnicas inmunológicas auxiliares en el diagnóstico son las pruebas de inhibición de la hemaglutinación, fijación del complemento, neutralización, técnica de ELISA (Kuno et al., 1991) y captación de anticuerpos IgG e IgM. El virus se aísla de la sangre y se inocula en células de mosquitos por técnicas de cultivo celular (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, mono, hámster), ratones u otros vertebrados, después se identifica con anticuerpos monoclonales con especificidad de serotipo (Benenson, 1992). Los niveles de DENV en plasma se pueden determinar por el ensayo rt-PCR cuantitativa (Duong et al., 2011); por RT-PCR y recientemente se hizo en suero sanguíneo y en mosquitos infectados mediante una técnica de microarreglo (Díaz et al., 2014; Adirajlyer et al., 2014)

El tratamiento específico del choque hipovolémico, que es resultado de la pérdida de plasma por un incremento repentino de la permeabilidad vascular, suele mejorar con la oxigenoterapia y reposición rápida de una solución de líquidos y electrolitos (Benenson, 1997). El ritmo de administración de líquidos y plasma debe determinarse según las pérdidas medidas, la transfusión de sangre está indicada solamente cuando una hemorragia intensa ocasiona un descenso real del índice hematocrito (WHO, 2015; Lum et al., 2015).

1.3.6 Magnitud del problema

Casos registrados con dengue en México durante el período 1941 – 2020 (Figura 2 y tabla 2). A partir de 1978-1979 se inicia la historia reciente del dengue en México, registrándose un total de 958,458 casos hasta Mayo de 2020, estos datos muestran tendencia continua a la alza consistente en los últimos años. Figura 2. Con un promedio anual de 23, 922 casos por año (Thirión, 2010; Secretaría de Salud 2020).

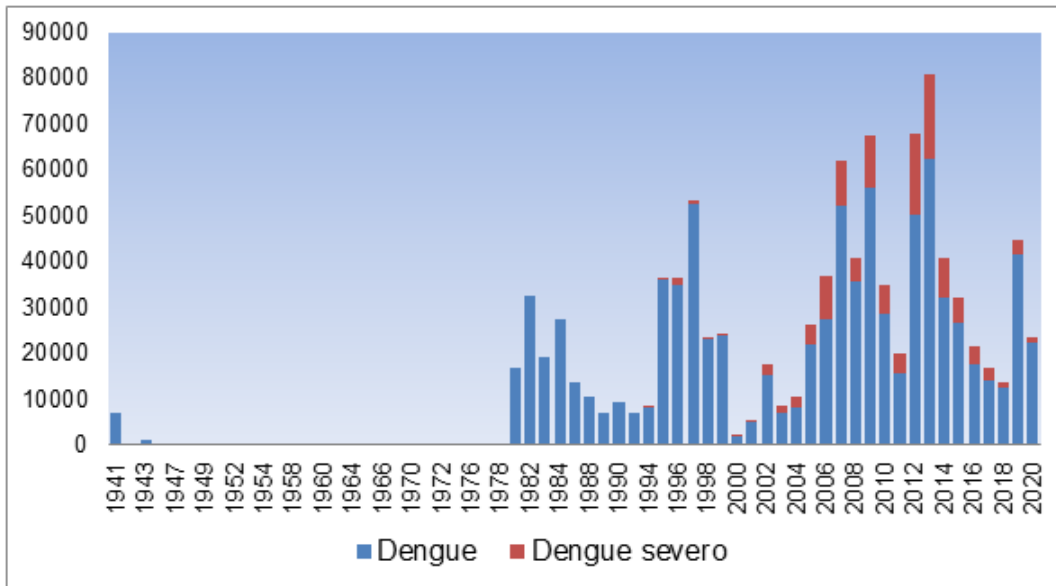


Figura 2.- Casos de dengue, en México 1941 – 2020. Se muestran los casos del dengue en México durante los últimos 80 años, en la cual se observa en los últimos años una tendencia a la alza en el número de pacientes. Fuente: Secretaría de Salud 2020; Thirion, 2010).

Tabla 2. Se observa el número de paciente con dengue, por año para México.

AÑO	Casos	AÑO	Casos	AÑO	Casos	AÑO	Casos
1941	6955	1965	0	1989	7117	2012	50368
1943	1129	1967	0	1991	7158	2013	62330
1945	235	1969	0	1993	2507	2014	32021
1947	31	1971	0	1995	36029	2015	26665
1949	49	1973	0	1997	52561	2016	17795
1951	19	1975	0	1999	23796	2017	14138
1953	27	1977	0	2001	4955	2018	12706
1955	7	1979	6187	2003	6996	2019	41505
1957	1	1981	17040	2005	21905	2020	24313
1959	5	1983	19028	2007	52361		
1961	0	1985	13688	2009	55961		
1963	2	1987	13371	2011	15578		

1.4 Unión del DENV al receptor celular.

La interacción entre el virus por sus células blanco depende de la interacción entre las proteínas virales y los componentes de la membrana plasmática, otro factor importante es la concentración de virus en la superficie celular, ya que al tener una mayor concentración del virus es más probable la unión del virus a su célula blanco (Grove & Marsh, 2011). La susceptibilidad de los tejidos del hospedero al virus depende de la abundancia y distribución de los receptores virales, por ello el conocimiento de los receptores podría permitir desarrollar fármacos antivirales. Debido a la amplia investigación que se ha llevado para el DENV se han reportado diferentes receptores específicos para este virus (Hidari & Suzuki, 2011; Cruz et al., 2015). Así mismo se han descrito muchos receptores putativos o proteínas sin su identificación como receptores putativos al DENV tanto en células de mamíferos Tabla 3, como en células de mosquito tabla 4 (Cruz et al., 2015).

1.4.1 Receptores putativos en células de mamíferos.

Entre los receptores se ha propuesto a los glicoaminoglicanos (GAG) que se producen como proteoglicanos con moléculas de heparan sulfato (HS), los cuales son polisacáridos lineales en todos los tejidos animales presente en la superficie celular, se ha observado que el pretratamiento con heparina, heparan sulfato altamente sulfatado (10 moléculas de HS) o suramina, se disminuye la infección del DENV en células Vero (Chen et al., 1997). Se ha demostrado por mutagénesis sitio dirigida que al cambiar la secuencia que codifica para la lisina 291 y lisina 295 del Dominio III de la Proteína E, la unión a HS se ve disminuida (Watterson et al., 2012), pero la unión del Dominio III a células mutantes carentes de HS se ve débilmente afectada lo que sugiere que hay otro u otros receptores para el DENV (Hung et al., 2004).

Además de los GAGs, los glicoesfingolípidos podrían mediar la entrada del DENV a células de mosquito AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*), el

compuesto L-3 (GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc β 1-1'Cer) fue identificado como molécula de unión a DENV-2 y el compuesto nLc4Cer (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer) de células LLC-MK2 (células de riñón de mono rhesus) se une a DENV-2 (Wichit et al., 2011).

Otra proteína que se ha propuesto como receptor a DENV es el DC-SIGN (molécula no integrina de adhesión intracelular de células dendríticas), esta es receptor de lectina presente en células dendríticas y macrófagos, su propuesta como receptor se debe a que células dendríticas (CD) tratadas con anti-DC-SIGN reducen la infección por DENV comparadas con las CD no tratadas, además la expresión transgénica de DC-SIGN en células que no expresan DC-SIGN de manera natural hace susceptibles a estas células a la infección por DENV (Tassaneetrithep et al., 2003).

En monocitos y macrófagos el receptor a Lipopolisacáridos (LPS) también llamado CD14, ha sido asociado con la unión del DENV a su célula blanco, debido a que al añadir LPS al medio e infectar con el DENV se inhibió la replicación del virus, lo que sugiere que el DENV depende del complejo CD14-LPS (Chen et al., 1999). Otra explicación a lo observado con el CD14 surgió cuando las proteínas HSP70 y HSP90 fueron identificadas como ligandos a la proteína E, si HSP70 y HSP90 son receptores de LPS y tratamos a las células con LPS los receptores HSP70, HSP90 no están disponibles para en DENV y se previene la replicación del virus (Reyes & del Ángel, 2005).

El receptor a manosa (RM) se ha identificado como posible receptor del DENV en macrófagos, ya que cuando se tratan con anti-RM se bloquea la infección (Miller et al., 2008).

La proteína regulada por glucosa (GRP78) es una chaperona del retículo endoplásmico y se localiza en la superficie celular, esta fue identificada como posible receptor del DENV, debido a que en células HepG2 se

reduce la infección al tratarlas con anti-GRP78 (Jindadamrongwech et al., 2004).

El receptor de alta afinidad a laminina es específico de unión a DENV-1, ya que al tratar las células HepG2 con anti-receptor de laminina o con laminina soluble se inhibe la unión del DENV, mientras que la unión de los DENV-2, DENV-3 y DENV-4 no se inhibe al tratar las células HepG2 con anti-receptor a laminina o con laminina soluble (Thepparit & Smith, 2004).

Los receptores TIM y TAM de células de mamíferos están encargados de mediar la remoción de células apoptóticas y de la fagocitosis mediada por fosfatidilserina y sabiendo que la endocitosis puede ocurrir con interacción de la fosfatidilserina se estudió la interacción entre los receptores TIM y TAM con el DENV, encontrándose que al interferir los RNA mensajeros de TIM y TAM o bloquear los receptores con anticuerpos específicos la unión del DENV es disminuida, proponiéndose así a los receptores TIM y TAM como posibles receptores del DENV (Meertens et al., 2012).

La proteína Claudina-1 es el principal componente estructural de la uniones estrechas y su expresión es sobrerregulada en estadios tempranos de la infección con DENV en células Huh-7, la cual podría facilitar la unión del virus a su célula blanco. En células Huh-7 knock-down para la proteína Claudina-1 se atenúa la propagación del DENV (Gao et al., 2010)

Aunque se han descritos varias proteínas que modulan la entrada del DENV a su célula blanco, todavía no se ha generalizado una proteína receptor del DENV, quizá la entrada de este virus dependa de varias proteínas para su internalización, es decir que requiera de un complejo multiprótico, para el inicio de la infección o que exista más de un receptor para el DENV a sus células hospederas.

Además la vía de internalización del DENV puede ser alterada dependiendo de las células que se utilicen para la propagación del virus; por ejemplo DENV propagado en C6/36 al entrar en células Vero se

internaliza sin endocitosis mediada por clatrininas, pero si el DENV es propagado en células Vero y se infectan células Vero el DENV si utiliza la endocitosis mediada por clatrininas para su internalización (Acosta et al., 2014).

Existe otro mecanismo de entrada del DENV a células de mamíferos llamado Antibody Dependent Enhancement (ADE), el cual ocurre cuando un anticuerpo no neutralizante a el DENV aumenta la infección de células que expresan los receptores Fcγ, ya que facilita la entrada de virus no neutralizado, este fenómeno ha sido hipotetizado como el responsable de la forma severa del dengue, el cual genera fiebre hemorrágica por dengue o síndrome de choque por dengue (Halstead & O'rourke, 1977; De Alwis et al., 2014; Katzelnick et al., 2017). En un estudio realizado en células COS-7 se cambió la estructura del dominio de activación ITAM en posición citoplasmática y se observó que la infección por dengue era menor comparado con el dominio ITAM sin mutagenizar, lo que sugiere que los receptores Fcγ-RIIA aumentan la infección producida por el DENV (Chien et al., 2010).

Moreno, et al., 2002, identificó en macrófagos derivados de monocitos 4 proteínas de membrana como posibles receptores al DENV-2, estas proteínas tienen masas moleculares de 27, 45, 67 y 87 kDa, los ensayos se realizaron por medio de Cromatografía de afinidad, inmunofluorescencia, western blot y VOPBA.

A continuación se agrega una tabla (Tabla 3) con los receptores putativos al DENV descritos para células de mamíferos, esta tabla incluye el nombre de la molécula que actúa como receptor, el tipo de molécula, el tipo de célula en el cual se está caracterizando a este receptor, el tipo de serotipo que fue inhibido y la referencia bibliográfica. (Tabla tomada de Cruz et al., 2015).

1.4.2 Receptores putativos en células de mosquitos.

La proteína prohibitina fue identificada por espectrometría de masas como un receptor putativo al DENV en células C6/36, CCL25 (línea celular de *Ae. aegypti*) y en *Ae. aegypti* en su fase adulta, la infección por DENV se inhibió al tratar a las células C6/36 con anti-Prohibitina o con RNA de interferencia (siRNA) para el RNA mensajero (mRNA) de prohibitina (Kuadkitkan et al., 2010). Esta proteína actúa como chaperona en la membrana mitocondrial y se ha asociado con la regulación del ciclo celular, ya que colocaliza en el núcleo interactuando con retinoblastoma e histonas deacetilasas (Nijtmans et al., 2000; Gamble et al., 2007).

Dos glicoproteínas de 40 y 45 kDa se unen a DENV-4 en células C6/36, y al generar anticuerpos policlonales contra estas 2 glicoproteínas y tratar células C6/36 con estos anticuerpos antes de infectarlas se previene la unión DENV-4 a células C6/36, estas glicoproteínas de 40 y 45 kDa se reconocieron en intestino medio, ovario y glándulas salivales de mosquito *Ae. aegypti* (Mendoza et al., 2002).

Además una proteína de 50 kDa fue revelada en un ensayo VOPBA utilizando proteínas de células C6/36, esta proteína también fue reconocida por el anticuerpo anti-receptor de laminina de alta afinidad, este anticuerpo inhibió la proliferación de DENV-3 y DENV-4 en células C6/36, pero no inhibe la proliferación de DENV-1 o DENV-2 en estas mismas células (Sakoonwatanyoo et al., 2006).

En glándulas salivales de *Ae. aegypti* se identificaron 4 proteínas de 37, 54, 58 y 77 kDa, mediante la técnica de VOPBA, utilizando la misma técnica se identificaron 5 proteínas de 48, 50, 54, 58 y 77 kDa a partir de glándulas salivales de *Ae. polynesiensis* (Cao, 2009).

Además 2 proteínas de 67 kDa (R67) y 80 kDa (R80) de células C6/36 se unieron a los 4 serotipos del DENV, estas proteínas fueron purificadas por cromatografía de afinidad, en la cual se pasaron extractos proteicos de intestino medio de *Ae. aegypti* y de células C6/36, posteriormente se generaron anticuerpos para estas proteínas, con los cuales se realizaron

ensayos de inhibición de la infección realizados con DENV-2, el resultado fue que si se inhibió la propagación del DENV-2 por los anticuerpos anti-R67 o anti-R80 (Mercado et al., 2006).

Posteriormente se realizó la identificación de estas proteínas por Espectrometría de masas y los resultados obtenidos sugieren que caderina, el factor de elongación de la traducción EF-1 alfa/Tu, la cinasa del receptor beta adrenérgico y enolasa se unen Dominio III del DENV y podrían ser el receptor al DENV (Muñoz et al., 2013).

Tabla 3. Receptores putativos para el DENV en células de mamíferos.
(Tabla tomada de Cruz *et al.*, 2015).

Molecul e	Type	Cells	Serotype	Reference(s)
Heparan sulfate	GAG	Vero CHO K1	DENV 2	Chen et al. (1997)
nLc4Cer (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer)	Glyco-sphingolipid	K562 BHK-21	DENV 2	Aoki et al. (2006) Wichit et al. (2011)
DC-SIGN	C-type lectin	THP-1 Monocyte-derived dendritic cells	DENV 1, 2, 3 and 4	Navarro-Sanchez et al. (2003) Tassaneeritthep et al. (2003)
CD14	Protein	Monocytes/macrophages	DENV 2	Chen et al. (1999)
HSP90 HSP70	Protein	U937 SK-SY-5Y Monocyte-derived macrophages	DENV 2	Chen et al. (1999) Reyes-Del Valle et al. (2005)
Mannose receptor	Protein	NIH3T3 Monocytes Macrophages	DENV 1, 2, 3 and 4	Miller et al. (2008)
GRP78	Protein	HepG2	DENV 2	Jindadamrongwech et al. (2004) Upanan et al. (2008)
High-affinity laminin receptor	Protein	HepG2 PS Clone D	DENV 1, 2 and 3	Thepparit and Smith (2004) Tio et al. (2005)
TIM-1	Protein	A549 Huh7 5.1 Vero	DENV2 and 3	Meertens et al. (2012)
AXL	Protein	A549 Vero Human primary kidney epithelial cells Human primary astrocytes	DENV2 and/or DENV3	Meertens et al. (2012)
Claudin-1	Protein	Huh-7 Huh 7.5	DENV 2	Gao et al. (2010)
65 kDa	Protein	N1E-115 SK-NSH	DENV-2	Ramos-Castaneda et al. (1997)
44 and 74 kDa	Protein	Vero	DENV-4	Martinez-Barragan and del Angel (2001)
29, 34 and 43 kDa	Unknown	ECV304	DENV-2	Wei et al. (2003)
Diverse	Protein	HepG2	DENV 2, 3 and 4	Jindadamrongwech and Smith (2004)

A continuación se agrega una tabla (Tabla 4) con los receptores putativos al DENV descritos para células de mosquitos, esta tabla incluye el nombre de la molécula que actúa como receptor, el tipo de molécula, el tipo de célula en el cual se está caracterizando a este receptor, el tipo de serotipo que fue inhibido y la referencia bibliográfica. (Tabla 4. Tomada de Cruz et al., 2015).

Tabla 4. Receptores putativos para el DENV en células de mosquitos. (Tabla tomada de (Cruz et al., 2015).

Molecule	Type	Cells and tissues	Serotype	Reference(s)
Prohibitin	Protein	C6/36 CCL-125	DENV 2	Kuadkitkan et al. (2010)
40 and 45 kDa	Glycoprotein	C6/36 cells Diverse mosquito tissues	DENV 4	Salas-Benito and del Angel (1997) Reyes-del Valle and del Angel (2004)
50 kDa	Protein		DENV 2, 3 and 4	Sakoonwatanyoo et al. (2006)
67 (enolase) and 80 kDa	Protein	C6/36 <i>A. aegypti</i> midguts	DENV 1, 2, 3 and 4	Munoz et al. (1998) Mercado-Curiel et al. (2006) Mercado-Curiel et al. (2008) Munoz Mde et al. (2013)
77, 58, 54 and 37 kDa	Unknown	<i>A. aegypti</i> salivary glands	DENV 1, 2, 3 and 4	Cao-Lormeau (2009)
67, 56, 54, 50 and 48 kDa	Unknown	<i>A. polynesiensis</i> salivary glands	DENV 1 and 4	Cao-Lormeau (2009)

Debido a que no existen antivirales para el DENV (Flipse et al., 2015) y que no hay una vacuna totalmente efectiva contra los 4 serotipos del DENV (Stephen, 2014) el tratamiento para dengue es solo de apoyo, a base de reposo y rehidratación (WHO, 2009), por ello, los esfuerzos para frenar la transmisión del DENV se basan en la eliminación del vector utilizando agentes químicos, biológicos y en la destrucción de criaderos (WHO, 2009). Además, se está realizando la adaptación de la bacteria endosimbionte *Wolbachia* de *Drosophila* en *Ae. aegypti*, la cual reduce el

tiempo de vida del mosquito y bloquea la transmisión del DENV (Walker et al., 2011; Hoffman et al., 2011), además se han generado mosquitos *Ae. aegypti* genéticamente modificados (OX513A), los cuales llevan un gene dominante letal que se expresa en ausencia de tetraciclina, la liberación de mosquitos OX513A machos al ambiente favorecerá el apareamiento con mosquitos silvestres *Ae. aegypti* hembras lo que producirá descendencia que morirá por la falta de tetraciclina en el medio (Harris et al., 2011).

Debido a que en nuestro equipo de trabajo Muñoz *et al.*, 1998 demostraron que DENV-2 interactúa con 2 polipeptidos de 67 y 80 kDa y que posteriormente Muñoz *et al.*, en 2013, identificaron a enolasa mediante cromatografía de afinidad y espectrometría de masas, como una proteína de unión a DENV, nos dimos a la tarea de realizar una revisión de las funciones que se han investigado para enolasa y con base a los artículos científicos encontrados se decidió investigar el papel que tiene enolasa como posible receptor a el DENV.

1.4.3 Funciones descritas para la proteína Enolasa.

Enolasa o fosfopiruvato hidratasa, fue descubierta en 1934 por Lohmann y Mayerhof, es una proteína que en citoplasma tiene actividad enzimática en el metabolismo de la glucosa, ésta cataliza la deshidratación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glucólisis o la reacción inversa durante la gluconeogénesis. (Zhang et al., 1997; Pancholi, 2001), su masa molecular es alrededor de los 50 kDa, es una metaloenzima que requiere del ion magnesio (Mg^{2+}) para su activación (Díaz et al., 2012).

Esta proteína es encontrada desde arqueobacterias hasta mamíferos y su secuencia es conservada (Feo et al., 2000; Piast, 2005). Enolasa tiene 3 isoformas: α -enolasa (ENO-1), la cual se encuentra en todos los tejidos en humanos, γ -enolasa (ENO-2), que solo se ha descrito en tejido neuronal y neuroendocrino (Marangos et al., 1978) y β -enolasa (ENO-3), encontrada en tejido muscular (Feo et al., 1995), la formación de homodimeros o

heterodimeros se requiere para la actividad enzimática de esta proteína (Kato et al., 1983).

Enolasa es un factor neurotrófico (Takei et al., 1991), una proteína de choque térmico (HSP48) (Lida & Yahara, 1985), proteína de estrés a hipoxia (Aaronson et al., 1995) Además, α -enolasa forma parte del cristalino de los vertebrados (Mathur et al., 1992), se une a actina, a tubulina (Walsh et al., 1989) y ha sido localizada en centrosomas de células HeLa (Johnstone, 1992).

Enolasa ha sido asociada a cáncer ya que, la traducción del mRNA es sobreexpresado durante el crecimiento celular y es prácticamente indetectable en fases quiescentes, ésta proteína regula negativamente la transcripción de protooncogenes, por usar un codón de inicio alternativo, con esto el mRNA de la enolasa codifica para una proteína de 37 kDa la cual es llamada proteína-1 de unión al promotor de c-myc (MBP-1), que se localiza en el núcleo y puede unirse al promotor P2 de c-myc, así regula su transcripción de manera negativa (Feo et al., 2000). El incremento de la expresión de enolasa se ha correlacionado con la progresión de tumores, de tipo neuroblastoma y ha sido considerada marcador en el diagnóstico de muchos tipos de tumores (Eriksson, 2000; Díaz et al., 2012). Además es considerada como una proteína multifuncional o moonlighting (Figura 3).

