

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



UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**Participación de las proteínas tipo septina en la replicación del
virus dengue en células de mosquito**

TESIS

Que presenta

M. en C. JOSÉ ÁNGEL RUBIO MIRANDA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directores de tesis:

Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández

Dr. Juan Ernesto Ludert León

Ciudad de México.

junio, 2022

El presente trabajo se realizó en el laboratorio No. 12 de Entomología Molecular en colaboración con el laboratorio No. 3 de Virología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Fidel de la Cruz Hernández-Hernández y del Dr. Juan Ernesto Ludert De León.

Este proyecto recibió financiamiento por parte del CONACyT **No. 258595-B-1912.**

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por el apoyo para la realización de mis estudios de doctorado, así también agradezco al CONACyT por la beca otorgada durante la realización del doctorado. Becario No. de registro 242746

ASESORES

Dr. Fidel de la Cruz Hernández-Hernández

Profesor Titular 3C del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular,
CINVESTAV-IPN.

Dr. Juan Ernesto Ludert León

Profesor titular 3C de Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular,
CINVESTAV-IPN.

Dr. Rosa María Del Angel

Profesor titular 3E y jefa del Departamento de Infectómica y Patogénesis
Molecular, CINVESTAV-IPN.

Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez Rodríguez

Profesor Titular 3C del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular,
CINVESTAV-IPN

Dr. Fanis Missirlis

Profesor Titular 3A del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.
CINVESTAV-IPN

Dr. Humberto Lanz Mendoza

Profesor titular en Ciencias Médicas del Centro de Investigación Sobre
Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública.

Dr. Mario Henry Rodríguez López

Profesor Titular en Ciencias Médicas Nivel F Emérito del Centro de
Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud
Pública.

RESUMEN

Las Septinas son una familia de proteínas de unión a GTP parecidas a las P-loop GTPasas y han sido identificadas en diferentes organismos (hongos, levaduras, insectos y mamíferos) a excepción de las plantas. Las septinas son consideradas componentes del citoesqueleto debido a su interacción con filamentos de actina, microtúbulos, filamentos intermedios y membrana celular. Además, participan en procesos celulares como citocinesis, movilidad celular, segregación cromosomal, tráfico vesicular y en los últimos años se han relacionado con la inmunidad innata de mamíferos, participando en la eliminación de bacterias patógenas intracelulares. Recientemente se ha observado que durante el ciclo de replicación del virus de la Hepatitis C (Flavivirus), las septinas interaccionan con proteínas virales clave para el desarrollo del virus. En el presente trabajo, mediante análisis bioinformático se identificaron secuencias de aminoácidos de proteínas tipo septina en especies de mosquitos del género *Aedes*. Células C6/36 derivadas del mosquito *Aedes albopictus* y células Aag2 derivadas de *Aedes aegypti*, expresan la septina 2 (AalSep2 y AaeSep2 respectivamente) y durante la infección con virus dengue (DENV) se incrementa su expresión. Los ensayos de co-localización, de ligación por proximidad y co-inmunoprecipitación demostraron que tanto la septina AalSep2 como AaeSep2, colocalizan e interactúan con las proteínas virales NS3 y NS5 del DENV y ensayos de microscopia de transmisión evidenciaron la presencia de AalSep2 en los complejos replicativos. Además, el silenciamiento de AalSep2 y AaeSep2 con RNA interferentes cortos en células C6/36 y Aag2 infectadas, resultó en una disminución en la liberación de viriones, pero no en la replicación de nuevo genoma viral. Estos resultados sugieren que la septina AalSep2 y AaeSep2 son un factor del hospedero necesario para la proliferación del DENV en el mosquito vector.

ABSTRACT

Septins are a family of GTP-binding proteins similar to P-loop GTPases present in different eukaryotic organisms (fungi, yeasts, insects and mammals), but not in plants. Septins are considered components of the cytoskeleton due to their interaction with actin filaments, microtubules, intermediate filaments, and the cell membrane. In addition, they participate in cellular processes such as cytokinesis, cell mobility, chromosomal segregation, gallbladder traffic and in recent years they have been related to the innate immunity of mammals, participating in the elimination of intracellular pathogenic bacteria. It has recently been observed that during the replicating cycle of the Hepatitis C virus (*Flavivirus*), septins interact with key viral proteins for viral development. In this work, amino acid sequences of septin-like proteins were identified in mosquito species of the genus *Aedes* through bioinformatic analysis. We used *Aedes albopictus* C6/36 cells and *Aedes aegypti* Aag2 cells and focused on septins AalSep2 and AeSep2, respectively. We demonstrate that these septins increase their expression in cells infected with dengue virus (DENV; *Flavivirus*), interact with viral proteins and are necessary for viral proliferation. Colocalization, proximity ligation assays and co-immunoprecipitation demonstrated that AeSep2 and AalSep2 colocalize and interact with DENV viral proteins NS3 and NS5. Transmission microscopy assays evidenced the presence of AalSep2 in replicative complexes. In addition, silencing of AeSep2 and AalSep2 with short interfering RNA in infected cells from the respective species resulted in a decrease in the release of virions but not in the replication of the new viral genome. These results suggest that the AalSep2 and AeSep2 septins are host factors necessary for the proliferation of DENV in the mosquito vectors.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por haberme guiado durante este proceso de enseñanza y aprendizaje.

Agradezco al Dr. Juan Ernesto Ludert León por haberme guiado y aceptado dentro de su grupo de trabajo y por todo el apoyo ofrecido durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la Dra. Febe Elena Cazares Raga por brindarme su comprensión y valioso apoyo en el transcurso de la realización de mis estudios de doctorado.

A la Bióloga Experimental Leticia Cortez Martínez por el apoyo y enseñanza en la técnica experimental de Western blot, el cual fue proporcionado durante mi estancia dentro del laboratorio, así como por haberme tenido paciencia y por brindarme su gran amistad.

Al QBP. Carlos Vázquez Calzada por el apoyo y la enseñanza en el análisis y procesamiento de muestras para microscopia confocal, pero, sobre todo, le agradezco por haberme brindado su amistad durante mi estancia en el Cinvestav.

A mi querido amigo y ahora Dr. Antonio Celestino Montes por haberme apoyado y aconsejado durante mi estancia dentro del laboratorio y por la gran amistad brindada desde hace más de 10 años.

A Juan Manuel Ceballos Ramírez por haberme apoyado con cuestiones técnicas durante mi estancia en el laboratorio y por haberme brindado su gran amistad durante estos 6 años.

A mi comité tutorial; Dra. Rosa María del Angel Núñez de Cáceres; Dr. Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez Rodríguez; Dr. Fanis Missirlis; Dr. Humberto Lanz Mendoza; Dr. Mario Henry Rodríguez López por sus valiosas aportaciones y por su apoyo, que hicieron posible la culminación de este proyecto de investigación.

A la querida y grandiosa familia venezolana; Dr. Romel Rosales; Dr. Gerson Isaac Caraballo; Dra. Mercedes viettri, gracias por haberme permitido conocerlos y brindarme su amistad, pero, sobre todo, gracias por haber sido el apoyo personal que necesite cuando las cosas parecían no tener sentido, muchas gracias por nunca dejar de apoyarme, por creer en mí y por haberme adoptado como un integrante más del laboratorio 3 de virología.

A todos mis compañeros de laboratorio por su apoyo académico; Tino, Lore, Daniel, Erick, Sr. Juan, Lety, vero, Bismark, Paulina, Abel y Juan Manuel. Gracias por todo el tiempo que compartimos.

A todos mis amigos del CINVESTAV: Alejandro, Tino, Lore, Sebastián, Luis, Nadia, Esly, Gabi, Miriam, charli cordero, Saris, Gerson, Mercedes, Romel, Arely, Noe, Elena, Irving, Dayana, Susana, Rigoberto, Josué y Carlitos. Les agradezco de corazón, por todo el tiempo que compartimos, por todo el apoyo, los consejos y, sobre todo, por todos esos grandes momentos de felicidad que vivimos dentro y fuera del laboratorio, nunca dejare de agradecer por haberlos conocido, muchas gracias.

DEDICATORIAS

A mis padres Juana y Jose, por aconsejarme en cada instante de mi vida, por haber hecho el esfuerzo de regalarme una educación, por aconsejarme en cada instante de mi vida, por darme la fuerza para no dejar mis sueños y seguir adelante, por enseñarme que no importa lo fuerte que te golpee la vida, siempre hay formas de levantarse y seguir adelante, por enseñarme que los sueños son posibles y que solo es cuestión de decisión y de no bajar los brazos, gracias por siempre estar cuando los necesito, gracias por darme tanto amor y por seguir acompañándome en este camino llamado vida, simplemente los amo.

A Mis hermanas: Iris, Mayra, Alejandra, Brenda y Yeraldi. Gracias por apoyarme en todo momento, gracias por no haberme dejado solo cuando más lo necesitaba, gracias por todo el cariño que siempre me han brindado, gracias por creer en mí y por soportar mi personalidad de ogro que tengo y aunque siempre he sido una persona que demuestra poco o nada sus sentimientos, saben que las adoro, son lo más importante para mí y que siempre estaré cuando me necesiten.

A mi abuela por haber estado siempre conmigo, por todas las enseñanzas de vida que me dio, por todo el amor que me brindo y por siempre alentarme a seguir adelante sin importar la situación y, sobre todo, gracias por haber sido mi segunda madre y por haberme aconsejado hasta el último día de su vida, donde quiera que te encuentres, sabes que te extraño y te amare eternamente.