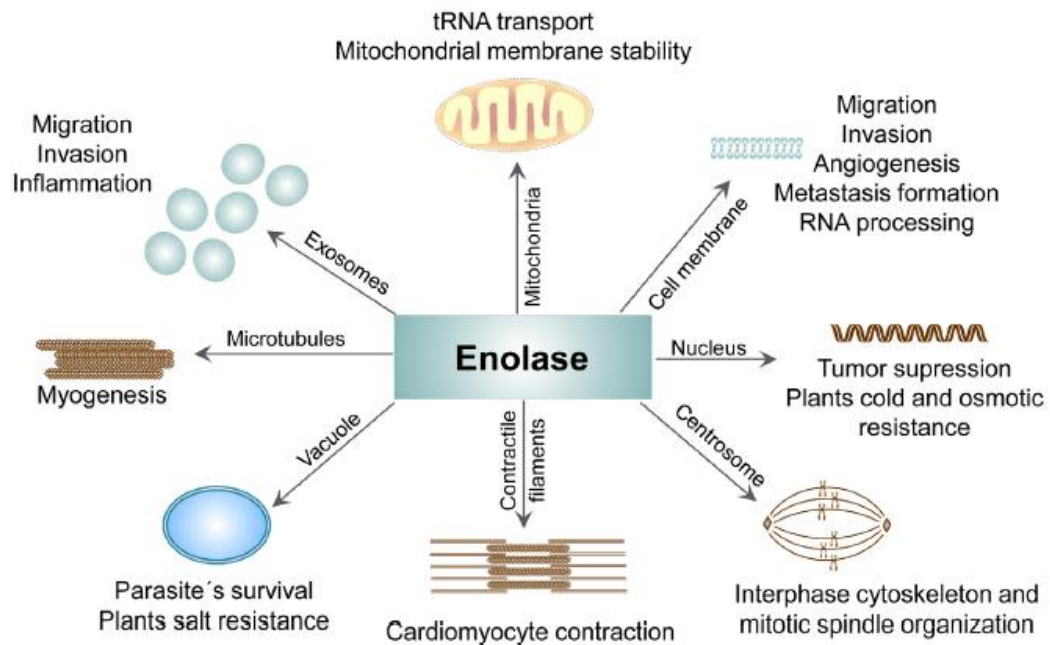


Figura 3.- Actividades específicas de enolasa. Se describe la presencia de enolasa en diferentes compartimientos celulares y su contribución en procesos fisiológicos y patológicos. Tomada de Didisova et al., 2019.

Se ha reportado que enolasa se expresa en la superficie celular de miocitos en diferenciación y que la inhibición de la unión de ENO-1 con plasminógeno bloquea la fusión de los miocitos y la regeneración muscular en ratones, lo que sugiere que ENO-1 tiene una función en el proceso de remodelamiento extracelular en la miogénesis (Suelves et al., 2007; Bryer & Koh, 2007). Por otro lado, la expresión de ENO-1 en la superficie celular ha sido asociado con fiebre reumática aguda (Fontan et al., 2000).

ENO-1 ha sido detectada en la superficie de diferentes células, tales como monocitos, células T, células B, células neuronales y células endoteliales, como un fuerte receptor a plasminogeno modulando la actividad fibrinolítica pericelular (Miles et al., 1991; Vanegas et al., 2007; Vega et al., 2013; Sawney et al., 2015). ENO-1 aumenta la activación de plasminógeno en la superficie celular, concentra la actividad proteolítica en

la periferia celular y protege a la plasmina de su inhibidor α 2-antiplasmina (Feo et al., 2000), una vez activada la plasmina degrada componentes de la matriz extracelular, directamente o indirectamente por activación de metaloproteasas (Díaz et al., 2012). ENO-1 también puede activar prohormonas o factores de crecimiento (Figura 4. Tomada de Díaz et al., 2012).

La enolasa está generalmente conservada en sus residuos catalíticos en todas las especies, sin embargo existen diferencias importantes entre la enolasa de tripanosoma y su hospedero, en tres residuos cercanos al sitio catalítico, lo cual puede resultar en un blanco para diseñar drogas contra este patógeno (Avilán et al., 2011).

Se ha observado en células HepG2 que los patrones de secreción de ENO-1 se incrementan cuando estas se infectan con DENV, este aumento es dosis dependiente (Higa et al., 2008), puesto que ENO-1 se une a plasminógeno y modula su activación, se ha especulado que el incremento de la secreción de ENO-1 de células hepáticas podría llevar a la disfunción homeostática observada en pacientes con dengue grave, incluyendo la promoción de fibrinólisis y alteraciones en la permeabilidad vascular (Higa et al., 2014).

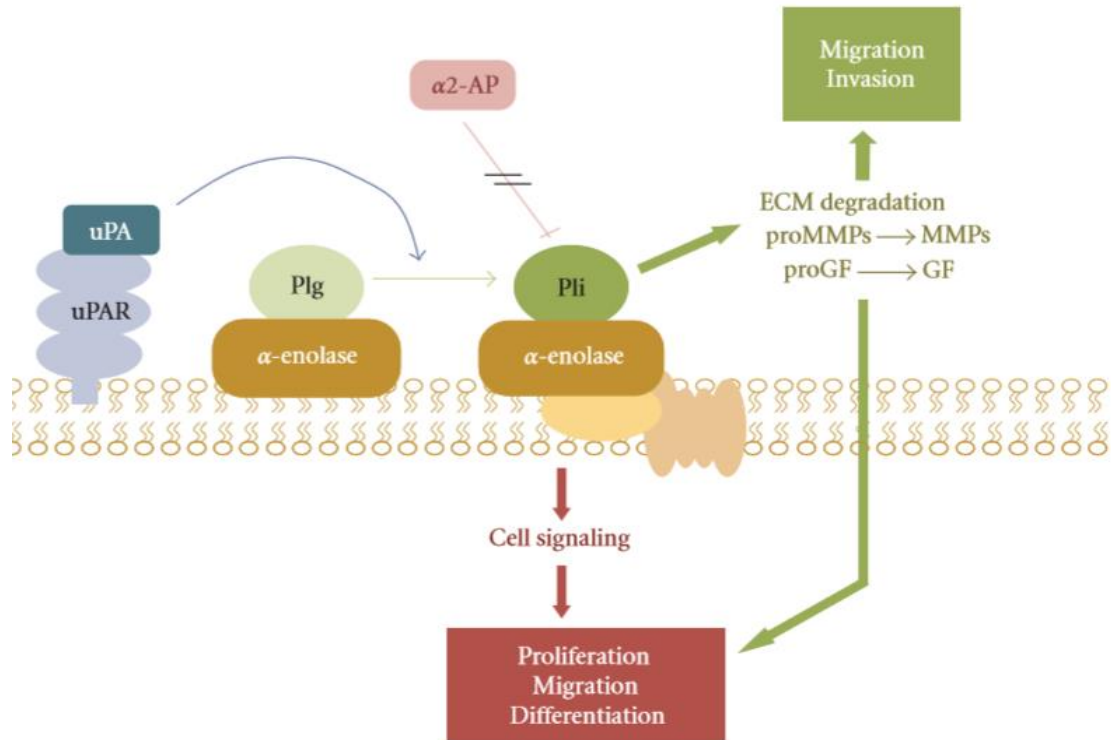


Figura 4.- Representación esquemática de la interacción del plasminogeno con la proteína α -enolasa en la superficie celular. Abreviaciones. PLG, plasminogeno; Pli, plasmina; α 2-AP, α 2-antiplasmina; uPA, activador de plasminógeno tipo urocinasa; uPAR, receptor del activador de plasminogeno tipo urocinasa; ECM, matriz extracelular; MMPs, metaloproteasas; GF, factor de crecimiento. (Tomada de Díaz et al., 2012).

1.5 Antecedentes Directos

Muñoz et al., 1998 demostraron que el virus del dengue serotipo 2 (DENV-2) interactúa con 2 polipéptidos de 67 y 80 kDa y que anticuerpos policlonales anti-membrana de células C6/36 bloquean la unión del DENV-2 a células C6/36, estos resultados sugieren que los polipéptidos de 67 y 80 kDa son parte de los receptores al DENV-2. En el 2006 Mercado *et al.*,

realizaron un ensayo de VOPBA y cromatografía de afinidad con proteínas de células C6/36 e intestino medio de *Ae. aegypti* y al revelar con DENV-2 marcados con radioactividad identificaron 2 proteínas de 67 y 80 kDa (llamadas R67 y R80). Asimismo anticuerpos específicos por las proteínas R67 y R80, inhibieron la infección del DENV-2. Además, estas 2 proteínas fueron reveladas al utilizar partículas virales radioetiquetadas de los otros 3 serotipos (DENV-1, DENV-3 y DENV-4), por lo que ellos sugieren que R67 y R80 son receptores de los 4 serotipos de dengue en células de intestino medio de mosquitos *A. aegypti* y de células C6/36.

Mercado *et al.*, en 2008 concluyeron que las proteínas R67 y R80, están relacionadas con la competencia del vector del virus del dengue en mosquitos *Ae. aegypti*.

Finalmente Muñoz *et al.*, en 2013, identificaron posibles receptores al DENV en midguts de mosquitos y de células C6/36, purificados por cromatografía de afinidad utilizando el dominio III de la proteína E del DENV-2 o partículas virales de DENV unidos covalentemente a columnas de Sepharosa 4B.

Para determinar la identidad de estas proteínas de 57, 67 y 80 kDa ellos realizan espectrometría de masas, los resultados obtenidos mostraron 4 proteínas, la enolasa, la cinasa del receptor beta adrenérgico (ARK-beta), el factor de elongación de la traducción EF-1 alfa/tu y caderina, de los cuales la enolasa ha sido reportada como una proteína de membrana y receptor de plasminógeno en diferentes células eucariotas (Díaz *et al.*, 2012).

Por ello, nosotros bloqueamos parcialmente la propagación del DENV en células C6/36 mediante anticuerpos específicos anti-enolasa, se identificó la localización en membrana de esta proteína en células de mosquito *Aedes albopictus* y observamos colocalización de enolasa y el DENV a nivel de la membrana celular. Adicionalmente modelamos *in silico* la unión

de enolasa con la proteína E del DENV y realizamos la búsqueda de dominios transmembranales en enolasa.

Los resultados sugieren que DENV requiere a enolasa para su propagación, sin embargo este bloqueo de enolasa mediante anticuerpos no es suficiente para bloquear la completa propagación del DENV por lo que deben existir otros elementos celulares que compensen la carencia de enolasa, por ello más estudios deberían ser llevados a cabo para poder conocer las moléculas necesarias por el DENV para el reconocimiento y unión de los receptores celulares, lo que podrá permitir desarrollar fármacos antivirales o generar mosquitos transgénicos que sean refractarios a la propagación del DENV.

1.6 Justificación

Debido a que no existe una vacuna o tratamiento específico contra DENV es necesario conocer los elementos celulares del mosquito tales como; las proteínas de unión al virus y sus factores de internalización, para prevenir la enfermedad desde el vector sin afectar la salud humana.

1.7 Hipótesis.

Los resultados obtenidos, por espectrometría de masas a partir de una columna de afinidad utilizando el Dominio III de la proteína E del virus del dengue, sugieren que la proteína enolasa podría estar participando directamente en el reconocimiento o unión del dengue virus a células de mosquitos del género *Aedes*.

1.8 Objetivo General

Identificar el papel de la enolasa en el reconocimiento y unión del DENV-2 a las células del midgut del mosquito *Aedes aegypti* y células C6/36.

1.9 Objetivos particulares.

- Evaluar la interacción de Enolasa con el DENV
- Inhibir la unión del DENV en células C6/36 mediante anticuerpos anti-enolasa.

- Identificar la localización de la enolasa en el midgut de mosquitos *Ae. aegypti* y en células C6/36.
- Observar la colocalización de la proteína E con enolasa por IMF
- Analizar *in silico* la interacción de Enolasa con la Proteína E del DENV.
- Localizar *in silico* los dominios transmembranales de la enolasa.
- Inhibir la unión del DENV en células C6/36 con plasminógeno
- Realizar los ensayos de Co-IP utilizando enolasa y la proteína E del DENV
- Clonar y expresar el gene de la enolasa de la cepa DS3 (sensible) en la cepa IBO-II (resistente) para incrementar la infección por DENV
- Determinación de elementos presentes en la unión del DENV a células C6/36 mediante HRSEM

2.- Materiales y Métodos

2.1 Línea celular y cepa viral

La línea celular C6/36 fue crecida y mantenida bajo condiciones estándar a 28 °C en medio MEM con 100u de penicilina, estreptomycin (100µg ml⁻¹; Gibco), suplementada con L-glutamina 2mM (Gibco), aminoácidos no esenciales 100mM (Gibco), piruvato de sodio (Gibco) y suero fetal bovino (SFB) al 5% (Kuno et al., 1985). El DENV-2 (VER/MEXS008A/06) utilizado en los ensayos de este estudio fue tomado de una colección de DENVs de sueros de pacientes (Gardella et al., 2008). Las cepas de referencia, que sirvieron como control para la serotipificación; DENV-1 (US/Hawaii), DENV-2 (Jamaica) y DENV-3 (H87) fueron proporcionadas por la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno

2.2 Serotipificación del DENV

El RNA viral fue extraído del sobrenadante de células C6/36 infectadas con DENV, la extracción se realizó con Trizol LS siguiendo las recomendaciones del proveedor (Invitrogen, Life technologies), las cuales fueron agregar 750 µl de Trizol LS a 250 µl de sobrenadante de células infectadas y dejar por 5 minutos a 25 °C, adicionar 200 µl de cloroformo y centrifugar a 12000 g por 10 minutos a 4°C, se lava dos veces el RNA con etanol y se resuspende en agua DEPC, por último, la muestra se cuantifico en nanodrop y se utilizó inmediatamente.

2.3 Reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa

La reacción de rt-PCR se realizó utilizando el Sistema de RT-PCR Platinum™ SuperScript™ III One-Step con ADN polimerasa Taq Platinum, la mezcla de reacción se preparó siguiendo las recomendaciones de él proveedor, utilizando 20 picogramos de cada primer, una unidad de enzima, 25 µl del buffer 2X, 100 ng de RNA y se aforo a 50 µl con agua DEPC, los primers utilizados fueron D1, D2, TS1, TS2, TS3 y TS4 reportados por Lanciotti et al.,1992, los tiempos para la rt-PCR fueron 50 °C durante una hora, 4 minutos a 98 °C, 35 ciclos de 94°C un minuto, 52°C un minuto y 68 °C un minuto, la extensión se dejó 5 minutos a 68°C y se pasó la mezcla a -20°C hasta que se observó en ún de agarosa al 1.5 %, solo el fragmento de 511 pb correspondiente a la muestra VER/MEXS008A/06 fue secuenciado utilizando el kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing y la secuencia obtenida fue sometida a un BLATSn utilizando el programa del National Center for Biotechnology Information, con lo que se determinó el serotipo del DENV.

2.4 Anticuerpos

Anticuerpos policlonales obtenidos de conejo anti enolasa (sc-15343) y anticuerpos anti-actina alfa obtenidos de ratón (sc-32251) fueron proporcionados por Santa Cruz Biotechnology, anticuerpos monoclonales

obtenidos de ratón anti Proteína E del DENV (clona D1-4G2-4-15) fueron proporcionados por Merck. Anticuerpos secundarios anti-conejo con fosfatasa alcalina (111-055-003), anticuerpos secundarios anti-ratón fluoresceinados (115-095-003) y anticuerpos secundarios anti-conejo rodaminado (111-025-003) fueron proporcionados por Jackson ImmunoResearch. Anticuerpos policlonales obtenidos de conejo anti proteína E del DENV (GTX127277) y anticuerpos secundarios anti-ratón con fosfatasa alcalina (GTX26729) fueron proporcionados por GeneTex. Las concentraciones utilizadas para cada anticuerpo fueron determinadas experimentalmente.

2.5 Cromatografía de afinidad

Partículas virales completas DENV-2 (6×10^7 UFP/ml) se unieron covalentemente a 1 g de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno como recomienda el proveedor (Amersham Biosciences). A continuación se describe el método, se toma 1 g de Sefarosa 4B y se lava 3 veces con agua miliQ, se resuspende en 1 mM de HCl y se mezcla con el DENV-2 en NaHCO_3 0.1 M a pH 8.3 con NaCl 0.5 M a 4 °C durante toda la noche, después se lava con NaHCO_3 0.1M a pH 8.3 con NaCl 0.5 M, por último se realizan 3 ciclos alternados de lavado con acetato de sodio pH 4, 0.1 M con NaCl 0.5 M y TrisCl 0.1 M pH 8 con NaCl 0.5 M y la columna de Sefarosa 4B acoplada a DENV-2 se mantuvo en azida de sodio al 0.002% a 4°C hasta su uso.

Extracto de proteínas de células C6/36 se obtuvieron como describe Muñoz et al., (2013) y 300 µg de proteína fueron aplicadas a la columna de Sefarosa 4B-DENV, los lavados se realizaron con Tris-Cl 0.05 M, NaCl 0.1 M y Triton al 0.05% pH 7.5 y la elución de las proteínas unidas a DENV se realizó con glicina 0.1 M con Triton 0.05 % a pH 2.7, la proteína eluida fue cuantificada por el método de Bradford (Bradford, 1976), concentrada por precipitación con acetona (Fic et al., 2010), separadas en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% (Laemmli, 1970), teñidas con azul de

coomasie o transferidas en membranas de nitrocelulosa (Towbin, 1979), a esta membrana se le aplicaron anticuerpos anti-enolasa 1/1000 durante toda la noche a 4°C y anticuerpos secundarios anti-conejo 1/2000 durante 1 hora a 25°C y se revelo con el sustrato NBT/BCIP (Biorad). Como control de carga se utiliza el anticuerpo anti-actina 1/1000.

2.6 Inhibición de la infección e inmunoblot

Para la inhibición de la infección 5×10^5 células C6/36 fueron crecidas en placas de 12 pozos durante 24 horas en condiciones estándar; las células se pasaron a 4°C en Medio MEM sin suero durante 30 minutos y se incubaron a 4°C durante 1 hora con 4 µg/ml de anticuerpos específicos anti-enolasa (sc-15343, Santa Cruz Biotechnology) o 4 µg/ml de anticuerpos 4G2 (clona D1-4G2-4-15, Merck) o 4 µg/ml de anticuerpos secundarios anti-conejo (111-055-003, Jackson ImmunoResearch) o sin anticuerpos, posteriormente se retiró el medio y las C6/36 se infectaron con DENV-2 a MOI de 0.5 durante una hora a 4°C, después se retiró el medio y se agregó medio MEM con 2.5% de SFB y se dejaron durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se extrajo la proteína total de la monocapa y se cargaron por duplicado en un gel de poliacrilamida, uno se tiñó con azul de coomasie y el otro se transfirió a membrana de nitrocelulosa para comparar la cantidad de proteína viral de la envoltura del DENV mediante Inmunoblot utilizando en anti-E que reconoce a la proteína E del DENV (GTX127277, Gene Tex) normalizada con actina del hospedero, los anticuerpos secundarios tenían acoplada a la fosfatasa alcalina (AP) y las bandas se revelaron con NBT/BCIP. Por último los datos obtenidos en el inmunoblot se cuantificaron utilizando el programa ImageJ.

2.7 Conteo de sincitios en células C6/36 infectadas con DENV

Para corroborar si anticuerpos anti-enolasa inhiben la unión del DENV a células de mosquitos, células C6/36 fueron crecidas en placas de 48

pozos hasta una confluencia de 90-95% en medio MEM con suero, posteriormente las células se lavaron 2 veces con PBS y se dejaron en MEM sin suero a 4°C durante 30 minutos, después se incubaron con medio MEM con o sin anticuerpos durante 1 h a 4°C, se retiró el medio, se realizaron 2 lavados con PBS y se infectaron con DENV a MOI 0.5 durante una hora a 4°C, después el medio fue removido y se dejaron las células en medio MEM con 2.5% de SFB, a las 24 y 48 horas el número de sincitios fue contado en todo el pozo utilizando un microscopio de campo claro a 10 X y 40 X, el número de sincitios por tratamiento se registró y se analizó con el programa Statgraphics centurión. Las células fueron divididas en 4 grupos experimentales; mock infectadas, sin anticuerpos, Ig no específica 4 µg/ml o anti-enolasa 4 µg/ml. Se realizaron 2 ensayos independientes y cada ensayo fue hecho por triplicado.

2.8 Viabilidad

La viabilidad celular fue detectada con tinción por exclusión utilizando azul de tripano (Strober, 2001). Para ello 6×10^4 células C6/36 en cada pozo fueron crecidas en placas de 96 pozos durante 24 horas en condiciones estándar; después las células se pasaron a 4°C en Medio MEM sin suero durante 30 minutos y se incubaron a 4°C durante 1 hora con 0.4, 2 o 3 4 µg/ml de anticuerpos específicos anti-enolasa, transcurrido el tiempo se retiró el medio y se agregó medio MEM con 2.5% de SFB y se dejaron durante 48 horas, finalmente las células fueron teñidas con azul de tripano y se contaron las células en cámara de Neubauer para conocer el porcentaje de células vivas.

2.9 Inmunofluorescencia Indirecta

Para la observación de enolasa y DENV-2 en membrana, 1×10^4 células C6/36 fueron sembradas en cubreobjetos y se dejaron en condiciones estándar durante 24 horas, transcurrido este tiempo las células se mantuvieron a 4°C durante 30 minutos y se infectaron con DENV-2 MOI

20 durante 1 hora a 4°C, posteriormente se fijaron con glutaraldeído al 0.5 % mezclado con formaldeído al 1.8 % durante 1 hora a 25°C, el bloqueo se realizó con 5% de SFB y 0.3% de BSA y se aplicaron anticuerpos anti-proteína E (clona D1-4G2-4-15, Merck), anticuerpos anti-enolasa (sc-15343, Santa Cruz Biotechnology), anticuerpos secundarios anti-ratón fluoresceinados (115-095-003), anticuerpos secundarios anti-conejo rodaminado (111-025-003) y DAPI.

Para la observación de enolasa y DENV-2 en el interior de las células se sembraron 1×10^4 células C6/36 en cubreobjetos bajo condiciones estándar durante 24 horas, se retiró el medio y se incubaron con el DENV-2 a 28 °C durante 1 hora, después se retiró el medio con el DENV-2 y se colocó MEM con 2.5% de SFB, se dejaron durante 24 horas y las muestras se fijaron con glutaraldeído al 0.5 % mezclado con formaldeído al 1.8 % y se permeabilizó con tritón-X-100 0.3 % en PBS, se bloqueó con 5% de SFB y 0.3% de BSA, se aplicaron los anticuerpos y DAPI como se describió anteriormente.