1. Índice	
1. Índice	1
2. Lista de figuras	5
3. Lista de tablas	7
4. Abreviaturas	8
5. Introducción	12
5.1. Mosquitos como agentes transmisores de agentes infecciosos	12
5.1.1. Interacción del mosquito con agentes patógenos	13
5.2. Flaviviridae	14
5.3. Virus dengue (DENV)	15
5.3.1. Epidemiología del virus dengue	16
5.3.2. Estructura y genoma del DENV	17
5.4. Ciclo de vida del DENV	17
5.5. Ciclo de vida del DENV en mosquitos	21
5.6. DENV y su interacción con factores del hospedero	22
5.7. Genoma viral de DENV y factores del hospedero	23
5.8. Proteínas no estructurales (NS) de DENV y su interacción con factores del hospedero	25
6. proteínas tipo septina	27
6.1. Estructura de las septinas	28
6.2. Clasificación de las septinas	29
6.3. Organización estructural de las septinas	30
6.4. Modificaciones post-traduccionales de las septinas	31
6.4.1. SUMOilación de las septinas	31
6.4.2. Acetilación de las septinas	31
6.4.3. Fosforilación de las septinas	32
6.5. Función de las septinas	33
6.5.1. Septinas y citocinesis	33

6.5.2. Septinas y trafico vesicular	34
6.5.3. Septinas e inmunidad	35
6.5.4. Septinas en la interacción patógeno-hospedero	35
6.5.5. Septinas y virus	38
6.6. Septinas en insectos	39
6.6.1. Septinas en mosquitos	40
7. Antecedentes	41
8. Justificación	42
9. Objetivos	42
9.1. Objetivo general	42
9.2. Objetivos particulares	42
10. Diagrama de trabajo	43
11. Material y métodos	44
11.1. Búsqueda de secuencias tipo septina en mosquitos del género Aedes	44
11.2. Cultivos celulares	44
11.3. Virus	45
11.4. Extracción de RNA	46
11.5. Síntesis de cDNA	46
11.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR)	47
11.7. Extracción de proteínas	48
11.8. Western Blot.	49
11.9. Infección de células de mosquito con DENV4	50
11.10. Microscopia confocal de células de mosquito infectadas con DENV4	50
11.11. Análisis de colocalización de proteínas por microscopia confocal	51
11.12. Ensayos de ligación por proximidad (Proximity Ligation Assay, PLA)	52

11.13. Inmunoprecipitación (IP)	53
11.14. Microscopia electrónica de transmisión (MET)	54
11.15. Células de mosquito tratadas con DsiRNAs específicos	55
11.16. Titulación viral de células de mosquito tratadas con DsiRNAs	57
11.17. qPCR de células de mosquito tratadas con DsiRNAs.	58
11.18. Viabilidad Celular	59
11.19. Análisis estadísticos	
12. Resultados	60
12.1. Identificación in silico de los genes de septina de <i>Aedes albopictus</i> y <i>Aedes aegypti</i>	60
12.2. Análisis de las secuencias de las proteínas tipo septina de <i>Aedes albopictus</i> y <i>Aedes aegypti</i>	62
12.3. Expresión de los genes de septina en células de mosquito	66
12.4. Expresión de la proteína septina 1 (AalSep1 y AaeSep1) y septina 2 (AalSep2 y AaeSep2) en células de mosquito	68
12.5. Expresión de la septina 2 (AaeSep2 y AalSep2) en células C6/36 y Aag2, infectadas con DENV4	70
12.6. Localización celular de la septina AaeSep2 y AalSep2 en células de mosquito (C6/36 y Aag2) infectadas con DENV4	73
12.7. Colocalización de las Septinas AaeSep2 y AalSep2 con las proteínas C y E de DENV	76
12.8. Colocalización de la Septina AaeSep2 y AalSep2 con las proteínas NS3 y NS5 de DENV	79
12.9. Interacción directa de la septina AalSep2 con proteínas de DENV	82
12.10. Co-Inmunoprecipitación de NS3 y NS5 con anti-HsSept6	84
12.11. Localización de septina AalSep2 en complejos replicativos de células C6/36 infectadas con DENV4	85

12.12. Silenciamiento de la septina AalSep2 y AaeSep2 en células de mosquito	87
12.13. Análisis del silenciamiento de septina 2 (AalSep2 y AaeSep2) de mosquito por Inmunofluorescencia.	89
12.14. Efecto del silenciamiento de la septina 2 de mosquito en el ciclo replicativo de DENV4	91
13. Discusión	94
14. Resumen de resultados	102
15. Conclusiones	103
16. Perspectivas	103
17. Bibliografías	104

2. Lista de figuras.

Figura 1. Organización del genoma de flavivirus	14
Figura 2. Ciclo de vida del virus dengue	20
Figura 3. Dominios de proteínas tipo septina.	28
Figura 4. Clasificación de Septinas de humano	29
Figura 5. Modelo del ensamblaje de los complejos hetero-oligoméricos de septinas de mamíferos	30
Figura 6. Patógenos intracelulares y septinas.	37
Figura 7. Representación esquemática de ensayos PLA	53
Figura 8. Estructura de los genes de septina de <i>Aedes albopictus</i> y <i>Aedes aegypti</i> .	62
Figura 9A. Dominios característicos de las Septinas de <i>Aedes albopictus</i> y <i>Aedes aegypti</i>	64
Figura 9B. Dominios característicos de las Septinas de <i>Aedes albopictus</i> y <i>Aedes aegypti</i>	65
Figura 10. Filogenia de Septinas de mosquito	66
Figura 11. Expresión de RNAm de Septinas en células C6/36	68
Figura 12. Expresión del RNAm de Septinas en células Aag2	69
Figura 13. Inmunodetección de septina 1 en células de mosquito	70
Figura 14. Inmunodetección de septina 2 en células de mosquito	70
Figura 15. Expresión de la septina AaeSep2 en células Aag2 infectadas con DENV4	72
Figura 16. Expresión de la septina AalSep2 en células C6/36 infectadas con DENV4	73
Figura 17. Localización celular de la septina AaeSep2 en células de mosquito infectadas con DENV4	75
Figura 18. Localización de la septina AalSep2 en células de mosquito infectadas con DENV4	76
Figura 19. AaeSep2 colocaliza con las proteínas C y E de DENV	78
Figura 20. AalSep2 colocaliza con las proteínas C y E de DENV	79

Figura 21. AaeSep2 colocaliza con NS3 y NS5 de DENV	81
Figura 22. AalSep2 colocaliza con NS3 y NS5 de DENV	82
Figura 23. Septina AalSep2 interacciona con las proteínas E, NS3 y NS5 de DENV4	84
Figura 24. Inmunoprecipitación de NS3 y NS5 de DENV4 con septina AalSep2	85
Figura 25. AalSep2 está localizada en complejos replicativos de células C6/36 infectadas con DENV4	87
Figura 26. Silenciamiento de Septina 2 en células de mosquito	89
Figura 27. Viabilidad de células C6/36 infectadas con DENV4 y tratadas con DsiRNAs.	90
Figura 28. Inmunofluorescencia del silenciamiento de Septina 2 en células de mosquito	91
Figura 29. Título viral de células C6/36 y Aag2 silenciadas	92
Figura 30. Número de copias virales de DENV4 en células silenciadas en Aalsep2	93

3. Lista de tablas

Tabla 1. Especies de mosquito responsables de transmitir enfermedades al humano.	13
Tabla 2. Proteínas del hospedero que interaccionan con el genoma de DENV	24
Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para la amplificación de Septinas de mosquito.	48
Tabla 4. DsiRNAs diseñados contra AalSep2 y AaeSep2	57
Tabla 5. Genes des septina en mosquitos del género Aedes	62
Tabla 6. Características de proteínas tipo septina en <i>Aedes albopictus</i> y <i>Aedes aegypti</i>	63

4. Lista de abreviaturas.

ZIKV	Zika virus
WNV	Virus del Oeste del Nilo
WB	Western Blot
UV	Ultravioleta
TGN	Red Trans-Golgi (del inglés: Trans-Golgi Network)
SUMO	Pequeños modificadores tipo ubiquitina (del inglés: Small Ubiquitin-Like Modifiers)
SUE	Secuencia única de septina
SSD	Síndrome del shock por dengue
SPCS	Subunidad del complejo peptidasa señal (del inglés: Signal peptidase complex Subunit)
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
siRNA	RNA pequeño de interferencia
SFB	Suero Fetal Bovino
SEPT	Septina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
SDS	Dodecilsulfato sodico
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa
RTN	Reticulon
rpm	Revoluciones por minuto
RNAi	RNA interferente
RNA	Ácido ribonucleico
RHA	RNA Helicasa A
RE	Retículo endoplásmico
RC	Complejo replicativo (Del inglés: Replicative Complex)
RBPs	Proteínas de unión a RNA (del inglés:RNA-binding proteins)
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

PTM	modificación post traduccional
PTB	proteína de unión al tracto de polipirimidina
Proteína M	Proteína de Membrana
Proteína E	Proteína de Envoltura
Proteína C	Proteína de la Cápside
PLA	Ensayo de ligación por proximidad (del inglés: Proximity Ligation Assay)
piRNA	RNA asociado a Piwi
PI	Fosfoinositido (del inglés: Phosphoinositide)
pi	Punto isoeléctrico
PFA	Paraformaldehido
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCC	Coefficiente de correlación de Pearson
PBS	Buffer de Fosfatos (del inglés: Phosphate Buffered Saline)
OST	Oligosacariltransferasa
ORF	Marco de lectura abierta (del inglés: Open Reading frame)
N-WASP	Proteína del síndrome neural Wiskott-Aldrich
NS	No estructural
nm	nanómetro
nM	Nanomolar
MOI	Multiplicidad de infección
mM	Milimolar
ml	Mililitro
miRNA	Micro-RNA
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
mA	Miliamperios
kDa	Kilodaltones
kb	Kilobases
JEV	Virus de la encefalitis japonesa