Finalmente las muestras se montaron en portaobjetos, se observaron en un microscopio confocal Leica TCS SP8 y las imágenes se analizaron en el software LasX de Leica Microsystems.

2.10 Docking Molecular

La estructura tri-dimensional de la proteína E del DENV fue obtenida del Banco de datos de proteínas (Protein data bank; PDB:1OAN). La estructura tri-dimensional de enolasa de *Ae. albopictus* fue obtenida utilizando el programa Iterative Threading ASSEmbly Refinement (I-TASSER) (Zhang, 2008; Roy et al., 2010; Yang et al., 2015), ya que no se ha reportado en el banco de datos de proteínas. El algoritmo PathDock (Duhovny et al., 2002; Schneidman et al., 2005) fue utilizado para realizar el modelo tri-dimensional *in silico* de la interacción entre enolasa de células C6/36 y la proteína E del DENV. Enolasa y la proteína E fueron utilizados como receptor y ligando respectivamente y se utilizaron los

parámetros estándar para este algoritmo. Los resultados obtenidos con PatchDock fueron refinados y rerranqueados con el algoritmo FireDock (Andrusier et al., 2007; Mashiach et al., 2008) y el modelo con la menor energía de interacción se utilizó en este estudio. La visualización de la interacción entre las proteínas se realizó con el programa PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

2.11 Búsqueda de dominios transmembranales

La predicción de la región transmembranal de la proteína enolasa se realizó utilizando 3 programas con los parámetros estándar en cada programa, lo cuales fueron: (1) TMPred (Hofmann & Stoffel, 1993), (2) SACS MEMSAT (Jones et al, 1994), (3) CCTOP (Dobson et al, 2015). Los números de acceso de las proteínas enolasas fueron tomados del GeneBank: enolasa de *Ae. albopictus* XP_019548794.1, enolasa de *Ae. aegypti* EAT47221.1 y enolasa de *Homo sapiens* CAA47179.1.

2.12 Inmuno Microscopía Electrónica de Barrido y espectrometría de dispersión de energía de rayos X

Para este ensayo se sembraron 4000 células C6/36 en vidrio y se dejaron durante 24 horas en medio de crecimiento MEM con SFB al 5 %, posteriormente se retiró el medio y las células se dejaron 30 min a 4°C, a continuación se dejaron en MEM sin suero a 4°C y se incubaron con DENV-2 MOI 20 o sin DENV-2 durante 1 hora a 4°C en MEM sin suero, después se retiró el medio y se lavó 2 veces con PBS, se fijaron las células con paraformaldheído al 4 %, durante 2 horas, se bloquearon con glicina 100mM/BSA 1%, se colocaron anticuerpos anti proteína E del DENV-2, anticuerpos secundarios anti ratón con IgG con oro de 10 nanometros, se fijaron con glutaraldheído al 2 %, tetróxido de osmio al 1 %, se secaron al punto crítico de CO₂, se colocaron en un porta-muestras de aluminio, adheridas con cinta de carbón y cubiertas con 20 a 25 nm de carbón, para inducir conductividad. Las micrografías fueron colectadas

utilizando un microscopio electrónico de barrido ambiental (XL30, Philips, Inglaterra). La composición química fue determinada a través de un detector espectro de rayos X de energía dispersiva (Edax, EUA) acoplado al microscopio electrónico ambiental, utilizando el software “Microanalysis System Software” versión 3.31XL. Los análisis fueron realizados por triplicado en 2 ensayos independientes

2.13 Microscopía de fuera atómica

Para este ensayo se sembraron 4000 células C6/36 en vidrio y se dejaron durante 24 horas en medio de crecimiento MEM con SFB al 5 %, posteriormente se retiró el medio y las células se dejaron 30 min a 4°C, a continuación se dejaron en MEM sin suero a 4°C y se incubaron con DENV-2 MOI 20 o sin DENV-2 durante 1 hora a 4°C en MEM sin suero, después se retiró el medio y se lavó 2 veces con PBS, se fijaron las células con paraformaldheído al 4 %, durante 2 horas, se bloquearon con glicina 100mM/BSA 1%, se colocaron anticuerpos anti proteína E del DENV-2, anticuerpos secundarios anti ratón con IgG con oro de 10 nanometros, se fijaron con glutaraldheído al 2 %, tetróxido de osmio al 1 %, se secaron al punto crítico de CO₂, se colocaron en un porta-muestras de aluminio, adheridas con cinta de carbón y cubiertas con 10 a 15 nm de oro, para inducir conductividad. Las micrografías fueron colectadas utilizando un microscopio fuerza atómica.

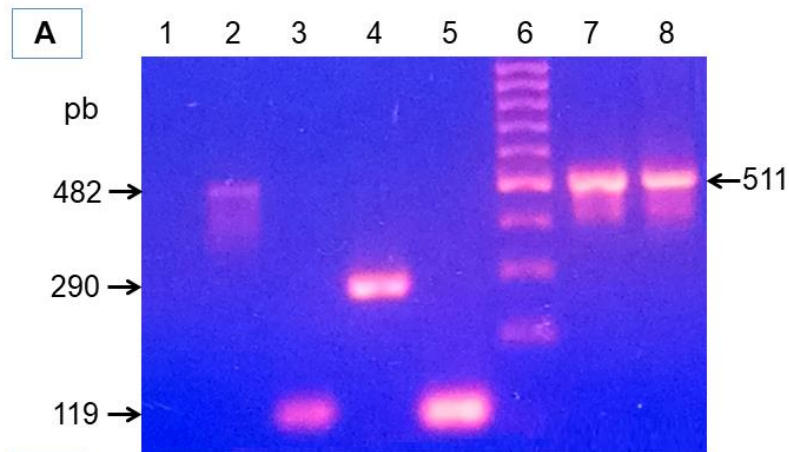
2.14 Análisis estadístico

La normalización de los datos, análisis de varianzas y análisis post-hoc, se realizaron con el software SPSS statistical, se tomó el valor $p < 0.05$ para todos los ensayos con diferencia estadísticamente significativa

3.- Resultados

3.1 Serotipificación de la muestra clínica con DENV VER/MEXS008A/06

En este estudio realizamos ensayos en los cuales demostramos que la proteína enolasa de *Ae. albopictus* se requiere en la unión del DENV a células C6/36, para ello realizamos la serotipificación del DENV (VER/MEXS008A/06) de una muestra previamente caracterizada (Gardella et al., 2008), para esto realizamos la extracción del RNA viral utilizando Trizol LS a partir del sobrenadante de células C6/36 infectadas con este DENV o con 3 serotipos de referencia los cuales son DENV-1 (US/Hawaii), DENV-2 (Jamaica) y DENV-3 (H87), durante 72 horas, los resultados obtenidos muestran que los amplificadores serotipo específicos concuerdan con lo reportado por Lanciotti et al., 1992; los cuales son: DENV-1 482 pares de bases (pb), DENV-2 119 pb, DENV-3 290 pb utilizando los oligos D1 en mezcla con TS1, TS2, TS3 y una banda de 511 pb para cualquier serotipo utilizando los primers D1 y D2 (Figura 5 A), de estos, solo el amplificado de 511 pb correspondiente a la muestra VER/MEXS008A/06 fue secuenciado, esta secuencia fue sometida a Blastn del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y con ello se determinó que la muestra es de él serotipo 2, esta muestra se abreviará como DENV-2 en este estudio (Figura 5 B).



B

Description	GenBank		Graphics		Distance tree of results	
	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Dengue virus 2 isolate DENV-2/US/BID-V5414/2009_complete genome	865	865	99%	0.0	99.37%	JF730055.1
Dengue virus 2 isolate DENV-2/US/BID-V5411/2006_complete genome	865	865	99%	0.0	99.37%	JF730053.1
Dengue virus 2 isolate DENV-2/US/BID-V5412/2007_complete genome	865	865	99%	0.0	99.37%	JF730050.1
Dengue virus 2 isolate DENV-2/TW/BID-V5054/2008_complete genome	865	865	99%	0.0	99.37%	HQ891023.1
Dengue virus 2 New Guinea C.derivative strain_complete genome	865	865	99%	0.0	99.37%	FJ390389.1

Figura 5. **Serotipificación del virus del dengue muestra**

VER/MEXS008A/06. (A) rt-PCR anidada con primers reportados por Lanciotti et al., 1992, se observan los amplicones de las muestras de referencia y la muestra clínica, el RNA de todas las muestras fue tomado de sobrenadantes de C6/36 infectadas o no infectadas (control -). Carril 1.- Control (-), RNA de C6/36 no infectadas y primers TS1, TS2, TS3 y D1, carril 2.- RNA de DENV-1/Hawaii y primers TS1, TS2, TS3 y D1, carril 3.- RNA de DENV-2/New Guinea C y primers TS1, TS2, TS3 y D1, carril 4.- RNA de DENV-3/H87 y primers TS1, TS2, TS3 y D1, carril 5.- RNA de (VER/MEXS008A/06) DENV-2 y primers TS1, TS2, TS3 y D1, carril 6.- Marcador de peso molecular (MPM), carril 7.- RNA de DENV-1/Hawaii y primers D1 con D2 y carril 8.- RNA de DENV-2 y primers D1 con D2. (B) Resultado del Blastn de secuencia obtenida del amplicon de carril 8 del panel A de esta figura.

3.2 Cromatografía de afinidad acoplado DENV-2 a Sefarosa 4B

Debido a que nuestro equipo de trabajo publicó que las proteínas enolasas de células de C6/36 de *Ae. albopictus* y de intestino medio de *Ae. aegypti* son aisladas mediante cromatografía de afinidad con DENV-2 o DIII de la proteína E acoplada a Sefarosa 4B (Muñoz et al., 2013), nosotros preparamos una columna de afinidad acoplado DENV-2 a Sefarosa 4B y las proteínas que se retuvieron por afinidad se eluyeron con glicina pH 2.7, estas proteínas se corrieron en 2 geles de poliacrilamida en paralelo, uno se tiñó con azul de Coomasie (Figura 6 A) y el otro se utilizó para transferir las proteínas a membrana de nitrocelulosa, esto para identificar a la proteína enolasa mediante anticuerpos específicos, los resultados mostraron una banda de 47 kDa que corresponde a enolasa, lo que sugiere que enolasa se une a DENV-2, (Figura 6 B).

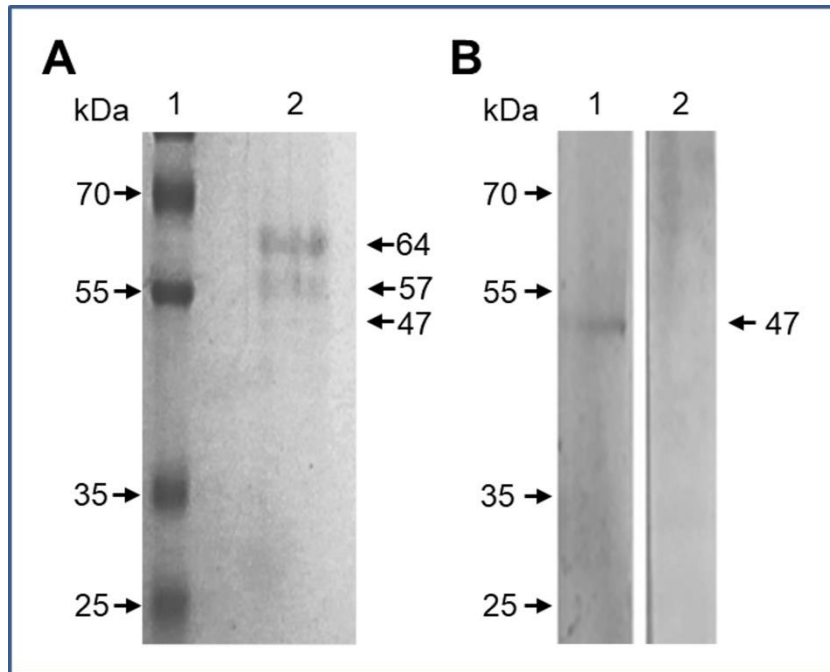


Figura 6. Identificación de enolasa en proteínas obtenidas por cromatografía de afinidad con DENV-2 acoplado a Sefarosa 4B. (A) Carril 1.- marcadores de peso molecular, carril 2.- proteínas eluidas de la columna de afinidad teñidas con azul de coomasie en gel SDS-PAGE. (B) Inmunoblot, carril 1.- proteínas eluidas de la columna de afinidad, las cuales se transfirieron a membrana de nitrocelulosa, se aplicaron anticuerpos anti-enolasa, seguida por la incubación con anticuerpos anti-conejo con AP, carril 2 proteínas eluídas de la columna de afinidad, las cuales se incubaron con anti-conejo con AP. La proteína enolasa se revelo con el sustrato NBT/BCIP.

3.3 Inhibición de la infección del DENV-2 con anti-Enolasa

Ya que se observó la interacción entre la enolasa y el DENV-2, probamos si los anticuerpos anti-enolasa bloquean la unión del DENV-2 a células C6/36, para esto se incubaron 4×10^5 células C6/36 en placas de 12 pozos durante una hora a 4°C sin anticuerpos, con $4\ \mu\text{g/ml}$ de anti Ig no específica, $4\ \mu\text{g/ml}$ de anti-enolasa o $4\ \mu\text{g/ml}$ de anti-proteína E (4G2), transcurrida la hora se retiró el sobrenadante, se lavaron las células 2 veces con MEM sin suero y se infectaron con DENV-2 M.O.I 0.5, después se colocó medio de mantenimiento y las células C6/36 se incubaron durante 24 horas a 28°C , posteriormente se retiró el sobrenadante y se extrajo la proteína de la monocapa celular, esta proteína se cargó un gel de poliacrilamida y transferió a membrana de nitrocelulosa para comparar la cantidad de proteína E viral en cada condición probada, la normalización se obtuvo con actina del hospedero (Figura 7 A), los datos obtenidos del inmunoblot se cuantificaron utilizando el programa ImageJ, los cuales muestran una reducción significativa $p < 0.05$ en la proliferación viral al incubar las células C6/36 con anti-enolasa o con anti-E (4G2) comparado con un anti-Ig o sin anticuerpos (Figura 7 B).

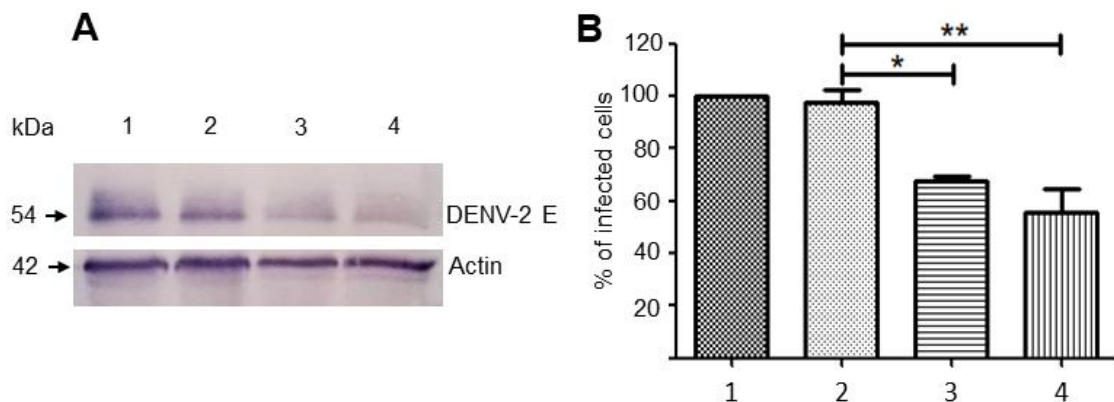


Figura 7.- Inhibición de la infección con anticuerpos anti-enolasa.- (A) Inmunoblot de proteínas totales de células C6/36 infectadas con DENV-2 durante 24 horas a 28°C , las cuales fueron previamente incubadas a 4°C una hora, sin anticuerpos carril 1, con anticuerpos Ig inespecíficos carril 2,

con anticuerpos anti-proteína E carril 3, o anticuerpos anti-enolasa carril 4, la banda de 54 kDa muestra la cantidad de proteína viral en cada condición y anti-actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína cargada en el gel. (B) cuantificación de las proteínas observadas en panel A, actina es la proteína que se utilizó para normalizar la proteína cargada en cada carril. Las bandas fueron reveladas con el sustrato NBT/BCIP. Los ensayos se repitieron 2 veces y cada ensayo se hizo por triplicado *, $p < 0.05$.

La inhibición de la infección a nivel de la membrana celular, fue corroborada mediante el conteo de sincitios, ya que el número de sincitios correlaciona con la replicación viral (Wünschmann and Stapleton, 2000; Fukushima et al., 2019), para ello células C6/36 no infectadas o infectadas con DENV e incubadas sin anticuerpos o con anticuerpos inespecíficos o anticuerpos anti-enolasa a 4°C durante una hora fueron evaluadas, en el conteo de sincitios, se contabilizó una menor cantidad de sincitios a las 24 h postinfección de células incubadas con el anti-enolasa, sin embargo no hubo diferencia significativa con respecto a células infectadas con DENV sin incubación con anticuerpos (Figura 8 A), por otro lado, el número de sincitios a las 48 h postinfección en células C6/36 infectadas con DENV e incubadas con el anticuerpo inespecífico o sin anticuerpos fue mayor de manera significativa $p < 0.01$ con respecto a células C6/36 infectadas con DENV e incubadas con anticuerpos anti-enolasa (Figura 8 B), estos resultados sugieren que enolasa es una proteína de unión a DENV en membrana de células C6/36.

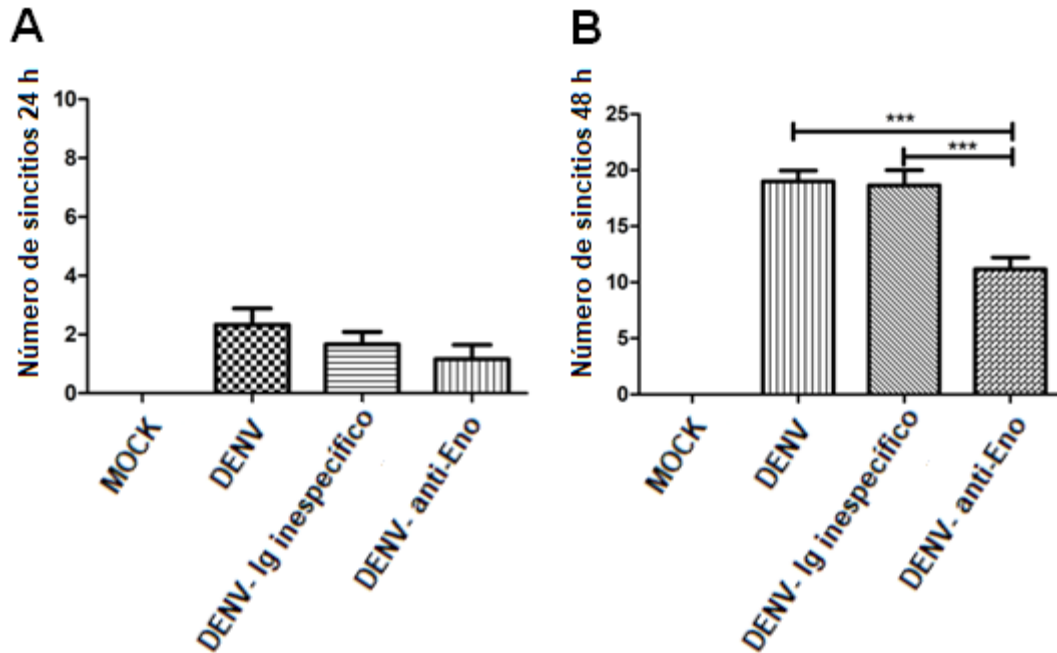


Figura 8. Inhibición de la infección mediante anticuerpos anti-enolasa. (A) Células C6/36 crecidas a 90 % de confluencia se trataron bajo 4 condiciones; i) MOCK infectadas, ii) infectadas con DENV, iii) incubadas con anticuerpos inespecíficos e infectadas con DENV o iv) incubadas con anticuerpos anti-enolasa e infectadas con DENV, después de 24 horas se realizó el conteo de sincitios. (B) Células C6/36 bajo las mismas condiciones que en panel A de esta figura, las cuales se dejaron 48 horas y se contaron los sincitios. ***Diferencia estadísticamente significativa $p < 0.01$. Los anticuerpos se incubaron una hora a 4°C, y la infección se dejó 24 o 48 horas a 28°C.

3.4 Viabilidad celular con anticuerpos anti-enolasa

Para demostrar que la inhibición de la infección esta mediada por los anticuerpos y no por el menor número de células o la muerte celular, se realizaron ensayos de viabilidad, la cual fue detectada con tinción por exclusión utilizando azul de tripano (Strober, 2001), el ensayo fue realizado 2 veces por triplicado en placas de 96 pozos sin o con anticuerpos anti-enolasa a 4 diferentes concentraciones las cuales fueron:

0.4, 2, 3, and 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los resultados muestran que la aplicación de los anticuerpos no generan disminución en la viabilidad de células C6/36 en medio de mantenimiento a las 48 horas, se incluyeron células fijadas con glutaraldehído 0.5%/formaldehído 1.8% para corroborar la eficiencia del azul de tripano (figura 9).

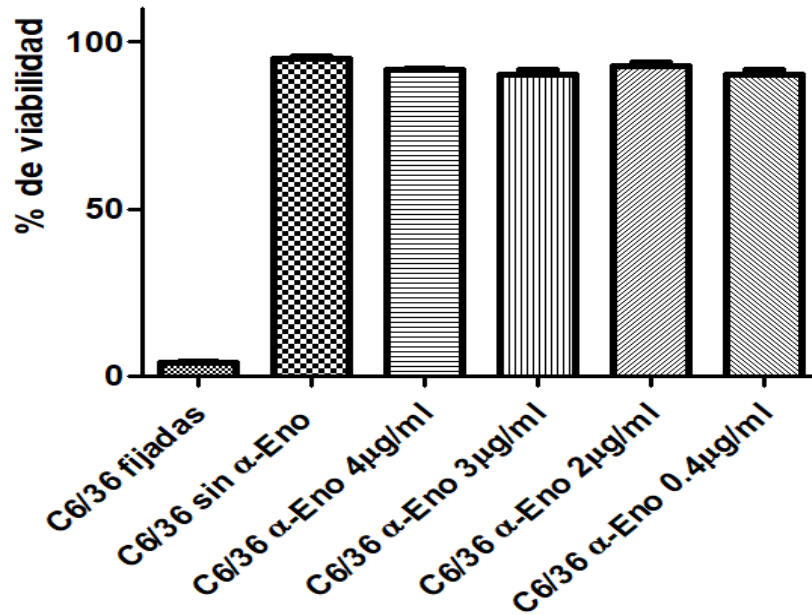


Figura 9. Viabilidad de células C6/36. Las células fueron incubadas por una hora a 4°C con anticuerpos anti-enolasa y después se dejaron con medio de mantenimiento durante 48 horas, de izquierda a derecha las barras representan células sin anticuerpos y fijadas con glutaraldehído 0.5%/formaldehído 1.8%, células sin incubación de anticuerpos, células con 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpos, células con 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpos, células con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpos y células con 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpos. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los tratamientos sin o con anticuerpos.

3.5 Localización de enolasa en células C6/36

Debido a que nuestros resultados muestran inhibición de la infección por anticuerpos anti-enolasa, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para identificar la localización de la proteína enolasa y así soportar que enolasa puede ser un receptor para DENV en células C6/36, las células fueron observadas en un microscopio confocal Leica SP8 y se observó a enolasa en el núcleo (triángulo blanco), citoplasma (flecha con línea punteada) y en la superficie de la células (flecha continua) (Figura 10 A), en el control negativo, el cual fue células C6/36 sin anticuerpos anti-enolasa, solo se observó la fluorescencia en el núcleo emitida por el DAPI (Figura 10 B).

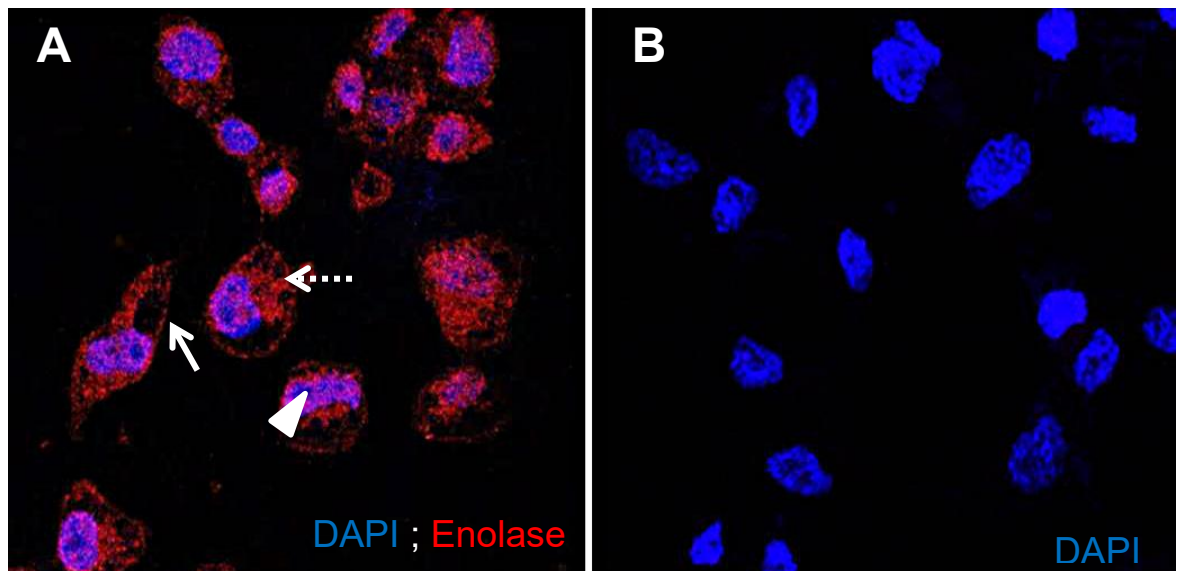


Figura 10. Localización de enolasa en células C6/36 mediante microscopia de inmunofluorescencia indirecta. (A) Células C6/36 con anticuerpos anti-enolasa, anticuerpos secundarios rodaminados y DAPI, se observa a enolasa en núcleo (triángulo blanco), citoplasma (flecha con línea punteada) y membrana celular (flecha continua). (B) control negativo, células C6/36 anticuerpos secundarios rodaminados y DAPI.

3.6 Colocalización de Proteína E del DENV-2 y enolasa en membrana celular

Debido a que la proteína E del DENV-2 está asociada con el proceso de reconocimiento y unión al receptor celular (Modis et al., 2004; Watterson et al., 2012; Huerta et al., 2008) y que enolasa ha sido observada en la membrana celular, realizamos ensayos de inmunofluorescencia indirecta para detectar la colocalización entre la proteína E del DENV-2 y enolasa en la membrana de células C6/36 fijadas y no permeabilizadas. Para ello se crecieron células C6/36 en cubreobjetos a una confluencia del 80-90% en medio MEM, después se lavaron con PBS, se incubaron con DENV-2 MOI 20, durante una hora a 4°C, se lavó el virus con PBS, se fijaron con glutaraldehído 0.5%/formaldehído 1.8% por una hora a 25°C y se aplicaron los anticuerpos anti-proteína E del DENV y anti-enolasa, posteriormente se incubaron con anti-ratón FITC y anti-conejo Rodaminado y por último se incubaron con DAPI, los resultados observados muestran que enolasa se puede localizar en la membrana celular (Figura 11, panel A), el DENV-2 se une a la membrana celular (Figura 11, panel B), enolasa y la proteína E del DENV-2 colocalizan a nivel de membrana celular (Figura 11, panel C) y la ubicación de enolasa y la proteína E del DENV-2 se observa principalmente en la membrana celular (Figura 11, panel D), los ensayos se realizaron por triplicado en dos ensayos independientes. Estos resultados sugieren que enolasa une al DENV-2 en la membrana de células C6/36.

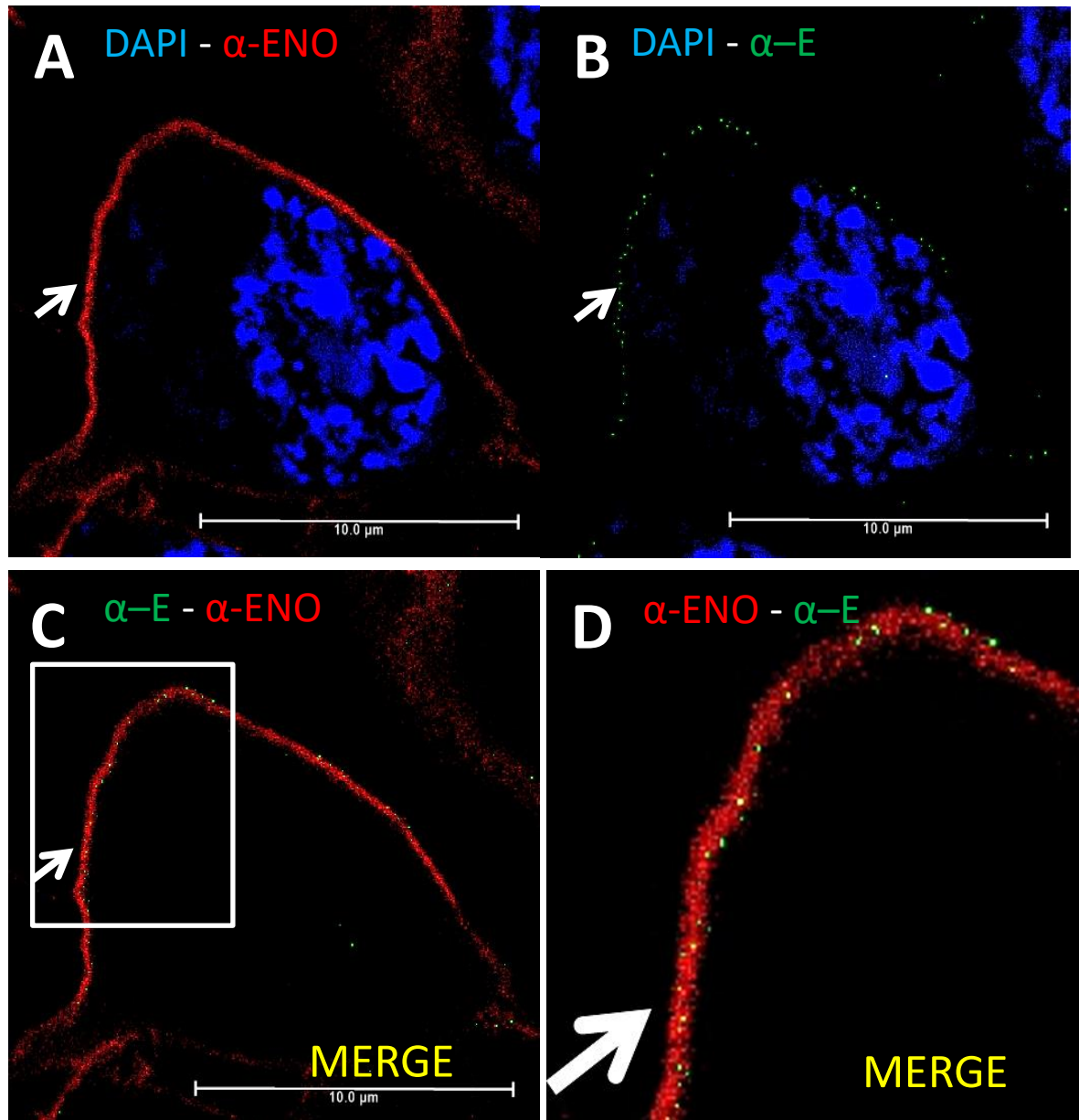


Figura 11. Colocalización de DENV-2 y enolasa en la superficie de células C6/36. Panel A, C6/36 con DAPI (azul) y anti-enolasa (rojo); panel B C6/36 con anti-E (verde) y DAPI; panel C, C6/36 con anti-enolasa y anti-E, la flecha indica sitios de colocalización entre el virus y enolasa; panel D, C6/36 con DAPI, anti-enolasa y anti-E, ampliificación del recuadro del panel C. Anti-E 1/200, anti-enolasa 1/40, anti-ratón fluoresceinado 1/100 y anti-conejo rodaminado 1/100.

3.7 Colocalización de Proteína E del DENV-2 y enolasa en núcleo celular

Debido a que enolasa ha sido descrita como un factor de transcripción (Feo et al., 2000), nosotros determinamos la colocalización de enolasa y la proteína E en el núcleo (teñido con DAPI) de células C6/36 infectadas con DENV-2 durante 24 a 28°C. Los ensayos de inmunofluorescencia muestran la localización de enolasa (en fiusha) en el núcleo (figura 12 panel A), y DEVN-2 alrededor del núcleo (en verde) (figura 12 panel B), esta colocalización entre enolasa y DENV-2 se observa en el núcleo (en amarillo, figura 12 panel C), la colocalización fue ampliada para distinguir la coloración amarilla de la roja y la verde (figura 12 panel D).

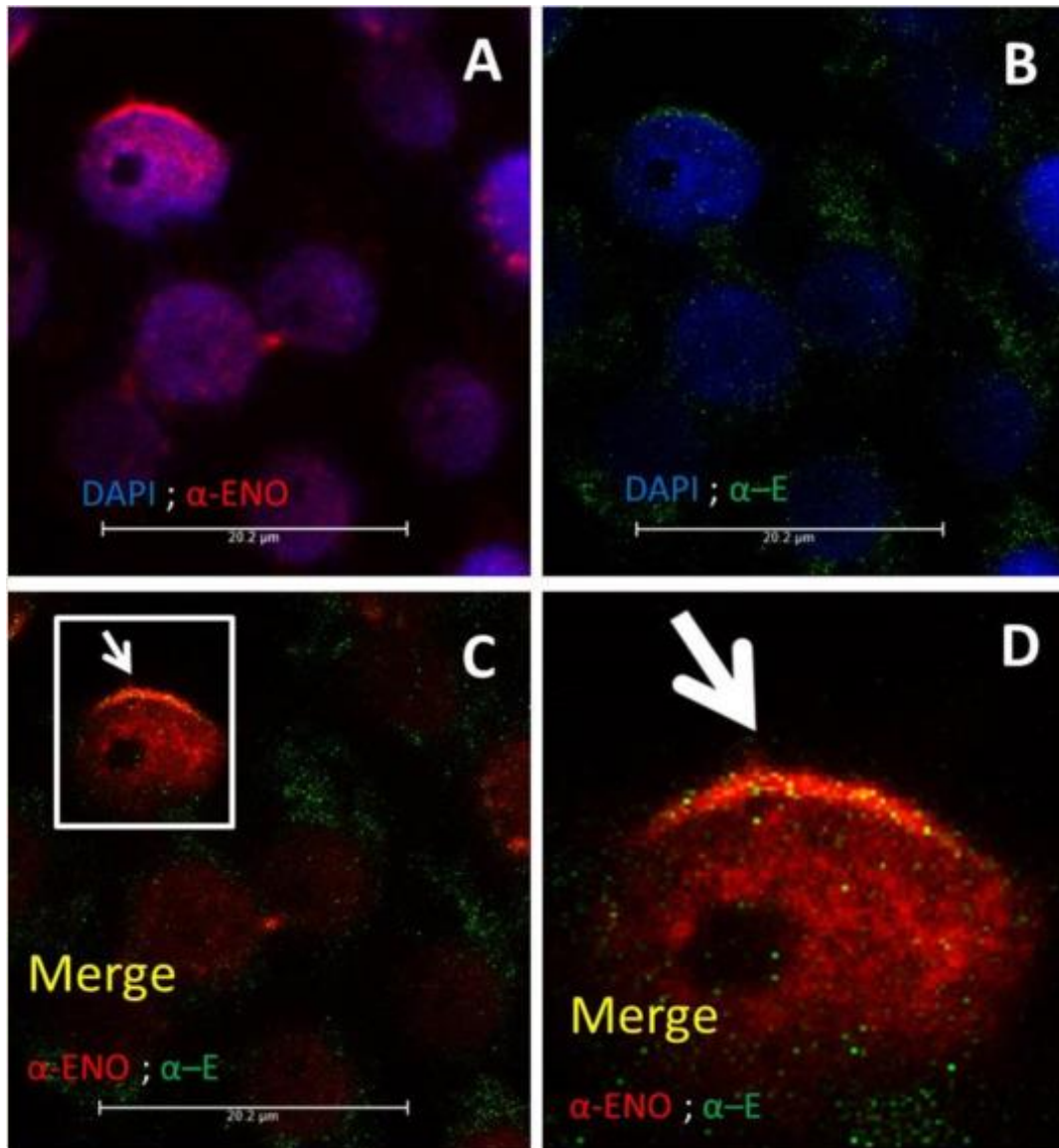
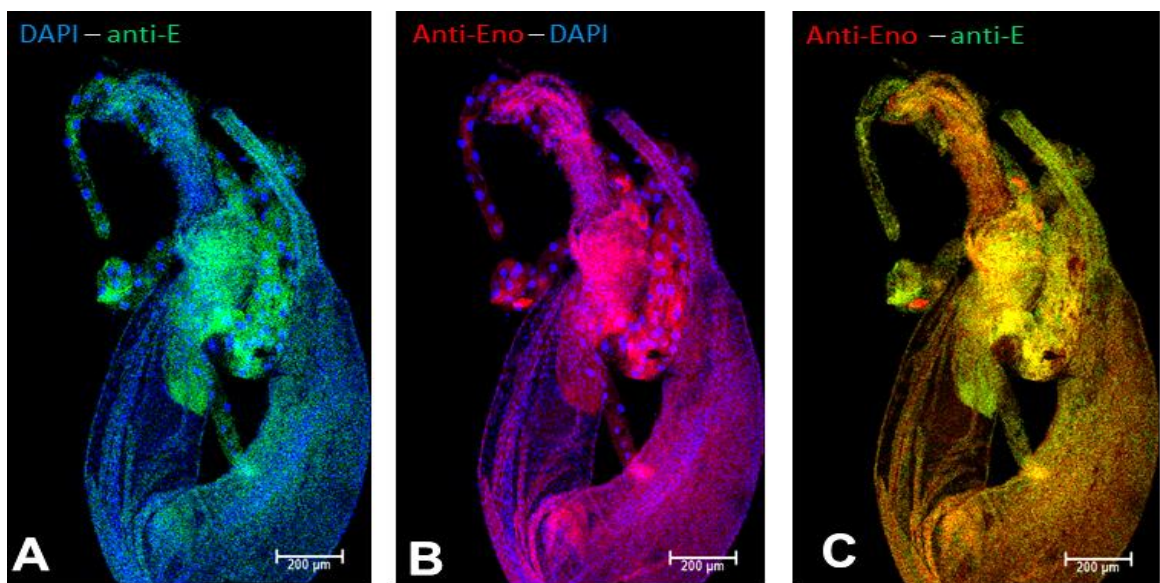


Figura 12. Colocalización de enolasa y DENV-2 en núcleo de células C6/36. Inmunofluorescencia indirecta de C6/36 infectadas con DENV-2 durante 24 horas a 28°C. Panel A, C6/36 con DAPI y anti-enolasa; panel B, C6/36 con DAPI y anti-E del DENV-2; panel C, C6/36 con anti-enolasa y anti-E, fueron observadas colocalizando en el núcleo; panel D, ampliación del recuadro del panel C de esta figura que muestra la colocalización de enolasa y la proteína E del DENV-2. Anti-E 1/200, anti-enolasa 1/40, anti-ratón fluoresceinado 1/100 y anti-conejo rodaminado 1/100.

3.8 Colocalización de enolasa y proteína E del DENV en midgut

Para corroborar si enolasa y la proteína E del DENV colocalizan en el midgut, nosotros disectamos mosquitos *Ae. aegypti*, aislamos el midgut y este se colocó en medio MEM sin suero, después los midguts fueron incubados con DENV-2 a 28 °C por una hora y se fijaron con glutaraldehído 0.5%/formaldehído 1.8%, se permeabilizaron, se bloquearon y se incubaron con anticuerpos primarios; anti-E (de ratón), anti-enolasa (de conejo), posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón fluoresceinados y anti-conejo rodaminados, se incubaron con DAPI y se observaron en un microscopio confocal Leica TCS SP8, el DENV-2, (figura 13, panel A) enolasa (figura 13, panel B) y la



colocalización de estas 2 proteínas fue observada en el midgut de *Ae. aegypti* (figura 13, panel C).

Figura 13. Colocalización de enolasa y proteína E del DENV en midgut. Mosquitos *Ae. aegypti* fueron disectados y el midgut fue aislado e incubado a 28°C con DENV-2. (A) DENV-2 en color verde y DAPI en azul, (B) Enolasa en color rojo y DAPI, (C) Colocalización de enolasa y DENV-E en color amarillo.

3.9 Búsqueda *in silico* de dominios transmembranales de enolasa

Puesto que ha sido reportado que enolasa es una proteína de membrana y receptor a plasminógeno (Diaz et al., 2012, Vega et al., 2013; Sawhney et al., 2015), se procedió a realizar *in silico* la búsqueda de dominios transmembranales (TM) de esta proteína utilizando 3 diferentes programadas SACS MEMSAT, CCTOP y PRED-TMR, las secuencias de las proteínas enolasas que se utilizaron fueron de *Homo sapiens* (No. de acceso NCBI; CAA47179.1), *Ae. aegypti* (No. de acceso NCBI; EAT47221.1) y *Ae. albopictus* (No. de acceso NCBI; KXJ70801.1). Los programas TMpred y SACS MEMSAT indicaron la presencia de un dominio transmembranal, mientras que el programa CCTOP indicó la presencia de 2 posibles dominios transmembranales (Tabla 5).

Tabla 5. Predicción de dominios transmembranales de enolasa.

ESPECIES		<i>H.</i>	<i>Ae.</i>	<i>Ae.</i>	REFERENCIA
		<i>sapiens</i>	<i>aegypti</i>	<i>albopictus</i>	
PROGRAMA	Dominio Transmembranal	Posición de Aminoácidos			
TMpred	1	113-132	108-131	108-131	Hofmann and Stoffel, 1993
SACS MEMSAT 2	1	116-132	106-124	106-124	Jones et al., 1994
CCTOP	2	112-132 145-165	104-124 140-160	102-124 138-160	Dobson et al., 2015

3.10 docking molecular entre la proteína E del DENV-2 y enolasa

Con la finalidad de sustentar la interacción entre Enolasa de *Ae. albopictus* y la proteína E del DENV-2 se llevó a cabo el docking molecular entre estas 2 proteínas, sin embargo como la estructura 3D de la enolasa de *Ae. albopictus* no se ha publicado, se realizó un modelo utilizando la secuencia anotada en el NCBI (No. de acceso; KXJ70801.1) en el programa Iterative Threading program ASSEmbly Refinement (I-TASSER), este modelo junto con la estructura 3D de la proteína E del DENV-2 (PDB:1OAN) fueron utilizados en el ensayo de interacción *in silico*, para ello se utilizó el programa PathDock (Duhovny et al., 2002; Schneidman et al., 2005) y los resultados obtenidos fueron refinados y reranqueados en base a los valores de ΔG por medio del programa FireDock (Andrusier et al., 2007; Mashiach et al., 2008). La interacción con menor ΔG (-25.14) fue

visualizada en el programa Pymol, esta identificación muestra que el dominio III (en rojo) de la proteína E del DENV puede interactuar con la proteína enolasa (figura 14, panel A), además este programa es capaz de predecir los posibles contactos polares de los aminoácidos entre la 2 proteínas que interactúan, los aminoácidos identificados fueron Gly 174 (figura 14, panel B) y Gly 235 (figura 14, Panel C) de enolasa que interactúan con el aminoácido Lys 388 de la proteína E del DENV-2, mientras que los aminoácidos Gly 238 (figura 14, panel D) y Gly 241 (figura 14, panel E) de enolasa interactúan con el aminoácido Asn 390 de la proteína E del DENV-2.