IR	Intermediario Replicativo
IP	inmunoprecipitación
<i>Hs</i>	Homo sapiens
HRP	Peroxidasa de Rábano (del inglés: Horseradish peroxidase)
hpi	Horas post infección
hnRNPS	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
HCV	Virus de la hepatitis C
h	Horas
GTP	Guanosin trifosfato
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
FR	Forma Replicativa
FDH	Fiebre Hemorrágica del Dengue
FD	Fiebre del Dengue
ERI 3	Exorribonucleasa 3
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica
EMEM	Medio esencial mínimo de Eagles
EMC	Complejo de membrana del retículo endoplásmico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
DTT	Ditiotreitol
DsiRNAs	RNA sustrato de Dicer
DsiRNA-NT	RNA sustrato de Dicer- Sin Objetivo
dpi	Días post infección
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DENV	Virus Dengue
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
co-IP	Co-inmunoprecipitación
CHO	células de Ovario de Hámster Chino

CHIKV	Virus Chikungunya
CENP-E	Precursor de la proteína E asociado a centrómero
CDT	<i>Clostridium difficile</i> tranferasa
cDNA	DNA complementario
bp	Pares base
BHK-21	Fibroblastos de riñón de Hámster Bebe
BCA	Albumina de Suero Bovino
ATL	Atlastina
Arbovirus	Virus transmitidos por artrópodos
aa	Aminoácidos
5'-UTR	Región no traducida cinco prima
3'-UTR	Región no traducida tres prima
μl	Microlitro
°C	Grado centígrado

5. introducción

5.1 Mosquitos como agentes transmisores de agentes infecciosos.

Los patógenos transmitidos por artrópodos hematófagos representan más del 17% de las enfermedades infecciosas, afectando a millones de personas en todo el mundo y comprenden una proporción significativa de patógenos humanos emergentes (Kading et al., 2020). Los mosquitos son los artrópodos vectores de las enfermedades parasitarias y virales más importantes en el humano (Tabla 1) incluyendo la malaria, transmitida por mosquitos del género *Anopheles* spp., que es causada por parásitos del género *Plasmodium* spp., (Beerntsen et al., 2000; Garrido-Cárdenas et al., 2019; Bhatt et al, 2013; Wang et al., 2020) y de la cual, tan solo en el 2020, se reportaron cerca de 241 millones de casos y 627 mil muertes (World Malaria Report 2021). Por otro lado, los agentes virales transmitidos al humano por artrópodos vectores (Arthropod Borne Virus), están clasificados dentro de cinco familias diferentes: *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* y *Seadornavirus*. El virus del Dengue (DENV), el virus del Chikungunya (CHIKV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del oeste del Nilo (WNV) y el virus Zika (ZIKV), representan los arbovirus con mayor prevalencia en todo el mundo (Powell y Tabachnick. 2013; Cheng et al., 2016) y son todos transmitidos por mosquitos del género *Aedes*, siendo *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, los principales vectores de DENV, CHIKV y ZIKV, debido a que son especies altamente antropofílicas (McBride. 2016). Cabe mencionar que la amplia distribución geográfica de estos mosquitos en áreas tropicales, su domesticación en áreas urbanas, así como su resistencia a condiciones ambientales (deshidratación, bajas temperaturas y salinidad) (Tchamel et al., 2021), son determinantes para la transmisión de estos agentes infecciosos a la población humana. Además, dada la ausencia de vacunas y fármacos antivirales efectivos, hasta el momento la única forma de prevenir la transmisión de estos patógenos es controlando las poblaciones de mosquitos vectores, pero, para poder desarrollar nuevas estrategias de control, es importante conocer y

entender el mecanismo de interacción entre el mosquito vector y el patógeno (Kraemer *et al.*, 2015).

Mosquito	Enfermedad que transmite	Patógeno
<i>Aedes aegypti</i>	Fiebre del dengue	Virus dengue
<i>Aedes albopictus</i>	Fiebre amarilla	Virus de la fiebre amarilla
<i>Aedes pseudoscutellaris</i>	Filariasis linfática	Filarias
<i>Aedes triseriatus</i>	Encefalitis de La Crosse	Virus de la encefalitis de La Crosse
<i>Aedes vexans</i>	Fiebre del Nilo occidental	Virus del Nilo occidental
<i>Anopheles gambiae</i>	Malaria	Plasmodium
<i>Anopheles stephensi</i>	Malaria	Plasmodium
<i>Anopheles albimanus</i>	Malaria	Plasmodium
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Fiebre del Nilo occidental	Virus del Nilo occidental
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	Encefalitis	Virus de encefalitis japonesa
<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	Encefalitis	Virus de encefalitis japonesa

Tabla1. Especies de mosquito responsables de transmitir enfermedades al humano (Walker *et al.*, 2014).