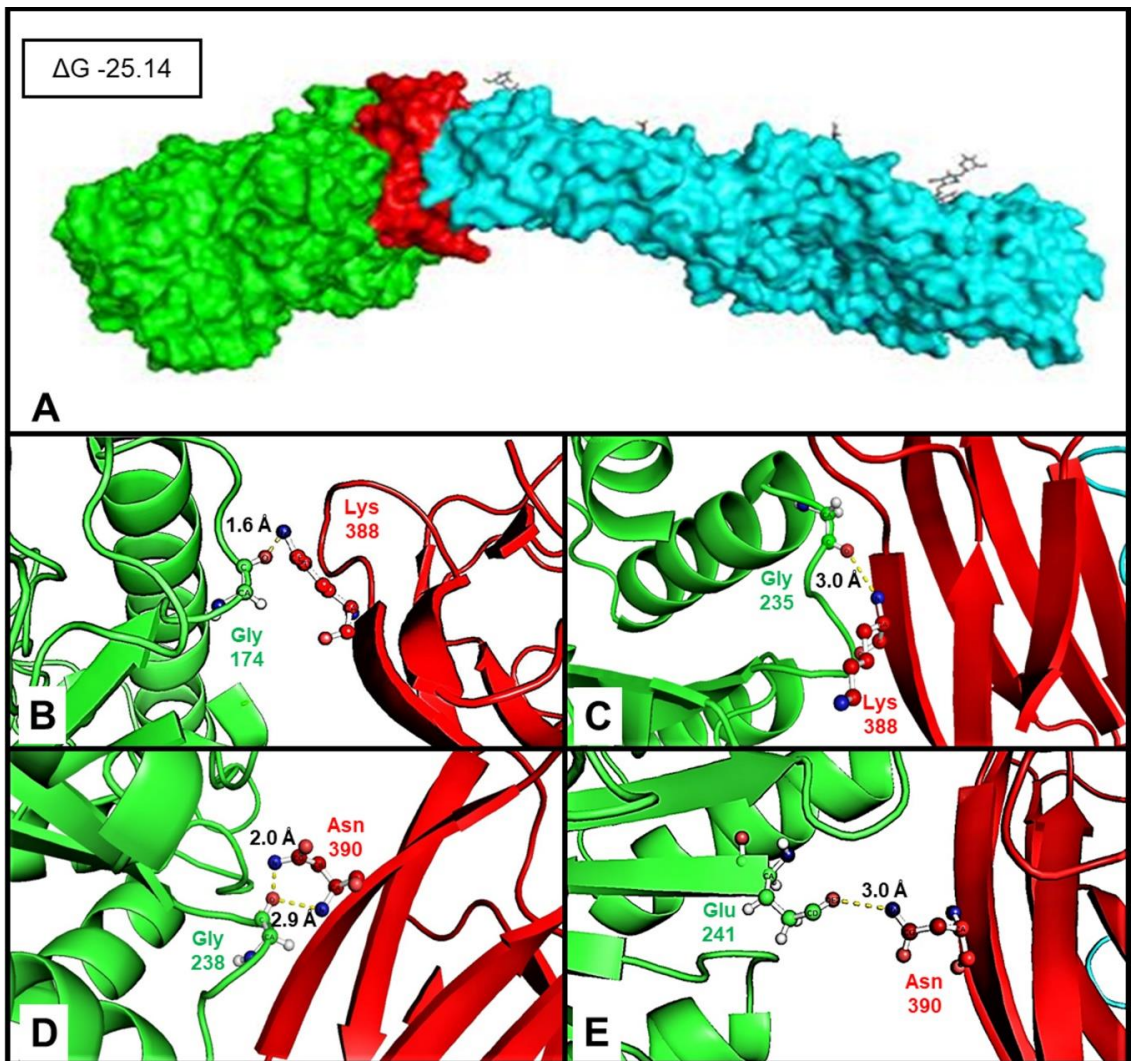
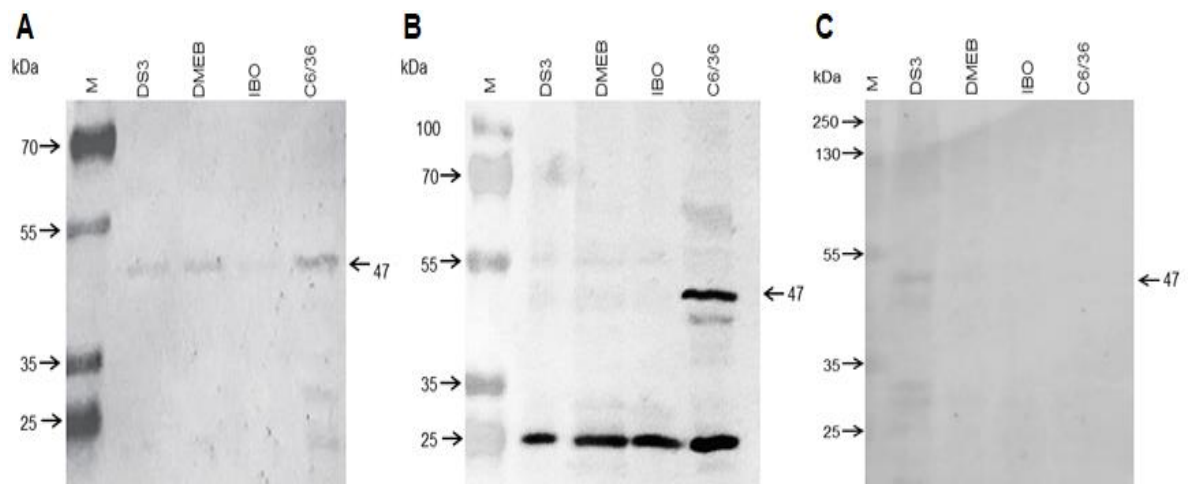


Figura 14.- Docking molecular de la proteína Enolasa de *Ae. albopictus* (No. de acceso NCBI; KXJ70801. 1) con la proteína E del DENV-2 PDB:1OAN. (A) modelaje del docking, en verde enolasa modelada por I-Tasser y en azul la proteína E del DENV-2, en rojo se señala los aminoácidos que corresponden al Dominio III de la proteína E. (B) Acercamiento del putativo enlace polar entre Gly 174 de enolasa y Lys 388 del DIII de la proteína E. (C) Acercamiento del putativo enlace polar entre Gly 235 de enolasa y Lys 388 del DIII de la proteína E. (D) Acercamiento del putativo enlace polar entre Gly 238 de enolasa y Asn 390 del DIII de la proteína E. (E) Acercamiento del putativo enlace polar entre Gly 241 de enolasa y Asn 390 del DIII de la proteína E. Docking con Patchdock, refinado con firedock.

3.11 Expresión de enolasa en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*

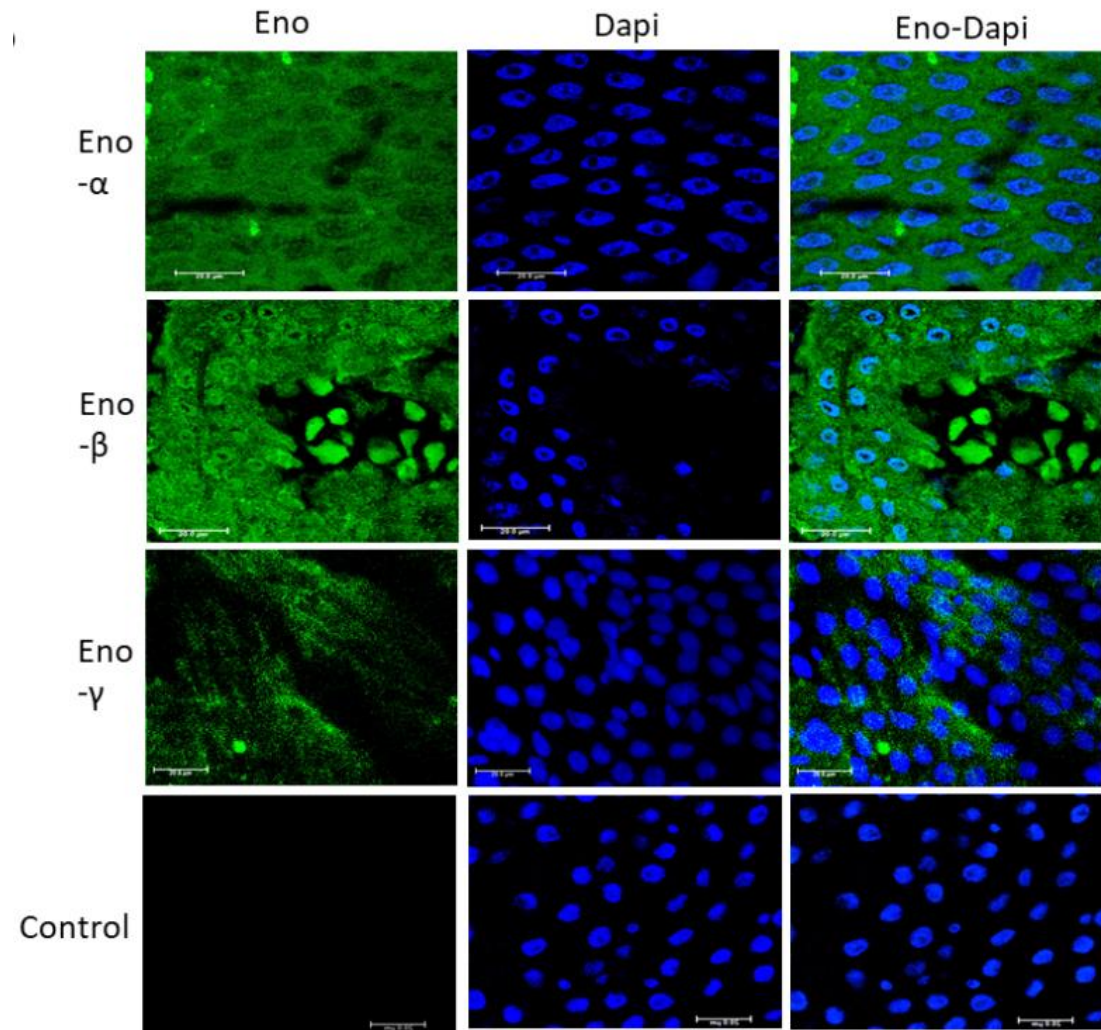
Se ha reportado que las células de mosquito C6/36 contienen 3 variantes para el gene de enolasa (Chen et al., 2016), por lo cual se probaron en ensayos de Inmunoblot 3 anticuerpos específicos para 3 isoformas del gene enolasa; ENO-alfa (Eno 1), ENO-Beta (ENO-3) y ENO-Gamma (Eno-2) en extractos proteicos de células C6/36 y en extractos proteicos de intestinos de 3 cepas de mosquitos de *Aedes aegypti*; DS3, DMEB e IBO-II, los resultados obtenidos muestran una banda de 47 kDa en las 4 muestras al utilizar el anticuerpo anti-ENO alfa (Figura 15 A), al probar el



anti-ENO gamma se revelo una banda de 25 kDa en las 4 muestras además de una banda de 47 kDa en la línea celular C6/36 (Figura 15 B) mientras que al utilizar el anticuerpo anti-ENO beta se observó una banda de 47 kDa en la cepa DS3 (Figura 15 C).

Figura 15. Expresión de enolasa en Intestinos de *Ae aegypti* y células C6/36. Panel A, Inmunoblot utilizando anti-ENO alfa en intestinos de 3 cepas de *Ae aegypti* y células C6/36, Panel B, Inmunoblot utilizando anti-ENO gamma en intestinos de 3 cepas de *Ae aegypti* y células C6/36, Panel C, Inmunoblot utilizando anti-ENO beta en intestinos de 3 cepas de *Ae aegypti* y células C6/36.

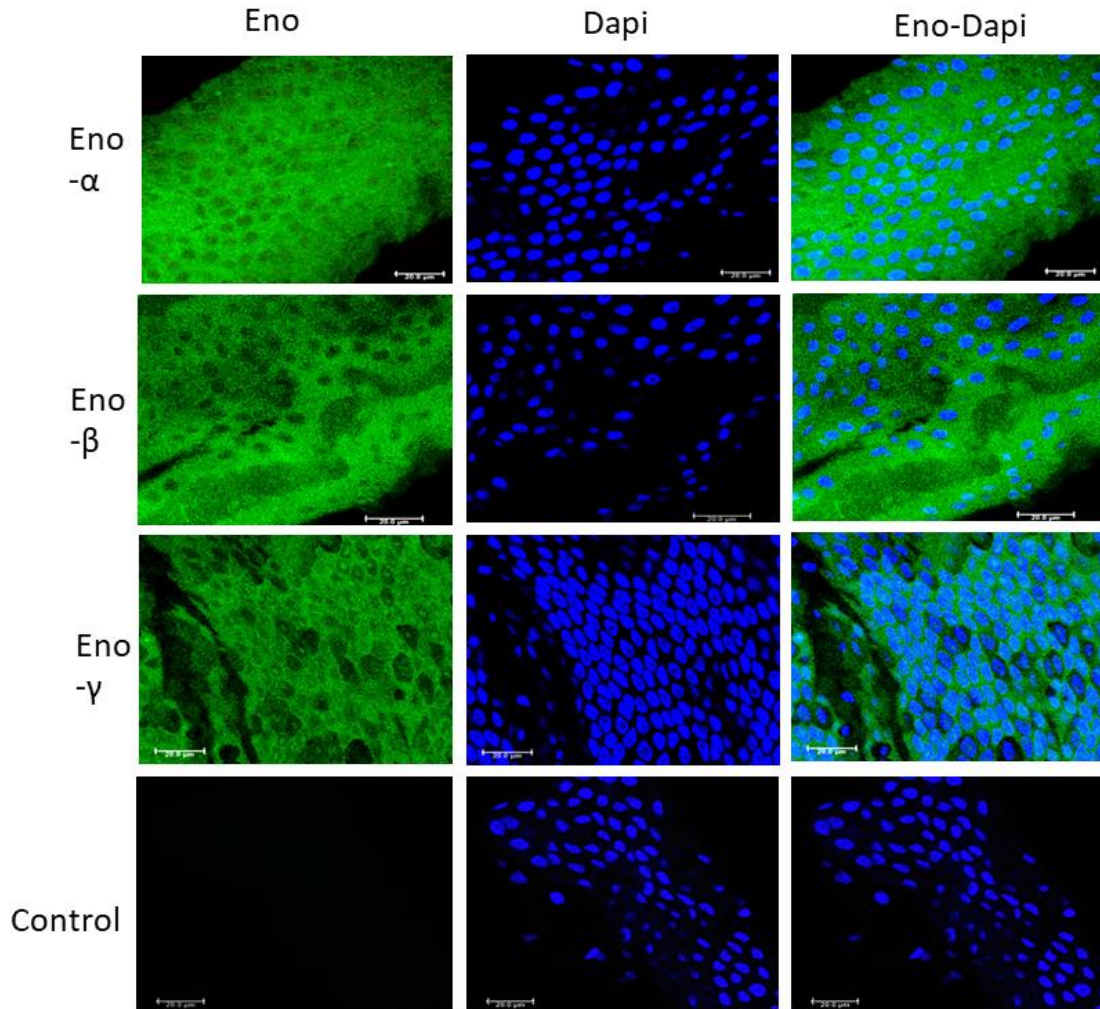
Seguendo con el propósito de conocer los perfiles de expresión de enolasa en células de los mosquitos *Aedes sp*, realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando los 3 anticuerpos específicos para enolasa en 3 cepas de mosquito *Aedes aegypti*, las cuales son DS3 (figura 16), DMEB (figura 17) e IBO (figura 18) el DAPI se incubo para localizar los núcleos de las células y nos da referencia en el control negativo de cada



ensayo.

Figura 16. Las 3 isoformas de enolasa fueron observadas en la cepa DS3 de *Ae. aegypti*. Mosquitos *Ae. aegypti* fueron disectados y el midgut fue

fijado con glutaraldeído al 0.5 % / formaldeído al 1.8 % durante 1 hora a 25°C, cada anticuerpo se colocó en midguts independientes para su visualización en microscopía con focal, DAPI fue aplicado para identificar



los núcleos celulares. El panel inferior solo se trató con anticuerpos secundarios y DAPI, como control. Anti-eno alfa 1/40, anticuerpo secundarios fluoresceinados 1/200.

Figura 17. Las 3 isoformas de enolasa fueron observadas en la cepa DMEB de *Ae. aegypti*. Mosquitos *Ae aegypti* fueron disectados y el midgut de fue fijado con glutaraldeído al 0.5 % / formaldeído al 1.8 % durante 1 hora a 25°C, cada anticuerpo se colocó en midguts independientes para

su visualización en microscopía con focal, DAPI fue aplicado para identificar los núcleos celulares. El panel inferior solo se trató con anticuerpos secundarios y DAPI, como control. Anti-eno alfa 1/40, anticuerpo secundarios fluoresceinados 1/200.

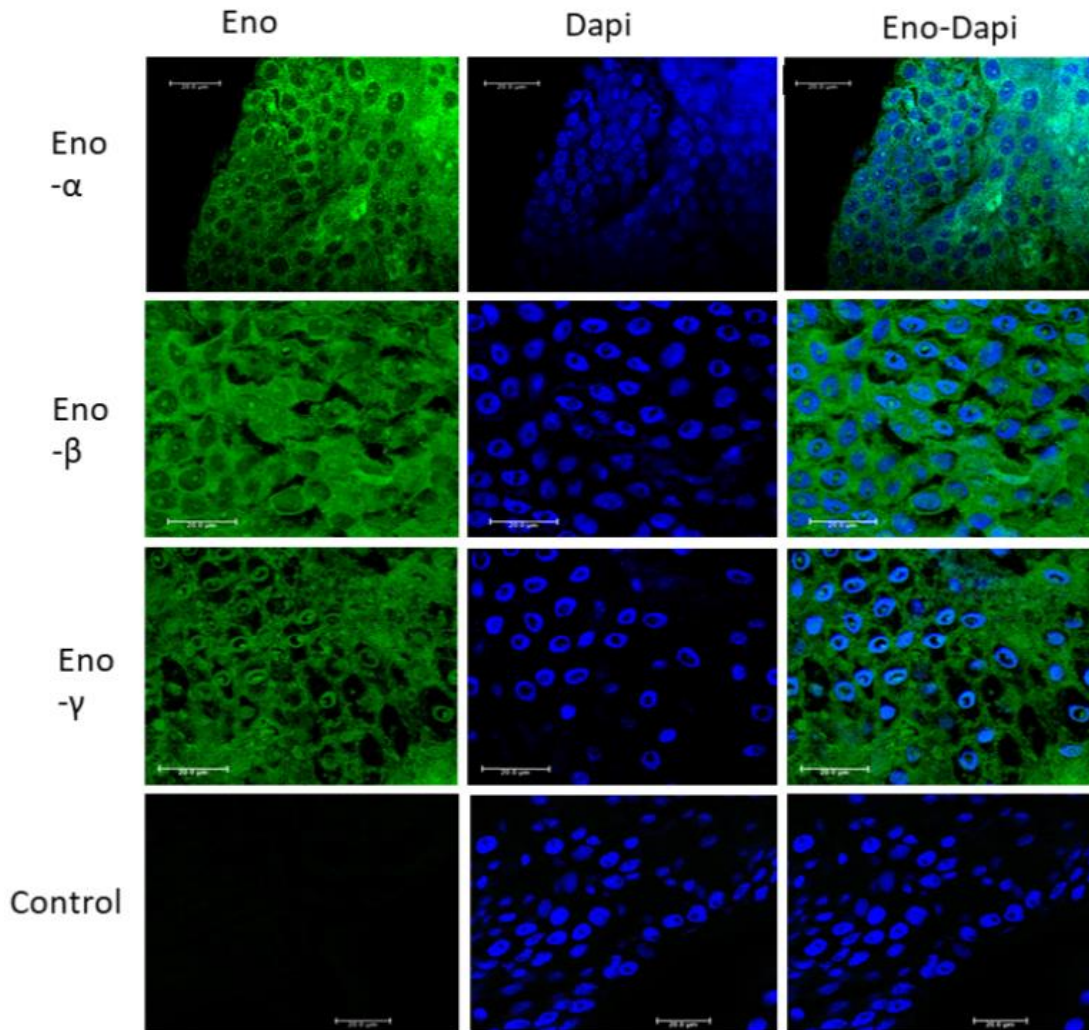


Figura 18. Las 3 isoformas de enolasa fueron observadas en la cepa IBO de *Ae. aegypti*. Mosquitos *Ae. aegypti* fueron disectados y el midgut de fue fijado con glutaraldeído al 0.5 % / formaldeído al 1.8 % durante 1 hora a 25°C, cada anticuerpo se colocó en midguts independientes para su visualización en microscopía con focal, DAPI fue aplicado para identificar

los núcleos celulares. El panel inferior solo se trató con anticuerpos secundarios y DAPI, como control. Anti-eno alfa 1/40, anticuerpo secundarios fluoresceinados 1/200.

3.12 Columna de afinidad acoplando el anti-ENO-Gamma a Sefarosa 4B

Para corroborar la especificidad del anticuerpo anti-ENO-Gamma se realizó una columna de afinidad acoplando el anti-ENO-Gamma a Sefarosa 4B y se pasó extracto total de proteína de células C6/36, se realizaron lavados con Tris-HCl pH 7.5 con 0.1 M de NaCl y la proteína que se retuvo se eluyó con Glicina 0.1M pH 2.7 (figura 19), esta proteína se separó de las sales en un gel de poliacrilamida al 12 % y se corrió durante 15 min a 80 volts y 5 min a 120 Volts, el gel se tiñó con plata, la banda se cortó y se llevó a espectrometría de masas para su identificación (Figura 20, carril 2). Los péptidos identificados corresponden a diferentes proteínas entre ellas enolasa, actina, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, GPR, Tubulina, HSP70 (Tabla 6). La detección de diferentes proteínas aisladas con un anticuerpo se puede explicar de la siguiente manera, las proteínas se encuentran en unión a otras proteínas en las células y al aislar una de ellas se pueden aislar las proteínas con las cuales interactúan, para poder aislar solamente a la proteína enolasa se pueden probar diferentes condiciones como aumentar las concentraciones de SDS, DTT o agregar Urea en la extracción de proteínas.

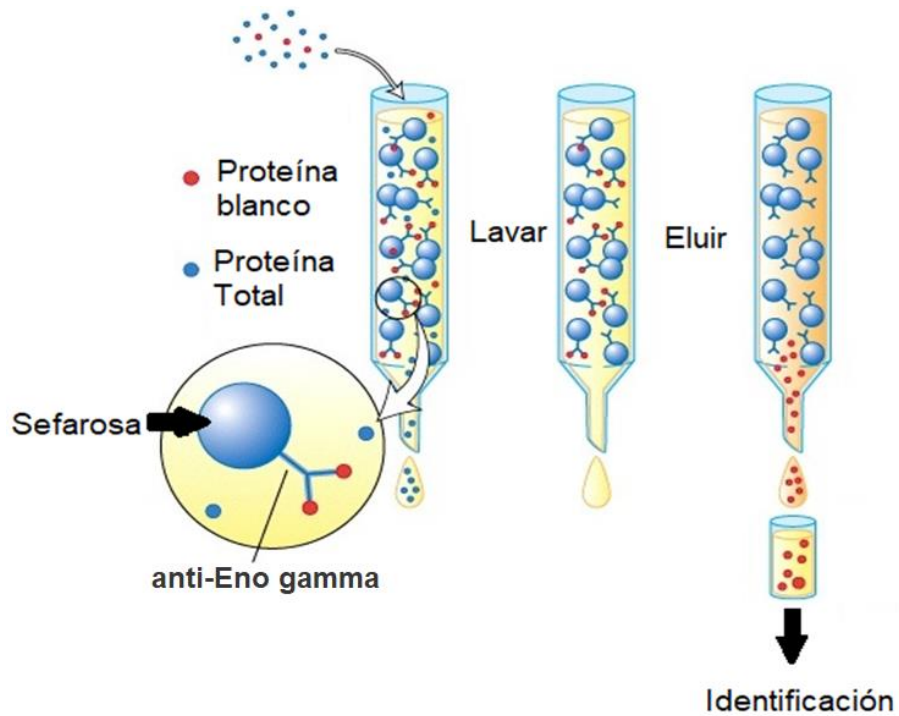


Figura 19. Representación esquemática de la columna de afinidad. Se acoplaron 80 μg de anticuerpo anti-enolasa gamma a 400 μg de Sefarosa 4B y se pasaron extractos de proteínas totales de células C6/36, se lavo la proteína no retenida y se eluyó la proteína, esta última fue analizada por espectrometría de masas utilizando cromatografía líquida (LC/ESI/MS).



Figura 20. Columna de afinidad acoplado anti-Eno-Gamma a Sefarosa 4B. Carril 1 Marcador de Proteínas, Carril 2 Proteínas eluidas con Glicina 0.1 M pH 2.7, Carril 3 proteínas no retenidas y lavadas con Tris-HCl 0.1 M pH 7.5. El gel de poliacrilamida al 12 %, se corrió durante 20 min y se tiño con Plata, la banda se cortó se llevó a espectrometría de masas (LC/ESI/MS).

3.13 Observación del DENV mediante Inmuno Microscopía electrónica de Barrido

Con la finalidad de conocer los elementos químicos que interviene en la unión del DENV a la membrana de células C6/36 se realizaron ensayos de inmuno microscopía electrónica de barrido (inmuno-SEM), ya que esta metodología permite observar de manera específica al DENV en la unión a su célula huésped. Para ello se realizó un experimento en el cual células C6/36 se infectaron con DENV durante una hora a 4°C, posteriormente se fijaron con paraformaldeído al 4 % y se incubaron con anticuerpos específicos que reconocen a la proteína E del DENV, después se colocó un anticuerpo secundario con oro de 10 nanómetros que se une al anticuerpo primario (anti proteína E), las muestras se secaron al punto crítico con CO₂ y se cubrieron con carbón.

Tabla 6. Identificación de proteínas eluidas de células C6/36 acoplando anti-Eno-Gamma a Sefarosa 4B

Id	Accession UniProtKB	Locus	Protein	Max score	Identidad	Peptide	No aa	Accession NCBI	Calculated mol (kDa)
1	A0A182H609_AEDAL	KXJ70801	Hypothetical protein RP20_CCG022453 Enolase	40.1	100	EALNLIQDAIAK IEEELGSAAK	433	KXJ70801.1	46,796
2	Q0Z987_AEDAL	ABG46341	Actin [<i>Aedes albopictus</i>]	54.5	100	SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK DLYANTVLSGGTTMYPGIAD R DSYVGDEAQSKR GYSFTTTAER DSYVGDEAQSK AGFAGDDAPR EITALAPSTMK EKMTQIMFETFNTPAMYVAI QAVLSLYASGR	376	ABG46341	43,610

3	A0A023E HV4	XP_01953 3710 "multimer interface [polypeptid e binding]"	Nucleoside diphosphate kinase-like [<i>Aedes albopictus</i>]	54	100	QILGATNPADSAPGTIR ELVAWTPASEGWVYE	168	XP_0195337 10.1	18,540
4	A0A182H AJ1_AED AL	XP_01955 3817	14-3-3 protein zeta isoform X2 [<i>Aedes albopictus</i>]	46	100	SVTETGVELSNEER YLAEVATGETR DNLTLWTSDDTQGDGDEPQE GGDN	248	XP_0195538 17.1	28,191
5	A0A023E PY3_AED AL	XP_01954 2998.1	Predicted: glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase 2 [<i>Aedes albopictus</i>]	52	100	LISWYDNEFGYSNR LSKPASYDQIK VVDLIK GAGQNIIPAATGAAK VKEAAEGPLK AGIQLSDTFVK IQVFQER	332	XP_0195429 98.1	35,391
6	A0A182G 5M6_AED	KXJ68448	Predicted: heat shock protein	46.4	100	GVVDSEDLPLNISR NADDISQEEYGEFYK	137 5	KXJ68448.1	81,626

	AL		83 [<i>Aedes albopictus</i>]			EDQLEYLEESK EGLELPEDEEEK YTEDEELNK HFSVEGQLDFR YESLTDPSK EAGTLTIIDTGIGMTK			
7	A0A182H AM9_AED AL	XP_01954 8309	Tubulin alpha-1 chain [<i>Aedes albopictus</i>]	59.2	100	VGINYQPPTVVPGGDLAK TIGGGDDSFNTFFSETGAGK AVFVDLEPTVVDEV DVNAAIATIK EIVDVVLDR	450	XP_0195483 09.1	49,792
8	A0A182G CK6_AED AL	XP_01954 4022	Glutathione S- transferase 1 isoform X3 [<i>Aedes albopictus</i>]	53.7	100	NAPGYDLNQAGADEFK QPANPDNFKK	211	XP_0195440 22.1	23,715
9		XP_02971 5957	Endoplasmin- like [<i>Aedes</i>]	40.9	100	EGFILNESEEAK LGIMEDPSNR	795	XP_0297159 57.1	90,914

			<i>albopictus</i>]			EEAQDFLEEDTVK SGFQLPETADFADSIER EYTSLADYVSR QDLVNNLGTIAK VEADSDDVVAK			
10	A0A182G NQ1_AED AL	KXJ74736	Malate dehydrogenase , mitochondrial [<i>Aedes albopictus</i>]	49	100	ANTFIGEAAGVDPQK DDLNTNASIVR VTGYNGAENLEK IQEAGTEVVK ALANADIVIIPAGVPR AGAGSATLSMAYAGAR IQEAGTEVVK	337	KXJ74736.1	35,311
11	A0A182G 262_AED AL	XP_01955 2547	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial [<i>Aedes albopictus</i>]	46.4	100	GVVDSEDIPLNLSR ELISNASDALEK MLLTSMNDLLEK NLVSVEKEMR	704	XP_0195525 47.2	79,755
12	A0A182H8 99_AEDA	KXJ70367	hypothetical protein RP20_CCG02 3900 [<i>Aedes</i>	47.7	100	VNNQSQIGLGYQQK VFGSLETK EYGLNFSEK DGVTLTLSTMIDGK	404	KXJ70367.1	43,685

			<i>albopictus</i> . Voltage- dependent anion channel of the outer mitochondrial membrane			EFGGLIYQR TNSGVEFNTSGSSNQDNGK			
13	A0A182H2 A4_AEDA L	XP_02970 8531	ethanolamine- phosphate cytidyltransfer ase isoform X2 [<i>Aedes albopictus</i>]	50.7	100	YVNEVVIGAPYSVTK TAGVSTTDLVGR GPPVFTQEER DGSSKLGQDHSAR	362	XP_0297085 31.1	40,649
	Accession UniProtKB	Locus	Protein	Max score	Id	Peptide	No aa	Accession	Calculated mol (kDa)
14	A0A182H4 G7_AEDA L	AJO53611. 1	heat shock cognate 70 isoform D [<i>Aedes albopictus</i>]	51.9	100	NQLTTNPENTVFDK IINEPTAAAIAYGLDK ITPSYVAFTADGER ELEDVVQPIIAK VEIANDQGSR	654	AJO53611.1	72,485

						IVITNDQNR DVDEIVLVGGSTR TVSNAVVTVPAYFNDSQR FEELNADLFR WLDANQLAEK DAGTISGLNVLR			
15		XP_01956 1410	Ras-related protein Rab- 5B-like [<i>Aedes albopictus</i>]	34.6	100	LVLLGESAVGK QASPNIVIALAGNK FEIWDTAGQER	214	XP_0195614 10	23,440

Los resultados obtenidos muestran zonas claras en células C6/36 que estuvieron en contacto con el DENV (Figura 21, panel inferior, círculo rojo), en estas zonas se realizó el mapeo de elementos químicos mediante microanálisis (espectroscopía de rayos X de energía dispersa) y se detectaron los elementos; Carbono, Oxígeno, Sodio, Magnesio, Potasio, Calcio en células con y sin DENV, sin diferencias estadísticamente significativas entre los elementos analizados en células C6/36 con o sin DENV mientras que el elemento Oro solo se detectó en muestras con el DENV (Tabla 6), lo que indica que el virus está localizado en estas zonas.

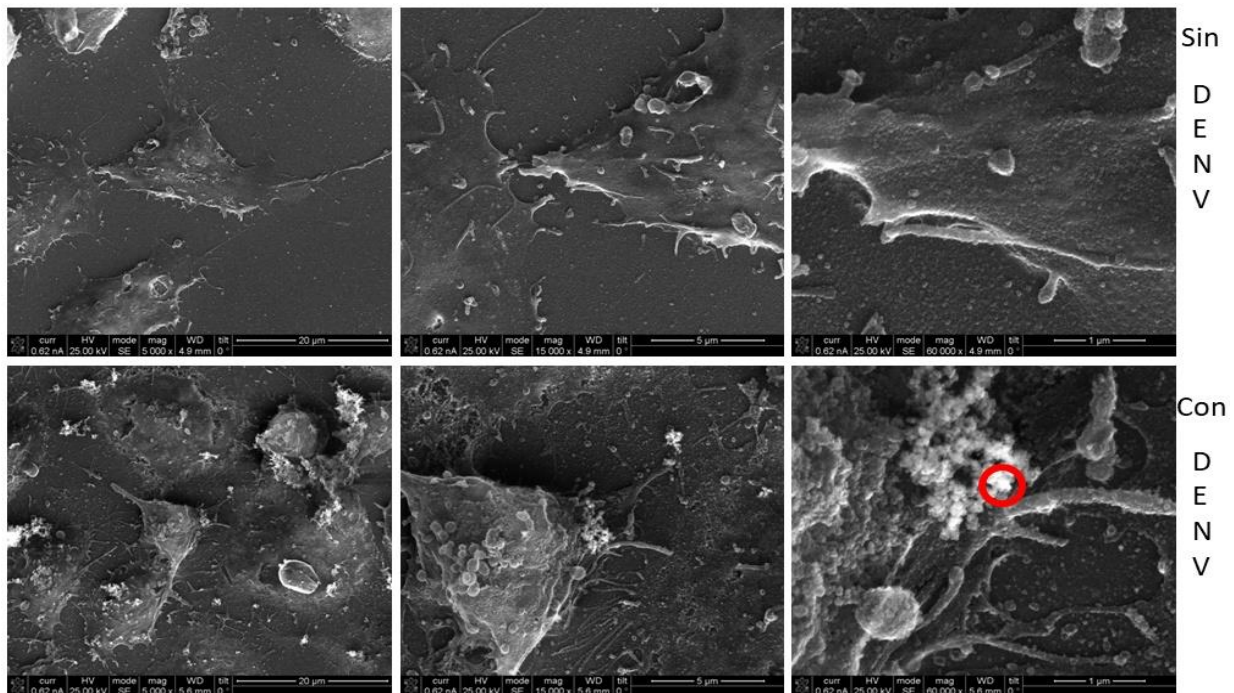


Figura 21. Inmuno SEM en células C6/36 con y sin DENV. Imágenes superiores muestran una células C6/36 sin DENV a 3 diferentes aumentos, imágenes inferiores muestran una célula C6/36 con DENV señalando en un círculo rojo a mayor aumento. Aumentos de 5000X, 15000, y 60000X.

Tabla 7. Espectroscopía de rayos X de energía dispersa en células C6/36

		C	O	Na	Mg	K	Ca	Au
C6/36 con DENV	Promedio	19.43	39.36	4.14	1.44	0.18	4.75	0.03
	DesEst	±5.45	±6.46	±0.63	±0.33	±0.03	±1.75	±0.02
	N	6	6	6	6	6	6	6
C6/36 sin DENV	Promedio	21.38	37.98	3.52	1.40	0.20	4.93	0.00
	DesEst	±3.87	±10.79	±0.77	±0.60	±0.08	±1.53	0.00
	N	6	6	6	6	6	6	6

C, Carbono; O, Oxígeno; Na, Sodio; Mg, Magnesio; K, Potasio, Ca, Calcio; Au, Oro; DesEst; Desviación estándar; N, tamaño de la muestra.

Con la finalidad de complementar los resultados obtenidos mediante inmuno SEM, se realizaron ensayos de microscopía de fuerza atómica, para ello células C6/36 se infectaron con el DENV durante 1 hora a 4°C, se fijaron con paraformaldheido al 4 %, se secaron al punto crítico de CO₂ y se cubrieron con oro, los resultados obtenidos muestran estructuras circulares de tamaños similares al DENV, estas estructuras se observaron solo en células que fueron incubadas con el DENV (Figura 22 panel inferior), mientras que las células sin DENV tienen una superficie celular sin estas estructuras (figura 22 panel superior).

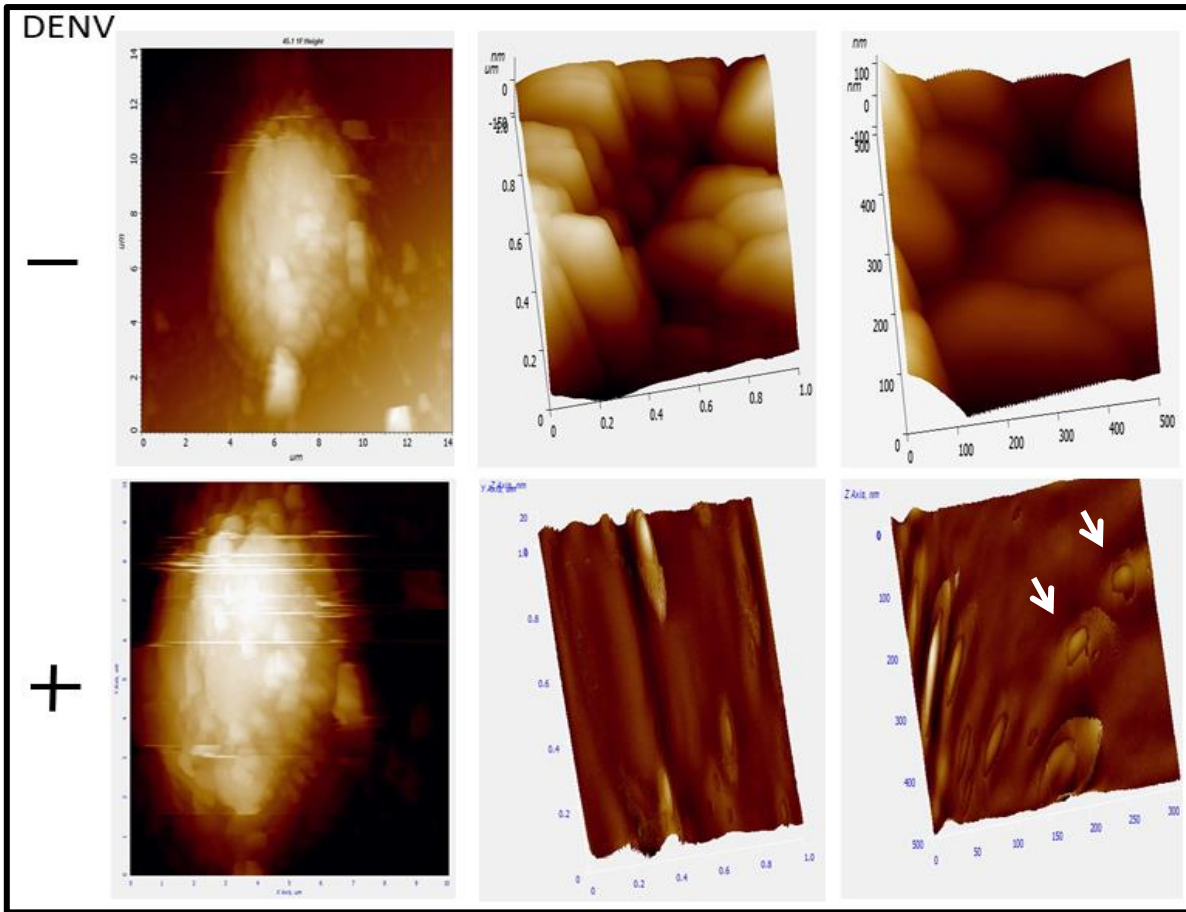


Figura 22. Microscopía de Fuerza Atómica en células C6/36 infectadas con DENV. En panel inferior se observan estructuras circulares señaladas con flechas blancas que corresponden al tamaño del DENV.

4. Discusión

La interacción entre el virus por sus células blanco depende de la interacción entre las proteínas virales y los componentes de la membrana plasmática, (Villanueva et al., 2005) mientras que la susceptibilidad de los tejidos del hospedero al virus depende de la abundancia y distribución de los receptores al virus, por ello el conocimiento de los receptores podría permitir desarrollar fármacos antivirales (Hidari and Suzuki, 2011). Además para virus transmitidos por vectores se podrían generar transgénicos carentes de receptor (mediante la tecnología gene drive) y con ello bloquear la infección viral.

El dengue es una enfermedad causada por el DENV y es transmitido por vectores del género *Aedes* sp., (Mousson et al., 2005; Gubler, 2002; Paupy et al., 2010) y a pesar de la amplia investigación para DENV en células de mosquito que se ha llevado a cabo, no se ha caracterizado el receptor para este virus, sin embargo se han reportado diferentes moléculas como receptores putativos para el DENV y solo 2 de ellas se han identificado (Cruz et al., 2015).

La primer proteína que se identificó como receptor putativo al DENV en células de mosquito fue revelada en un ensayo VOPBA utilizando proteínas de células C6/36, esta proteína de 50 kDa, también fue reconocida por el anticuerpo anti-receptor a laminina de alta afinidad, este anticuerpo inhibió la proliferación de DENV-3 y DENV-4 en células C6/36, pero no inhibe la proliferación de DENV-1 o DENV-2 en estas mismas células (Sakoonwatanyoo et al., 2006).

Posteriormente, la proteína prohibitina fue identificada como un receptor putativo al DENV-2 en células C6/36 y CCL25, la infección por DENV se inhibió al tratar a las células con anticuerpos anti-prohibitina o con RNA de interferencia (siRNA) para el mRNA de prohibitina, sin embargo la inhibición de la infección no fue total (Kuadkitkan et al., 2010), lo que sugiere la participación de otras proteínas que median la unión del DENV.

En nuestro equipo de trabajo se ha identificado previamente mediante ensayos VOPBA, cromatografía de afinidad y espectrometría de masas que la proteína enolasa de intestinos medios de *Ae. aegypti* y células C6/36 se unieron a el Dominio III de la proteína E (EDIII) del DENV-2 y DENV completos de los serotipos -1, -2 y -4 (Muñoz *et al.*, 2013).

Debido a estos resultados nosotros probamos la unión de enolasa a la proteína E, la localización de enolasa en membrana, la inhibición de la infección del DENV utilizando anticuerpos anti-enolasa a nivel de la membrana, la colocalización entre enolasa y la proteína E del DENV-2, la búsqueda *in silico* de los dominios transmembranales de enolasa y el docking molecular entre enolasa y la proteína E del DENV-2. Para estos ensayos fue aislado y amplificado un DENV (muestra

VER/MEXS008A/06) a partir del suero de un paciente diagnosticado con dengue en Veracruz, México en el año 2009, este DENV fue amplificado en células C6/36, al pase 5, se tomó el sobrenadante, se realizó la serotipificación con los oligos D1 como reverse y TS1, TS2, TS3 y TS4 como forward (Figura 5 A, carril 5) y se realizó la secuenciación del fragmento amplificado con los oligos D1 – D2 (Lanciotti et al., 1992) (Figura 5 A, carril 8). Los resultados mostraron en la PCR anidada una banda de alrededor de 119 pb, lo que corresponde a un DENV-2 y la secuencia obtenida con los oligos D1 - D2 fue sometida a un BLAST y el alineamiento muestra identidad del 99% con el DENV-2 Nueva Guinea (figura 5 B), con lo que concluimos que el DENV que se utilizó en este estudio es de serotipo 2, como controles positivos se utilizaron 3 muestras con 3 DENVs independientes, los cuales fueron DENV-1, DENV-2 y DENV-3, estos amplificaron a las secuencias de 482, 119 y 290 pb respectivamente (figura 5 A, carriles 2, 3 y 4) tal y como lo reportó Lanciotti en 1992, el control negativo fue incluido utilizando el RNA de sobrenadante de células C6/36 no infectadas el cual no amplificó productos (figura 5, carril 1).

Ya que teníamos el DENV-2 serotipificado nos preguntamos si la proteína enolasa se une al DENV-2 y para ello se realizó la columna de afinidad donde acoplamos el DENV-2 a Sefarosa 4B y pasamos extractos de proteínas de células C6/36, las proteínas que no se unen a DENV-2 se lavaron con Tris-Cl 0.05 M, NaCl 0.1 M y las proteínas de unión a DENV-2 se eluyeron con glicina pH 2.7, las proteínas eluidas fueron observadas en geles de poliacrilamida (figura 6, panel A, carril 2) y transferidas a nitrocelulosa, y una banda de 47 kDa fue revelada al aplicar anti-enolasa (figura 6, panel B, carril 1), lo que sugiere que hay interacción entre enolasa y el DENV-2.

Con la finalidad de investigar si la unión de enolasa y la proteína E del DENV-2 es a nivel de la membrana de células C6/36 en el inicio de la infección del DENV-2, nosotros probamos la inhibición de la infección mediante el ensayo de bloqueo de la unión del DENV con anticuerpos anti-enolasa aplicados en células C6/36 a 4°C antes de colocar al DENV-2 en estas células, obteniéndose una inhibición

significativa del 32.5 %, con respecto a las células infectadas con DENV sin anticuerpos o infectadas con DENV tratadas con anticuerpos inespecíficos (Figura 7), para corroborar esta inhibición nosotros realizamos ensayos en el cual colocamos anticuerpos anti-enolasa a 4°C durante 1 hora en células C6/36, se retiró el sobrenadante y se incubó el DENV-2 durante 1 hora a 4°C, posteriormente se realizó el conteo de sincitios a las 24 y 48 horas y registramos una disminución significativa del número de sincitios a las 48 horas posinfección en células tratadas con el anti-enolasa con respecto a células sin la aplicación de anticuerpos o con la aplicación de anticuerpos inespecíficos (figura 8, panel B), estos resultados sugieren que la proteína enolasa une al DENV-2 en el inicio de la infección en células C6/36, sin embargo debido a que la inhibición no fue total, tal y como han reportado otros investigadores (Sakoonwatanyoo et al., 2006; Kuadkitkan et al., 2010), nosotros hipotetizamos la existencia de otras proteínas de unión al DENV-2 como receptores a este virus en células de mosquito.