5.1.1 Interacción del mosquito con agentes patógenos

Aunque los mosquitos culícidos y anofelinos son vectores efectivos de patógenos al humano y animales, la transmisión depende de la susceptibilidad o resistencia de estos insectos a las infecciones, la cual depende de un intrincado proceso co-evolutivo, en el cual mosquitos y patógenos luchan y se adaptan para la supervivencia y la infección, de tal manera que existe especificidad de las especies de mosquitos para los patógenos que transmiten. Ejemplos de esta interacción evolutiva se observan en los mosquitos del género *Aedes*, que son los únicos capaces de transmitir el virus de la fiebre del dengue y los mosquitos del género *Culex* que son únicos para transmitir el virus de la encefalitis japonesa. Igualmente, para la transmisión de la malaria humana, especies particulares de mosquitos del género *Anopheles* acarrean y transmiten especies particulares de

Plasmodium spp. La variedad en la especificidad de las asociaciones mosquito-patógeno depende de varios factores, que incluyen la capacidad de supervivencia y replicación de los patógenos dentro de los mosquitos, el comportamiento, la compatibilidad fisiológica, la respuesta inmune innata y la habilidad del patógeno para evadir la respuesta inmune del mosquito (Hillyer, 2010; Tsakas y Marmaras, 2010).

5.2 *Flaviviridae*

La familia *Flaviviridae* es una familia de virus integrada por agentes causales de una amplia gama de enfermedades infecciosas (fiebres, encefalitis y fiebres hemorrágicas) y está compuesta por tres géneros: *Flavivirus*, los cuales son los arbovirus transmitidos por mosquitos, los *Hepacivirus* (especies tipo hepatitis C) y los *Pestivirus* (especies tipo virus de la diarrea bovina) (Beth et al., 2009; Neufeldt et al., 2018; Bartenschlager y Miller., 2008; Beth et al., 2009).

En general, todos los virus de la familia *Flaviviridae* son esféricos, de 40-60 nanómetros de diámetro y contienen un genoma constituido por una cadena simple de RNA de orientación positiva [RNA (+)] (Bartenschlager y Miller., 2008). Su genoma es de 11-12 kb de longitud aproximadamente y es traducido como una gran poliproteína (**Figura 1**), la cual es procesada para generar 10 proteínas, tres estructurales y siete no estructurales (NS) (Barrows et al., 2018; Chong et al., 2019; Pierson et al., 2020; van den Elsen et al., 2021).

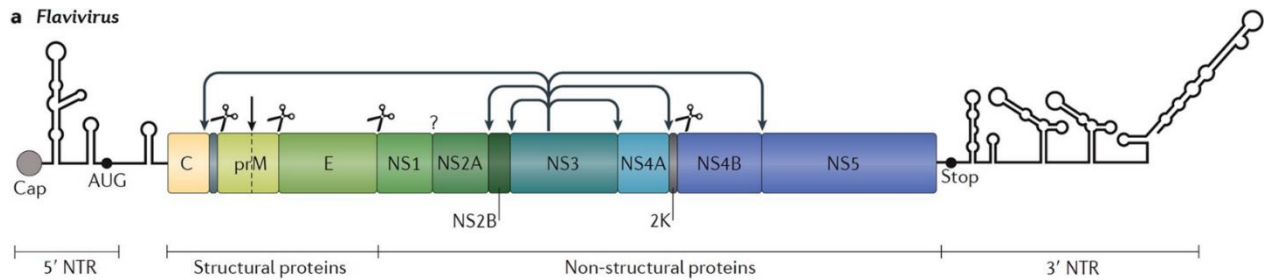


Figura 1. Organización del genoma de flavivirus. El genoma de flavivirus (11-12 kb) contiene una estructura denominada “Cap en el extremo 5’ y enseguida un único marco de lectura, el cual permite codificar una poliproteína que es procesada por proteasas del hospedero y del virus, para generar tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales (NS). Las tijeras indican el sitio de acción de la peptidasa señal, las flechas a partir de la proteasa viral NS3 indican el sitio de acción de dicha enzima y la flecha negra vertical indica el sitio de acción de la proteasa celular furina, mientras que el signo de interrogación indica el desconocimiento de la proteasa que actúa sobre un sitio específico de la poliproteína del virus, las iniciales NTR representan las regiones no traducidas del genoma viral (imagen tomada de Neufeldt *et al.*, 2018).