Después de observar la inhibición de la infección del DENV-2 mediante anticuerpos anti-enolasa, nosotros corroboramos que estos anticuerpos no interfieren en la viabilidad de las células C6/36 a las concentraciones probadas en los ensayos de este estudio (figura 9), mediante el conteo de células en cámara de Neubauer teñidas con azul de tripano (Strober, 2001), lo que sugiere que la inhibición de la infección del DENV-2 es por la unión de anticuerpos anti-enolasa a enolasa de la membrana de células C6/36 y no por la toxicidad de los anticuerpos.

Debido a que los resultados anteriores sugieren la localización en membrana de la enolasa nosotros realizamos ensayos para demostrar este hallazgo, mediante inmunofluorescencia, en los cuales marcamos a la proteína enolasa con anticuerpos primarios anti-enolasa, después incubamos con anticuerpos secundarios anti-conejo rodaminados, teñimos los núcleos con DAPI y observamos las células C6/36 en un microscopio confocal, en las imágenes se identificó la localización de enolasa en el núcleo, citoplasma y de manera esperada, en la membrana (figura 10, panel A), lo que apoya la evidencia de que

enolasa es una proteína de unión a la proteína E del DENV-2 en células de mosquito, como control negativo se observaron células C6/36 bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas a las cuales no se les aplicaron anticuerpos anti-enolasa (figura 10, panel B), además para discernir el papel de enolasa en la unión del DENV-2 en la membrana celular realizamos ensayos de colocalización de enolasa con la proteína E del DENV a nivel de la membrana de células C6/36, mediante inmunofluorescencia indirecta logramos observar a la enolasa en la membrana (figura 11, panel A), también se observó de manera específica al DENV-2 en la membrana celular (figura 11, panel B) y la colocalización fue registrada a nivel de la membrana de células C6/36 no permeabilizadas (figura 11, panel C y panel D), este ensayo toma relevancia al destacar que estas células fueron fijadas, no permeabilizadas, después de una hora de interacción con el DENV-2 a 4°C, con este resultado estamos demostrando por primera vez la localización en membrana de enolasa en células de mosquito y que esta interactúa con el DENV-2 en la fase de reconocimiento y unión a las células de mosquito, este resultado abre una gama de oportunidades para generar un mosquito transgénico deficiente en la producción de enolasa que resultará en la disminución de la competencia vectorial y con ello se podrían disminuir los casos de dengue en las regiones endémicas donde ésta enfermedad es un problema de salud pública.

A continuación, nosotros nos preguntamos si enolasa podría tener alguna otra función en el ciclo replicativo del DENV-2, y para poder discernir la localización de enolasa durante de infección por el DENV-2, células C6/36 fueron infectadas con el DENV-2 durante 24 horas, posteriormente se lavaron con PBS, se fijaron, permeabilizaron, se les aplicaron anticuerpos primarios conejo-anti-enolasa y ratón-anti-proteína E, posteriormente se aplicaron anticuerpos anti-conejo rodaminados y anti-ratón fluoresceinados y por último DAPI, las imágenes nos muestran que enolasa y la proteína E del DENV se localizan en la periferia del núcleo en donde hay una colocalización (figura 12, panel C y D) lo que sugiere la participación de enolasa en otra fase de la propagación viral, la cual podría ser la transcripción o replicación, puesto que enolasa se ha asociado al sistema de

transcripción del Sendai virus (Ogino et al., 2001) y a la inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (Kishimoto et al., 2017), sin embargo esto requiere de ensayos dirigidos a este objetivo, lo que destacamos con este hallazgo de enolasa en el compartimento nuclear es la colocalización con la proteína E del DENV-2.

Los resultados de colocalización entre enolasa y la proteína E del DENV-2 en células C6/36 nos permitieron suponer que esta colocalización se podría llevar a cabo en células del midgut de mosquitos *Ae. aegypti* y para corroborar esta hipótesis, se disectaron los midguts de estos mosquitos *Ae. aegypti* de la cepa DS3, posteriormente se infectaron con DENV-2, fijaron, permeabilizaron e incubaron anticuerpos anti-enolasa, anticuerpos anti-E y se tiñeron los núcleos con DAPI, para observarlos en un microscopio confocal, los resultados nos permitieron observar la colocalización de estas 2 proteínas en estos midguts (figura 13, panel C). Estos resultados nos sugieren que enolasa podría unirse a la proteína E del DENV-2 y participar en el ciclo de propagación del DENV-2 en ambas especies de mosquitos.

Con la finalidad de ubicar a enolasa como parte del complejo del reconocimiento del DENV en membrana de células C6/36, se realizó la búsqueda de dominios transmembranales de enolasa, y los 3 programas utilizados nos detectan que enolasa de *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* y *Homo sapiens*, se puede localizar en la membrana celular, ya que se predice al menos un dominio transmembranal en las 3 enolasas (Tabla 5), lo que sugiere que enolasa puede localizarse en la membrana celular y funcionar como un receptor al DENV-2 en las 3 especies mencionadas, sin embargo más estudios enfocados a este supuesto deberán ser realizados.

Para reforzar los resultados de esta interacción entre enolasa y la proteína E del DENV-2 nosotros utilizamos otra herramienta con gran valor en la predicción de interacción de proteínas la cual es el docking molecular, para ello nosotros modelamos la proteína enolasa de *Ae. albopictus* utilizando I-TASSER y la utilizamos para conocer si puede haber interacción con la proteína E del DENV-2

el docking se realizó con el programa PatchDock, el cual fue refinado con FireDock, este programa nos mostró que enolasa y la proteína E podrían interactuar favorablemente, ya que la ΔG es -25.14, además de que la unión de enolasa es al DIII de la proteína E del DENV (figura 14, panel A), lo que sugiere que podría interactuar enolasa en el reconocimiento del DENV.

Los resultados anteriormente mencionados nos permiten sugerir que enolasa es una proteína receptor para el DENV-2, sin embargo se han reportado 3 diferentes isoformas para esta proteína en *Aedes sp*, por ello nosotros probamos 3 diferentes anticuerpos anti-enolasa, los cuales son comerciales y se producen a partir de secuencias de Eno-alfa, Eno-beta y Eno-gamma de *H. sapiens*, los ensayos de expresión mediante inmunoblot, en extractos de proteínas de células C6/36 o de midguts de 3 cepas de mosquitos *Ae. aegypti*, nos revelaron una banda de 47 kDa al aplicar el anti-Enolasa alfa (figura 15, panel A), además también se detectaron dos bandas una de 47 kDa y otra banda de 25 kDa en extractos proteicos de células C6/36 y una banda de 25 kDa en los 3 extractos de las 3 cepas de mosquitos *Ae aegypti*, al aplicar anticuerpos anti-Enolasa gamma (figura 15, panel B), mientras que para el inmunoblot aplicando anticuerpos anti-Enolasa beta, solo se detectó una banda en extractos de proteínas C6/36 (figura 15, panel C), estos resultados nos sugieren que existen diferentes isoformas de enolasa en *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*.

Con la finalidad de observar esta expresión de las 3 isoformas de enolasa en midguts de mosquitos *Ae. aegypti* evaluamos la expresión de estas isoformas mediante ensayos de inmunofluorescencia, en los cuales se observó la expresión de las 3 isoformas en midguts de la cepa DS3 (figura 16), DMEB (figura 17) e IBO (figura 18) de *Ae. aegypti*. Estos resultados nos sugieren la expresión de estas 3 isoformas en los midguts de las 3 cepas.

Debido a que los anticuerpos anti-enolasa gamma revelaron una banda de 25 kDa en las 3 cepas de los mosquitos *Ae. aegypti* y en la línea celular C6/36 (figura 15, panel B), nos preguntamos si estos anticuerpos anti-enolasa gamma estaban reconociendo a una isoforma más pequeña de enolasa u a otras proteínas. Por

ello se realizó una columna de afinidad acoplado el anti-enolasa gamma a Sefarosa 4B (figura 19), las proteínas de unión específica se corrieron en un gel de poliacrilamida y se tiñeron con nitrato de plata (figura 20, carril 2), estas proteínas se cortaron del gel y se sometieron a identificación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/ESI/MS), los resultados obtenidos nos muestran 15 diferentes proteínas de las cuales se obtuvieron al menos 2 peptidos para cada proteína (Tabla 6).

De las 15 proteínas, una de ellas fue enolasa (como se esperaba) y 14 fueron proteínas que podrían estar unidas a enolasa y por ello se detectaron en el ensayo de espectrometría, tal es el caso de las proteínas actina y tubulina que se han reportado formar complejos con enolasa, con lo que se podría asociar a dar estructura al citoesqueleto o utilizar a estas proteínas para localizarse en la membrana celular (Walsh et al., 1989; Diaz et al., 2012; Jitoboam et al., 2016), otra proteína que se ha reportado de unión a enolasa es Gliceraldheido 3 fosfato deshidrogenasa esta unión promueve la regulación de la actividad de canales de potasio en célula epiteliales de riñon (Renigunta et al., 2011), entre los resultados encontramos a la proteína Nucleosido difosfatos Cinasa-Like, las cuales comparten homología en la región de reconocimiento del anticuerpo anti-enolasa gamma, esto fue algo inesperado, ya que el anticuerpo debería de ser específico para solo la proteína de interés, estos hallazgos dan respuesta a por que se observa una banda más pequeña en el inmunoblot (Figura 15, panel B).

La caracterización del proceso de unión del DENV-2 a células de mosquito es escasa y para aportar información acerca de este proceso, nos dimos a la tarea de conocer que elementos químicos presentes en esta unión, para ello preparamos células C6/36 no incubadas o incubadas con DENV durante una hora a 4°C, fijadas, bloqueadas y con aplicación de anticuerpos anti-proteína E del DENV (4G2), anticuerpos anti-ratón con oro coloidal de 10 nanometros para microscopía electrónica de barrido, las imágenes nos muestran que el oro se observan solo en células incubadas con DENV-2 (figura 21, círculo rojo, panel inferior) por lo que el microanálisis se realizó en sitios similares a este y los resultados de los elementos

no muestran diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7), cabe destacar que solo la presencia de oro fue detectada en las células incubadas con DENV-2 (Tabla 7), entonces con este ensayo podemos sugerir que la presencia y abundancia de elementos no se modifica por la unión del DENV-2 a células de mosquito, sin embargo es importante considerar que debido a que el ensayo se realizó a 4°C, esto pudo haber disminuido el flujo de iones, ya que el metabolismo celular disminuye a 4°C, lo que significó una subestimación de los resultados, por ello la propuesta es realizar la incubación del DENV-2 a 28 °C y realizar el microanálisis.

Por último con la finalidad de apoyar la observación de las partículas virales en la membrana celular (figura 21), se realizó la observación mediante microscopía de fuerza atómica de células C6/36 incubadas y no incubadas con DENV durante una hora a 4°C, fijadas, secadas al punto crítico de CO₂ y teñidas con oro de 10 nanómetros, las imágenes nos muestran solo en células incubadas con DENV-2 partículas circulares de tamaño similar al DENV-2 en membrana celular, lo que sugiere la presencia de DENV-2 (figura 22, panel inferior).

Conclusión

Enolasa de *Ae. albopictus* es una proteína de 47 kDa, que se puede localizar en la membrana, citoplasma y núcleo de células C6/36, esta proteína puede unirse a partículas completas de DENV y al ser bloqueada mediante anticuerpos específicos a nivel de membrana se puede inhibir la propagación del DENV, además colocaliza en membrana con la proteína E del DENV, por ello nosotros proponemos que esta proteína forma parte del complejo de reconocimiento y unión al DENV en células C6/36.

Referencias

Aaronson R. M, Graven K. K, Tucci M, McDonald R. J, and Farber H. W. (1995). Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *Journal of Biological Chemistry*; 270(46). 27752–27757.

Acosta E. G, Castilla V, and Damonte B. E. (2008). Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin mediated endocytosis. *Journal of General Virology*; 89: 474–484.

Acosta E. G, Piccini L. E, Talarico L. B, Castilla V, and Damonte B. E. (2014). Changes in antiviral susceptibility to entry inhibitors and endocytic uptake of dengue-2 virus serially passaged in Vero or C6/36 cells. *Virus Res*; 184: 39–43.

Adiraj L. M, Oza G, Velumani S, Maldonado A, Romero J, Muñoz M. de L, Sridharan M, Asomoza R, and Yi J. (2014). Scanning fluorescence-based ultrasensitive detection of dengue viral DNA on ZnO thin films. *Sensors and Actuators B Chemical*; 202: 1338–1348.

Amin, P., Acicbe, Ö., Hidalgo, J., Jiménez, J.I.S., Baker, T., Richards, G.A., 2018. Dengue fever: Report from the task force on tropical diseases by the World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. *J Crit Care*, 43, 346-351. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2017.11003>

Andrusier, N., Nussinov, R., Wolfson H. J. (2007). FireDock: Fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins*, 69(1): 139-159. <https://doi.org/10.1002/prot.21495>

Aoki C, Hidari KI, Itonori S, Yamada A, Takahashi N, Kasama T, Hasafe F, Alimul I.M, Hatano K, Matsouka K, Taki T, Chao-Tan G, Takahashi T, Sakano, Suzuki T, Miyamoto D, Sugita M, Terunuma D, Morita K, and Suzuki Y. (2006). Identification

and characterization of carbohydrate molecules in mammalian cells recognized by dengue virus type 2. *J Biochem* 2006;139:607–14

Avilán L, Gualdron L. M, Quiñones W, Gonzalez G. L, Hannaer, V, Michels M. P, and Concepción J. L. (2011). Enolase: A key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites—perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme research*: 14. doi:10.4061/2011/932549.

Barniol J, Gaczkowski R, Barbato V. E, da Cunha R. V., et al. (2011). Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multicentre study in 18 countries. *BMC Infectious Diseases*; 11:106

Bates M. (1970). *The natural history of mosquitoes*. Gloucester, Mass. USA: 378.

Benarroch D, Selisko B, Locatelli A. G, Maga G, Romette J. L, Canard B. (2004). The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein 1NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology*. 328; 2: 208-218.

Benenson A. S. (1992). *El control de las enfermedades transmisibles en el hombre*. Publicación Científica No. 538, Organización Panamericana de Salud: xxiii, xxviii-xxxiii, 82-88, 157-161, 176, 212-217.

Benenson A. S. (1997). *Manual para el control de las enfermedades transmisibles*. Decimosexta edición. Publicación Científica No. 564, Organización Panamericana de la Salud: xxiv – xxvii, 508.

Bennett K. E, Beaty B. J, Black W. C. 4th. (2005). Selection of D2S3, an *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to Dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to Dengue 2 escape. *J Med Entomol*: 42(2):110-119.

Bhatt S, Gething P. W, Brady O. J, Messina J. P, Farlow A. W, Moyes C. L, Drake J. M, Brownstein J. S, Hoen A. G, Sankoh O, Myers M. F, George D. B, Jaenisch T, Wint G. R. W, Simmons C. P, Scott T. W, Farrar J. J, and Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*; 496: 504-507.

Black W. C, Bennett K. E, Gorrochotegui E. N, Barillas M. C.V, Fernandez S. I, Muñoz M. D, Farfan A. J. A, Olson K. E, Beaty B. J. (2002). Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research* 33: 379-388.

Blacksell S.D. (2012). Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: recent evaluations and future needs? *J Biomed Biotechnol*: 151967.

Bosio C. F, Beaty B. J, Black W. C. 4th. (1998). Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Ae aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*; 59(6): 965-970.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brady O. J, Gething P. W, Bhatt S, Messina J. P, Brownstein J. S, Hoen A. G, Moyes C. L, Farlow A. W, Scott T. W, Hay S. I. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl Trop Dis* 6(8): e1760.

Bryer S. C., Koh T. J. (2007). The urokinase-type plasminogen activator receptor is not required for skeletal muscle inflammation or regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 293(3): R1152-8.

Caicedo, P. A., Serrato, I. M., Sim, S., Dimopoulos, G., Coatsworth, H., Lowenberger, C., Ocampo, C. B. (2018). Immune response-related genes

associated to blocking midgut dengue virus infection in *Aedes aegypti* strains that differ in susceptibility. *Insect Science*. doi:10.1111/1744-7917.12573

Cao L.V.M. (2009). Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virology*; 6: 35.

Cervantes S. M, Angel A. A H, Soto A. R, Bautista C. P, Hurtado M. A. M, Alcaraz E. S. Ludert J. E. and Del Angel R. M. (2015). Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. *Virology*; 484: 113-126.

Chen W.J, Wei H.L, Hsu E.L, Chen E.R. (1993). Vector competence of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to dengue 1 virus on Taiwan: development of the virus in orally and parentally infected mosquitoes. *J Med Entomol* 30: 524–530.

Chen X. G., Jiang X., Gu J., et al. Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jan 26;113(4):E489]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112 (44):E5907-E5915. doi:10.1073/pnas.1516410112

Chen Y, Maguire T, Hileman R. E, Fromm J. R, Esko J. D, Linhardt R. J, Marks R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*; 3: 866–71.

Chen Y. C, Wang S. Y, King C. C. (1999). Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14 dependent mechanism. *J Virol*; 73: 2650–7.

Chien C. L., Yh-Hsiung H, Pei Y. S, Ho S. W, Yee S. L, Trai M. Y, Hsiao S. L, Ching C. L, and Huan Y. L. (2010). Characteristic of Dengue Disease in Taiwan: 2002–2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 82:(4) 731–739.

Chung K. Y, Dong H, Chao At, Shi P. Y, Lescar J, Lim S. P.(2010). Higher catalytic efficiency of N-7-methylation is responsible for processive N-7 and 2'-O methyltransferase activity in dengue virus. *Virology* 402 (1). 52-60.

Coon K. L., Vogel K. J., Brown M. R., Strand M. R. (2014). Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol Ecol*; 23(11):2727-39. doi: 10.1111/mec.12771

Cruz O. C., Freire M. J, Conceicao M. T, Higa M. L, Castanho A. R. B. M, and Da Poian.T. A. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS. Microbiology Reviews*; 39: 155–170

De Alwis R, Williams K. L, Schmid M. A, Lai C. Y, Patel B, Smith S. A, Crowe J. E, Wang W. K, and Harris E, de Silva A. M. (2014). Dengue viruses are enhanced by distinct populations of serotype cross-reactive antibodies in human immune sera. *PLoS Pathog*; 10:10: e1004386.

Díaz B. A., Muñoz M. de L, Perez R. G, Altuzar V, Burgueño J, Mendoza A. J. G, Martínez M. J. P, Cisneros A, Navarrete E. J, Sanchez S. F, (2014). A DNA microarray-base assay to detect dual infection with two dengue virus serotypes. *Sensors*, 14(5): 7580-7601.

Díaz R. A, Roig B. A, García M. A, López R. A. (2012). α -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2012/156795.

Didiasova, M., Schaefer, L., Wygrecka M. (2019). When Place Matters: Shuttling of Enolase-1 Across Cellular Compartments. *Front. Cell Dev. Biol.* 7:61. doi: 10.3389/fcell.2019.00061

Dobson, L., Reményi, I., Tusnády, G.E. (2015). CCTOP: A Consensus Constrained TOPology prediction web server. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W408–W412. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv451>

Duhovny, D., Nussinov, R., Wolfson, H. J. (2002). Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules, 185–200. https://doi.org/10.1007/3-540-45784-4_14

Duong T. H, Vu T. T, Hanh T. N, Tran N. B. C, Huynh L. A, Wills B. A, Simmons C. P. (2011). Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *J Virol Methods* 177: 168–173.

Dwivedi V. D., Tripathi I. P., Tripathi R. C., Bharadwaj S., Mishra S. K. (2017). Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. *Briefings in Functional Genomics*, 16(4), 2017, 217–227

Enahoro, A. I., Gumel, A.B., 2018. Mathematical assessment of the role of Dengvaxia vaccine on the transmission dynamics of dengue serotypes. *Mathematical biosciences*, 304, 25-47 <http://doi.org/10.1016/j.mbs.2018.07.003>

Eriksson B, Oberg K, and Stridsberg M, (2000). Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion*; (62), supplement 1: 33–38.

Estallo E. L, Ludueña A. F. F, Introini M. V, Zaidenberg M, Almirón W. R. (2015) Weather variability associated with *Aedes (stegomyia) aegypti* (dengue vector)

oviposition dynamics in northwestern Argentina. Plos One; 10 (5) doi: 10.1371/journal.pone.0127820.

Feo S, Antona V, Barberi G, Passantino W. R, Cali L, and Giallongo A. (1995). Transcription of the human beta enolase gene (ENO-3) is regulated by an intronic muscle-specific enhancer that binds myocyte-specific enhancer factor 2 proteins and ubiquitous G-rich-box binding factors Mol Cell Biol; 15(11): 5991–6002.

Feo S, Arcuri D, Piddini E, Passantino R, and Giallongo A. (2000). ENO1 gene product bind to the c-myc promoter and act as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). FEBS Letters; 473 (1): 47–52.

Fic, E., Kedracka, K.S., Jankowska, U., Pirog, A., Dziejzicka, W.M. (2010). Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. Electrophoresis., 31: 3573-9.
<https://doi.org/10.1002/elps.201000197>

Flipse J, and Smit J. M. (2015). The Complexity of a Dengue Vaccine: A Review of the Human Antibody Response. PLOS Neglected tropical diseases. 9 (6): e0003749. doi:10.1371/journal.pntd.0003749

Fontan P. A, Pancholi V, Nociari M. M, and Fischetti V. A. (2000). Antibodies to streptococcal surface enolase react with human α -enolase: implications in poststreptococcal sequelae. Journal of Infectious Diseases; 182 (6): 1712–1721.

Freire J. M, Veiga A S, Conceicao T.M, et al. (2013). Intracellular nucleic acid delivery by the supercharged dengue virus capsid protein. PLoS One; 8: e8145.

Fukushima, K., Takahashi, T., Takaguchi, M., Ito, S., Suzuki, C., Agarikuchi, T., Kurebayashi, Y., Minami, A., Suzuki, T. (2019). A I131V Substitution in the Fusion

Glycoprotein of Human Parainfluenza Virus Type 1 Enhances Syncytium Formation and Virus Growth. *Biol. Pharm. Bull.* 42(5): 827–832

Gao F, Duan X, Lu X, Lui Y, Zheng L, Ding Z, and Li J. (2010). Novel binding between pre-membrane protein and claudin-1 is required for efficient dengue virus entry. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 952–7.