5.3 Virus dengue (DENV)

Existen cuatro serotipos de DENV (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4) (Bartenschlager y Miller., 2008; Bäck y Lundkvist., 2013) los cuales comparten aproximadamente el 65 % de su genoma, pero incluso dentro de un único serotipo existen variantes genéticas llamadas linajes (Guzmán *et al.*, 2010); sin embargo, la infección con los distintos serotipos resulta en la misma enfermedad (Guzmán *et al.*, 2010; Guzmán *et al.*, 2016; Hasan *et al.*, 2016). Clínicamente, las manifestaciones de la infección por dengue pueden variar desde una enfermedad febril leve-aguda indiferenciada, a la clásica fiebre de dengue (FD), fiebre de dengue hemorrágico (FDH), hasta el síndrome de choque por dengue (SSD). La FD es una enfermedad febril aguda, que presenta síntomas como dolor de huesos o articulares y musculares, dolores de cabeza, leucopenia y erupción cutánea y otros síntomas similares a los de la gripe. Por otro lado, la FDH tiene cuatro manifestaciones clínicas principales: fiebre severa, hemorragia, a menudo acompañada con hepatomegalia y en casos más severos, falla circulatoria. Algunos individuos pueden desarrollar choque hipovolémico, el cual es resultado de una severa fuga de plasma. Se ha informado que algunas enfermedades

crónicas desencadenan la severidad del dengue, así como la ocurrencia de FDH (Muller et al., 2017; Wang et al., 2020).

El diagnóstico de la enfermedad es complicado y se basa en la confirmación de laboratorio. En la actualidad no se cuenta con medicamentos antivirales específicos, y la vacuna licenciada (Sanofi Pasteur's Dengvaxia®) para dengue aún no está disponible en todos los países endémicos para dengue (Thomas y Yoon. 2019). La FD y FDH se mantienen como serios problemas de salud pública a nivel mundial. Recientemente se han reportado brotes de FHD con una alta mortalidad (Wang et al., 2020). Clínicamente, FHD es una grave amenaza, sin embargo, las razones para la ocurrencia de esta enfermedad son todavía desconocidas debido a su complejidad etiológica (Hasan et al., 2016; Wang et al., 2020).

5.3.1 Epidemiología del virus dengue.

Desde que el DENV fue aislado por primera vez en 1943, la incidencia global de esta enfermedad aumenta año con año. Actualmente, el dengue es una de las enfermedades tropicales más importantes del mundo y su incidencia se ha visto incrementada en más de 30 veces en las últimas décadas debido a la expansión geográfica de los mosquitos vectores del género *Aedes*, incluyendo la invasión de áreas urbanas (Guzmán et al., 2016; Wang et al., 2020). Este virus infecta a más de 50 millones de personas cada año, de las cuales mueren cerca de 25000 (Wang et al., 2020). En la actualidad, dos billones de personas en el mundo están en riesgo de contraer la infección, principalmente en los países pobres, en donde causa un constante estado de alarma y la ausencia de vacunas y fármacos antivirales agrava esta situación, además de que imponen altos costos a los servicios de salud para las familias y a los sistemas económicos afectados (Samsa et al., 2009; Wang et al., 2020). Estimaciones recientes sugieren que cerca de 390 millones de infecciones por DENV ocurren cada año, de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente (Wang et al., 2020). La presencia de la

infección se ha reportado en 128 países con una población colectiva de 3.9 billones y se estima que más de la mitad de la población mundial está en riesgo de contraer la infección (Bhatt et al., 2013; Bhatt et al., 2021; Culshaw et al., 2017; Wang et al., 2020). La transmisión de DENV se produce en las regiones del Mediterráneo Oriental, América, Sudeste Asiático, Pacífico Occidental y África, con nuevos casos que se producen y se extienden a áreas no endémicas en los Estados Unidos y Europa (Guzmán et al., 2016). Además, se considera que la amplia distribución del DENV y su vector, está determinada por la irregularidad en los esfuerzos por controlar las poblaciones del mosquito, factores sociales (incremento en la transportación, la densa urbanización) y el calentamiento global (Bartenschlager y Miller., 2008; Guzmán et al., 2016). Recientemente se han reportado brotes de FHD con alta mortalidad. Pero hay muchas interrogantes en la circulación del virus ya que las fuerzas que modifican la incidencia de esta enfermedad son todavía desconocidas debido a su complejidad etiológica (Hasan et al., 2016; Salles et al., 2018; Wang et al., 2020). En México, la incidencia de la enfermedad es muy alta, tan solo en el 2021, se presentaron 120, 239 mil casos, de los cuales 154 casos terminaron en decesos (Panorama epidemiológico de dengue-México 2021).

5.3.2 Estructura y genoma de DENV.

El virión del dengue es esférico, envuelto por una bicapa de lípidos, con un tamaño aproximado de 50 nanómetros. El genoma del dengue es una molécula de RNA de cadena simple de polaridad positiva de 10.7 kb de longitud (Bartenschlager y Miller., 2008; Naik y WU., 2015). El genoma esta flanqueado en ambos extremos por regiones no traducidas (UTRs), contiene un marco de lectura abierta (ORF), que codifica una poliproteína que es co- y postraduccionalmente procesada por proteasas celulares y virales. En el extremo 5' el RNA posee una estructura denominada "Cap" (m7GpppAmp), la cual media el inicio de la traducción y en este mismo extremo se ubica una región que

codifica tres proteínas estructurales: proteína de la cápside (C), proteína de membrana (M) y proteína de la envoltura (E); y con dirección al extremo 3' se ubica la región que codifica para las siete proteínas no estructurales (NS; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Anasi et al., 2020; Beth et al., 2009; Naik y Wu., 2015; Roy y Bhattacharjee., 2021).