Gamble S.C., Chotai D., Odontiadis M., Dart D.A., Brooke G.N., Powell S.M., Reebye V., Varela-Carver A., Kawano Y., Waxman J., Bevan C.L. (2007) Prohibitin, a protein downregulated by androgens, represses androgen receptor activity. *Oncogene* 26:1757-1768

Gardella, G. C. E., Perez, R.G., Navarrete, E.J., Cisneros, A., Jimenez, R. F., Ramírez, P. L. R., Rosado, L. R., Camacho, N. M., Munoz, M. de L. (2008). Specific genetic markers for detecting subtypes of dengue virus serotype-2 in isolates from the states of Oaxaca and Veracruz, Mexico. *BMC Microbiol.* 8 (117). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-117>.

Gómez D, and Rodríguez M. H. (1994). Paludismo y Dengue: de la erradicación a las zonas de riesgo. *Cuadernos de Salud. Secretaría de Salud, México:* 10, 55.
Grove J, and Marsh M. (2011). The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol;* 195: 1071–82.100-3.

Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 480–496.

Gubler D. J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problema in the 21st century. *Trends Microbiol;* 10(2):100-3. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02288-0.

Halstead S. B, and O’rourke. (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *The Journal of experimental medicine*; 146; 201-17

Halstead, S. B. (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239, 476 – 481.

Hardy J. L. (1988). Susceptibility and resistance of vector mosquitoes, volume II, p. 87–126 in: Monath T. P. (ed.), *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, CRC Press, Boca Raton, FL.

Harris A. F, Nimmo D, McKemey A. R, et al. (2011). Field performance of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol*; 29: 1034–37.

Heaton S. N, & Randall G. (2011). Dengue Virus and Autophagy *Viruses*; 3, 1332-1341.

Hidari K. I, and Suzuki T. (2011). Dengue virus receptor. *Trop Med Health*; 39: 37–43.

Higa L. M, Caruso M.B, Canellas F, Soares M. R, Oliveira C. A. L, Chapeurouge D. A, Almeida, P. M, Perales J, Zingali R. B, Da Poian, A. T. (2008). Secretome of HepG2 cells infected with dengue virus: implications for pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*; 1784(11): 1607–1616.

Higa L. M, Curi B. M, Aguiar R. S, Cardoso C. C, De Lorenzi A. G, Silvia L. F, Sena L. F. S, Zingali R. B, Da Poian T. A. (2014) Modulation of α -Enolase Post-Translational Modifications by Dengue Virus: Increased Secretion of the Basic Isoforms in Infected Hepatic Cells. *PLoS ONE* 9(8): 88314-88314.

Hoffmann A. A, Montgomery B. L, Popovici J, et al. (2011). Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*; 476: 454–57.

Hofmann, K., Stoffel, W. (1993). TMbase: A Database of Membrane Spanning Protein Segments. *Biological Chemistry*, 374, 166.
<https://doi.org/10.1515/bchm3.1993.374.1-6.143>

Huerta, V., Chinea, G., Fleitas, N., Sarría, M., Sánchez, J., Toledo, P., Padrón, G. (2008). Characterization of the interaction of domain III of the envelope protein of dengue virus with putative receptors from CHO cells. *Virus Research*, 137(2), 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.022>

Hung J. J, Hsieh M. T, Young M. J, Kao C. L, King C. C, and Chang W. (2004). An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol*; 78: 378–88.

Hunter G. W, Frye W. W, and Swartzwelder J. C. (1973). *Manual de Medicina Tropical*. 3a. edición, La Prensa Médica Mexicana, México: 790.

Ibáñez B. S, and Martínez C. C, (1994). *Aedes aegypti* in México. *Am Mosq Control Assoc*; 10 (2): 231-232.

Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith D. R. (2004). Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol*; 149: 915–27.

Jindadamrongwech S, and Smith D. R. (2004). Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) reveals serotype specific heterogeneity of dengue virus binding proteins on HepG2 human liver cells. *Intervirology*; 47: 370–3.

Jitoboam K., Phaonakrop N., Libsittikul S., Thepparit C., Roytrakul S., Smith D. R. (2016). Actin Interacts with Dengue Virus 2 and 4 Envelope Proteins. PLoS ONE 11(3): e0151951. doi:10.1371/journal.pone.0151951
Journal of clinical microbiology 38(8): p. 3055–3060

Johnstone S. A, Waisman D. M, and Rattner J. B. (1992). Enolase is present at the centrosome of HeLa cells, Experimental Cell Research; 202 (2): 458–463.

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. (1994). A Model Recognition Approach to the Prediction of All-Helical Membrane Protein Structure and Topology. Biochemistry, 33(10), 3038–3049. <https://doi.org/10.1021/bi00176a037>

Joy T. K, Gutierrez E. H, Ernst K, Walker K. R, Carriere Y, Torabi M, Riehle M. A. (2012). Aging field collected *Aedes aegypti* to determine their capacity for dengue transmission in the Southwestern United States. PLoS ONE 7: e26026.

Kamgang, B., Vazeille, M., Tedjou, A. N., Wilson, B. T. A., Yougang, A. P., Mousson, L., Wondji, C. S., Failloux, A. B. (2019). Risk of dengue in Central Africa: Vector competence studies with *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations and dengue 2 virus. PLoS Negl Trop Dis. 30; 13(12):e0007985. doi: 10.1371/journal.pntd.0007985.

Kato K, Okagawa Y, Suzuki F, Shimizu A, Mokuno K, and Takahashi Y. (1983). Immunoassay of human muscle enolase subunit in serum: a novel marker antigen for muscle diseases. Clinica Chimica Acta; 131 (1); 75–85.

Khakpoor A, Panyasrivani M, Wikan N, Smith D.R. (2009) A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. *J. Gen. Virol*; 90;1093-1103.

Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* 358, 929–932.

Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* 358, 929–932.

Kettle D. S. (1993). *Medical and Veterinary Entomology*. Cab International. UK: 125-131, 451-471

Kim Y. M, Gayen S, Kang C, Joy J, Huang Q, Chen A. S, Wee J. L, Ang M. J, Lim H. A, Hung A. W, Li R, Noble C. G, Lee le T, Yip A, Wang Q. Y, Chia S. C, Hill J, Shi P. Y, and Keller P. Y. (2013). NMR analysis of a novel enzymatically active unlinked dengue NS2B– 385 NS3 protease complex, *J. Biol. Chem*; 288: 12891–12900.

Kishimoto, N., Iga, N., Yamamoto, K., Takamune, N., Misumi, S. (2017). Virion-incorporated alpha-enolase suppresses the early stage of HIV-1 reverse transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(2), 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.096>

Kuadkitkan A, Wikan N, Fongsaran C, Smith D. R. (2010). Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology*; 406 (1): 149-61..

Kuno G, Gómez I, Gubler D.J, (1991). An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections . *J Virol Methods*; 33: 101 – 13.

Kuno, G., Gubler, D.J., Vélez, M., Oliver, A. (1985). Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bulletin of the World Health Organization*. 63 (2): 279-286.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., & Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 30(3), 545–551.

Lee H. L and Rohani A. (2005). Transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia. *Dengue Bulletin*; 29: 106-11.

Lida H, and Yahara I (1985). Yeast heat-shock protein of M_r 48, 000 is an isoprotein of enolase. *Nature*; 315: 688-90.

Lum L. C, Syed S. F. O, Sri La Sri P. S, and Tan T. H. (2015). Cohorting dengue patients improves the quality of care and clinical outcome. *Plos Negl Trop Dis*; 9(6).

Ma L, Jones C. T, Groesch T. D, Kuhn R. J, and post C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *P Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3414–9.

Marangos P. J, Parma A. M, and Goodwin F. K. (1978). Functional properties of neuronal and glial isoenzymes of brain enolase," *Journal of Neurochemistry*; 31 (3); 727–732.

Markoff J, Innis L, and Houghton R. (1994). Development of cross reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J Infect Dis*; 164: 229-30.

Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, Wu S. J, Putvatana R, Murphy G, Tassaneetrithep B, Burgess T, Birx D, Haves C, Schlesinger F. S, Mascola. (2001). Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Invest Derm Symp P*; 6: 219–24.

Mashiach, E., Schneidman, D.D., Andrusier, N., Wolfson, H.J. (2008). FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W229-32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn186>

Martínez B. J. J, and del Angel R. M (2001). Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J Virol*; 75: 7818–27.

Martínez F. C. (1987). *Los Mosquitos de México (Diptera: Culicidae) Taxonomía, Distribución Geográfica y su importancia en Salud Pública*. Tesis UNAM Facultad de Ciencias: 198.

Martínez T. E. (2008). Dengue. *Estudios avanzados*; 22 (64): 33-52.

Mathur R. L, Reddy M. C, Yee S, Imbesi R, GrothVasselli B, and Farnsworth P. N. (1992). Investigation of lens glycolytic enzymes: species distribution and interaction with supramolecular order, *Experimental Eye Research*; 54 (2): 253–260.

Meertens L, Carnec X, Lecoin M. P, Ramdasi R, Guivel B. F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, and Amara A. (2012) The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe*; 12: 544–57.

Mercado C. R. F, Esquinca A. H. A, Tovar R, Badillo D. A, Camacho M. N, and Muñoz M. de L. (2006). The four serotypes of dengue recognize the same putative receptor sin *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol*; 6: 85-94.

Mercado C. R. F, Black W. C. IV, Muñoz M. de L. (2008). Dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. BMC Microbiol; 8: 118.

McAllister J. C, Godsey M. S and Scott M. L. (2012). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Port-au-Prince, Haiti. J. Vector Ecol; 37(2): 325-32.

McLean J. E, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. (2011). Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. J Biol Chem; 286: 22147–22159.

Miles L. A, Dahlberg C. M, Plescia J, Felez J, Kato K, and Plow E. F. (1991). Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cell: identification of alfa-enolase as a candidate plasminogen receptor. Biochemistry; 30(6)1682– 1691.

Miller S, Kastner S, Krijnse L. J, Buhler S, Bartenschlager R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. J Biol Chem; 282: 8873–8882.

Miller J. L, de Wet B. J, Martinez P. L, Radcliffe M. C, Dwek A. R, Rudd M. P, and Gordon S. (2008). The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. PLoS Pathog; 4:e17.

Méndez G. J. F, Rivas M. L, Nájera M. R, Inette M. G, Canto S. B, Sabido A. F. (1996). Proyecto de prevención y control del dengue 1995 – 1996. Secretaría de Salud. Taller sobre avances recientes en el control de *Ae. aegypti* basado en la comunidad: México y Honduras. Mérida. 22–24 de agosto de 1996: 32 – 81.

Mendoza Y. M, Salas B. J. S, Lanz M. H, Hernández M. S, and del Angel R. M. (2002). A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein. Am J Trop Med Hyg; 67: 76–84.

Modis Y, Ogata S, Clements D, and Harrison S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion, *Nature*; 427: 313-319.

Modis Y, Ogata S, Clements D, and Harrison S. C. (2005). Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol*; 79:1223–31.

Mondotte J. A, Lozach P. Y, Amara A, Gamarnik V. A. (2007). Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J Virol*; 81: 7136–48.

Montesano C. R & Ruiz M. C. (1995). Vigilancia epidemiológica del dengue en México. *Salud Pública de México*, (37), S64-S76

Moore M, Sylla M, Goss L, Burugu M.W., Sang R, Kamau, LW, Kenya EU, Bosio C, Munoz ML, Sharakova M, and Black WC. (2013). Dual African origins of global *Aedes aegypti* s.l. populations revealed by mitochondrial DNA. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4): e2175. ISSN: 1935-2735.

Moreno A. M. M, Sánchez G. F. J, and Muñoz M. L. (2002). Non Fc receptor-mediated infection of macrophages by dengue virus serotype 2. *J. gen virol*; 83 (5): 1123-30.

Mousson L, Dauga C, Garrigues T, Schaffner F, Vazeille M, and Failloux A. B. (2005). Phylogeography of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet. Res., Camb*; 86: 1–11.

Muñoz J. J. L, Laurent R. M, Ashour J, Martinez S. L, Ashok M, Lipkin W. I, Garcia S. A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol*; 79: 8004–8013.

Muñoz M. L, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R, and Ortega A. (1998). Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol Lett*; 168: 251–258.

Muñoz M. L, Limon-Camacho G, Tovar R, Badillo A. D, Mezdoza H. G, and Black IV W. C. (2013). Proteomic identification of dengue virus binding proteins in *Aedes aegypti* mosquitoes and *Aedes albopictus* cells. *Biomed Res Int*; 2013: 875-958.

Murphy B. R, Whitehead S. S. (2011). Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol*; 29: 587– 619.

Naik N. G, and Wu H. N. (2015). Mutation of Putative N-Glycosylation Sites on Dengue Virus NS4B Decreases RNA Replication. *J Virol*; 89(13): 6746-60.

Narro R. J. and Gómez D, H, (1995). El dengue en México: un problema prioritario de salud pública. *Salud Pública Mex*; 37: 12-20.

Navarro S. E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier J. L, Arenzana S. F, and Desprè P. (2003). Dendritic-cell specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell derived dengue viruses. *EMBO Rep*; 4: 723–728.

Nelson M. J. (1986). *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. REF: PNSP/86-93. Washington, D.C: 50.

Nijtmans G. J. L, Jong L, Artal S. M, Coates J. P, Berden J. A, Back W.J. Muijsers O. A, Spek H and Grivell A. L. (2000). Prohibitins act as a membrane-bound

chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J*; 19(11): 2444-2451.

Novelo, M., Hall, M. D., Pak, D., Young, P. R., Holmes, E. C., McGraw, E. A. (2019). Intra-host growth kinetics of dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 15(12): e1008218. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008218>

Ogino, T., Yamadera, T., Mizumoto, K., Ogino, T., Nonaka, T., Imajoh, O.S. (2001). Enolase, a cellular glycolytic enzyme, is required for efficient transcription of Sendai virus genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), 447–455. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5160>

Oldstone M. B. A. (2002). *Virus, pestes e historia*. Fondo de Cultura Económica. México: 67 – 101.

Padmanabhan R, Muller H, Reicher E, Yon C, Teramoto T, Kono Y, Takhampunya R, Ubol S, Pattabiraman N, Falgout B, Ganesh V. K, and Murthy K. (2006). Multiple enzyme activities of flavivirus proteins. *Novartis Found. Symp*; 277: 74-84.

Pancholi V. (2001). Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 58 (7): 902– 920.

Panyasrivanit M, and Khakpoor A, Wikan N, Smith D. R. (2009). Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *J. Gen. Virol*; 90, 448-456.

Paupy, C., Ollomo, B., Kamgang, B., Moutailler, S., Rousset, D., Demanou, M., Simard, F. (2010). Comparative Role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the Emergence of Dengue and Chikungunya in Central Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(3), 259–266. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0005>

Piast M, Kustrzeba W, Matusiewicz M, and Banas T. (2005). "Molecular evolution of enolase," *Acta Biochimica Polonica*; 52 (2): 507–513.

Pierson T. C, and Kielian M. (2013) Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin Virol*; 3:3–12.

Pratt H. D, and Moore C. G. (1993). Mosquitoes of public health importance and their control. U.S. Department of Health & Human Services. CDC. 12/93:6R 85 pp

Ramos-Castaneda J, Imbert J. L, Barron B. L, Ramos C. (1997). A 65-kDa trypsin sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *J Neurovirol* 1997;3:435–40.

Renigunta A., Mutig K., Rottermann K., Schlichthörl G., Müller R., Daut J., Waldegger S., & Renigunta V. (2011). The Glycolytic Enzymes Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase and Enolase Interact with the Renal Epithelial K⁺ Channel ROMK2 and Regulate its Function. *Cell Physiol Biochem*; 28: 663-672

Reyes-del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, and, del Angel R. M. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol*;79:4557–67.

Reyes-del Valle J, and del Angel R. M. (2004). Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant E protein ligand. *J Virol Methods*;116: 95–102.

Rosen L, Shroyer D. A, Tesh R.B., Freier J. E, and ien J. C. (1983). Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am. J. trop. Med. Hyg*; 32 (5): 1108-19.

Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>

Sakoonwatanyoo P, Boonsanay V, Smith D. R. (2006). Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein. *Intervirology*; 49: 161-72.

Salas-Benito J. S, and del Angel R. M. (1997) Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J Virol*; 71: 7246–52.

Salazar M. I, Richardson J. H, Sánchez V. I, Olson K. E, Beaty B. J. (2007). Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol*; 7: 9.

Schneidman, D.D., Inbar, Y., Nussinov, R., Wolfson, H. J. (2005). PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), 363–367. <https://doi.org/10.1093/nar/gki481>

Sawhney, S., Hood, K., Shaw, A., Braithwaite, A.W., Stubbs, R., Hung, N.A., Slatter, T.L. (2015). Alpha-enolase is upregulated on the cell surface and responds to plasminogen activation in mice expressing a $\Delta 133p53\alpha$ mimic. *PLoS ONE*, 10(2), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116270>

Secretaria de salud. (1993). Monografía sobre la epidemiología del dengue.

Dirección General de Epidemiología. México: 59.

Secretaria de salud (2020). <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2020>

Simmons C. P, Farrar J. J, van Vinh Chau N and Wills, B. (2012). Dengue. *N. Engl. J. Med*; 366, 1423–1432.

Stephen, J.T. (2014). Developing a dengue vaccine: progress and future Challenges. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1323, 140-159.
<http://doi.org/10.1111/nyas.12413>

Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology* / Edited by John E. Coligan ... [et Al.], Appendix 3, Appendix 3B.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>

Suelves M, Vidal B, Serrano A. L, Tjwa M, Roma J, López-Aleman R, Luttun A, de Lagrán M. M, Díaz R. A, Jardí M, Roig M, Dierssen M, Dewerchin M, Carmeliet P, Muñoz C. P. (2007). uPA deficiency exacerbates muscular dystrophy in MDX mice," *Journal of Cell Biology*, vol. 178, no. 6, pp. 1039–1051

Tajima S, Takasaki T, Kurane I.(2011). Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by additional mutations in NS4B. *Arch Virol.*;156 (1):63-69. doi:10.1007/s00705-010-0816-8

Takei N., Kondo J., Nagaike K., Ohsawa K., Kato K., and Kohsaka S. (1991) Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase. *Journal of Neurochemistry*; 57 (4): 1178–1184.

Talarico B. L, & Damonte B. E. (2007). Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. *Virology*; 36; 3473–485.

Tang, W.W., Grewal, R., Shresta, S. (2015). Influence of antibodies and T cells on dengue disease outcome: insights from interferon receptor-deficient mouse models. *Current Opinion in Virology*, 13, 61–66.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.04.007>

Tassaneetrithep, B., Burgess, T.H., Granelli P. A., et al., (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*; 197(7): 823–9.

Thepparit C, and Smith D. R. (2004). Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol*; 78: 12647–56.

Thiri6n I. J. (2010). El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en M6xico. Bayer environmental science. M6xico. 169p.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

Vanegas, G., Qui6ones, W., Carrasco, L.C., Concepci6n, J.L., Albericio, F., Avil6n, L. (2007). Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitology Research*, 101(6), 1511–1516. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0668-7>

Vazeille M, Mousson L, Rakatoarivony I, Villeret R, Rodhain F, Duchemin JB, Failloux AB. (2001). Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. *Am J Trop Med Hyg*; 65 (5): 491-7.

Vega, R.J., Ghosh, A.K., Kanzok, S.M., Dinglasan, R.R., Wang, S., Bongio, N.J., Jacobs, L, M. (2014). Multiple pathways for *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), E492–E500. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315517111>

Villanueva, R. A., Rouillé, Y., Dubuisson, J. (2005). Interactions between virus proteins and host cell membranes during the viral life cycle. *International Review of Cytology*, 245(05), 171–244. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)45006-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)45006-8)

Walker T, Johnson P. H, Moreira L. A, et al. (2011). The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*; 476: 450–53.

Walsh J. L, Keith T. J, and Knull H. R. (1989). Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochimica et Biophysica Acta*; 999 (1): 64–70.

Wang Q. Y, Dong H, Zou B, Karuna R, Wan K. F, Zou J, Susila A, Yip A, Shan C, Yeo K. L, Xu H, Ding M, Chan W. L, Gu F, Seah P. G, Liu W, Lakshminarayana S.

Watterson D, Kobe B, Young P.R. (2012). Residues in domain III of the dengue virus envelope glycoprotein involved in cell-surface glycosaminoglycan binding. *J Gen Virol*; 93: 72–82.

Wei HY, Jiang LF, Fang DY, and Guo Y. H. (2003). Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides. *J Gen Virol*; 84: 3095–8.

WHO (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva (Switzerland): p. 25. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf?ua=1 (accessed 2015 June 24).

WHO (2015) <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> (revisado el 19 de Junio, 2015). Dengue and severe dengue

Wichit S, Jittmittraphap A, Hidari KI, Thaisomboonsuk B, Petmitr S, Ubol S, Aoki C, Itonori S, Morita K, Sozuki T, and Jampangern W. (2011). Dengue virus type 2

recognizes the carbohydrate moiety of neutral glycosphingolipids in mammalian and mosquito cells. *Microbiol Immunol* ; 55: 135–40.

Wu R. H, Tsai M. H, Chao D. Y, and Yueh A. (2015). Sacanning mutagenesis studies reveal a potential intramolecular interaction within the C-terminal half of dengue virus NS2A involved in viral RNA replication and virus asseby and secretion. *J. Virol*; 89(8): 4281-95.

Wünschmann, S., Stapleton, J. T. (2000). Fluorescence-Based Quantitative Methods for Detecting Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced Syncytia

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2015). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>

Yu C. Y, Chang T. H, Liang J. J, Chiang R. L, Lee Y. L, Liao C. L, and Li Y. L. (2012). Dengue virus targets the adaptor protein MITA to subvert Host innate mmmunity. *PLoS Pathog* 8(6): e1002780. doi:10.1371/journal.ppat.100278.

Yu I. M, Holdaway H. A, Chipman P. R, Kuhn R. J, Rossmann M. G, and Chen J. (2009). Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *J Virol*; 83: 12101–7.

Zhang, E, Brewer, J. M, Minor, W, Carreira, L. A, Lebioda (1997). Mechanism of enolase: the crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 A resolution. *Biochemistry*; 36 (41): 12526-34.

Zhang W, Chipman P.R, Corver J, Johnson P. R, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker T. S, Strauss J. H, Rossmann M. G, and Kuhn R. J. (2003). Visualization of

membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol*; 10: 907–12.

Zhang X, Sheng J, Plevka P, Kuhn R. J, Diamond M. S, and Rossmann M. G. (2013). Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *P Natl Acad Sci USA*; 110: 6795–9.

Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>

Zheng A, Umashankar M, and Kielian M. (2010). In vitro and in vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions. *PLoS Pathog*; 6: e1001157

Zou G, Chen Y. L, Dong H, Lim C. C, Yap L. J, Yau Y. H, Schochat S. G, Lescar J, and Shi P. Y. (2011). Functional analysis of two cavities in flavivirus NS5 polymerase. *J. Biol. Chem*; 286(16):14362-72.