5.4 Ciclo replicativo de DENV.

El ciclo replicativo del DENV, se inicia cuando la proteína E, presente en la envoltura del virión, se une a receptores celulares específicos que incluyen: receptor de heparán sulfato, CD14, receptor de laminina de alta afinidad de 37/67 kDa, GRP78/BiP y el receptor de adhesión intercelular de células dendríticas (DC) 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), encontrados en la superficie de células hospederas como células dendríticas, células B, T, monocitos/hepatocitos y células neuronales. Una vez que el virus se ha unido a su receptor, se internaliza vía endocitosis mediada por receptor y, dentro de la célula, el virus es entregado a endosomas tempranos y después a endosomas tardíos, en donde el pH ácido inducirá una trimerización irreversible de la proteína E, provocando la fusión de la envoltura del virión con la membrana del endosoma (Rogers et al., 2015; Smith et al., 2011). La fusión de las membranas provoca la liberación de la nucleocápside del virus, la cual se desensamblará y liberará el genoma viral (RNA (+)), el cual posteriormente se traducirá en el retículo endoplásmico rugoso (RE), para dar origen a una poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos. La poliproteína se procesará post-traduccionamente por proteasas celulares y virales, generando tres proteínas estructurales (C, M y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Bartenschlager y Miller., 2008; Rodenhuis-Zybert et al., 2010; Screaton et al., 2015). Después de la traducción y el procesamiento, un complejo de proteínas, constituido por NS5 (una RNA polimerasa dependiente de RNA), proteínas accesorias no estructurales, RNA (+) y factores celulares del hospedero (Vimentina, reticulon y

DNAJC14), inducen la invaginación de la membrana del RE y forman el complejo de replicación (CR), en el cual se sintetizan nuevas copias del genoma viral (Bartenschlager y Miller., 2008; Bäck y Lundkvist., 2013; Nicholls *et al.*, 2020).

El proceso de replicación del genoma del virus se inicia con la síntesis de un RNA (-) de longitud completa, el cual sirve como una cadena de RNA molde para la producción de una progenie de RNA (+). Durante la transcripción, el RNA (-) recién sintetizado, se aparea con el RNA (+) y forman un dúplex de RNA (forma replicativa, FR), que funciona como molde para la generación en forma asimétrica y semiconservativa de nuevos RNA (+) vía un intermediario replicativo (IR) (Bartenschlager y Miller., 2008; Harapan *et al.*, 2020).

Los RNA (+) nuevos son liberados del IR y se adhieren a ribosomas para iniciar un nuevo ciclo de traducción o, alternativamente se ensamblan dentro de nuevos viriones, los cuales se forman comúnmente en el RE (Bartenschlager y Miller., 2008; Bäck y Lundkvist., 2013). El ensamble de los viriones ocurre cuando el RNA (+) recién sintetizado es empaquetado por la proteína C para formar la nucleocápside, la cual es dirigida hacia el lumen del ER, en donde se asocia con las proteínas prM y E, las cuales forman heterodímeros prM/E y éstos a su vez forman trímeros que se cree inducen la formación de superficies curvas compuestas de prM/E que guían la salida del virión (Perera y Kuhn., 2008; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Harapan *et al.*, 2020).

Una vez formado el virión, pasa por un proceso de maduración a través del aparato de Golgi, en donde se lleva a cabo la glucosilación de la proteína prM de la membrana viral, así como su procesamiento proteolítico realizado por la furina (endoproteasa celular), lo cual genera una proteína M madura y el péptido pr. El procesamiento proteolítico ocurre cuando heterodímeros de prM/E de la membrana del virión se disocian para formar dímeros, lo cual es ocasionado por el pH ácido (5.8-6.0) de la red trans de Golgi (TGN) (Perera y Kuhn., 2008; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Después del procesamiento de la proteína prM de membrana viral, el fragmento pr es liberado y la proteína E forma complejos

homodiméricos en la membrana del virión, generando la maduración de los viriones, los cuales están listos para ser liberados al medio extracelular e iniciar un nuevo ciclo replicativo (Bartenschlager y Miller., 2008; Rodenhuis-Zybert et al., 2010; Screatton et al., 2015). Se sabe que el péptido pr se mantiene asociado al virión hasta que el virus es secretado al medio extracelular y tanto la proteína M como pr se consideran como chaperonas que estabilizan a la proteína E durante su tránsito en la vía secretoria, previniendo cambios conformacionales prematuros de la proteína E que podrían llevar a la fusión temprana del virión con la membrana de la célula (Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

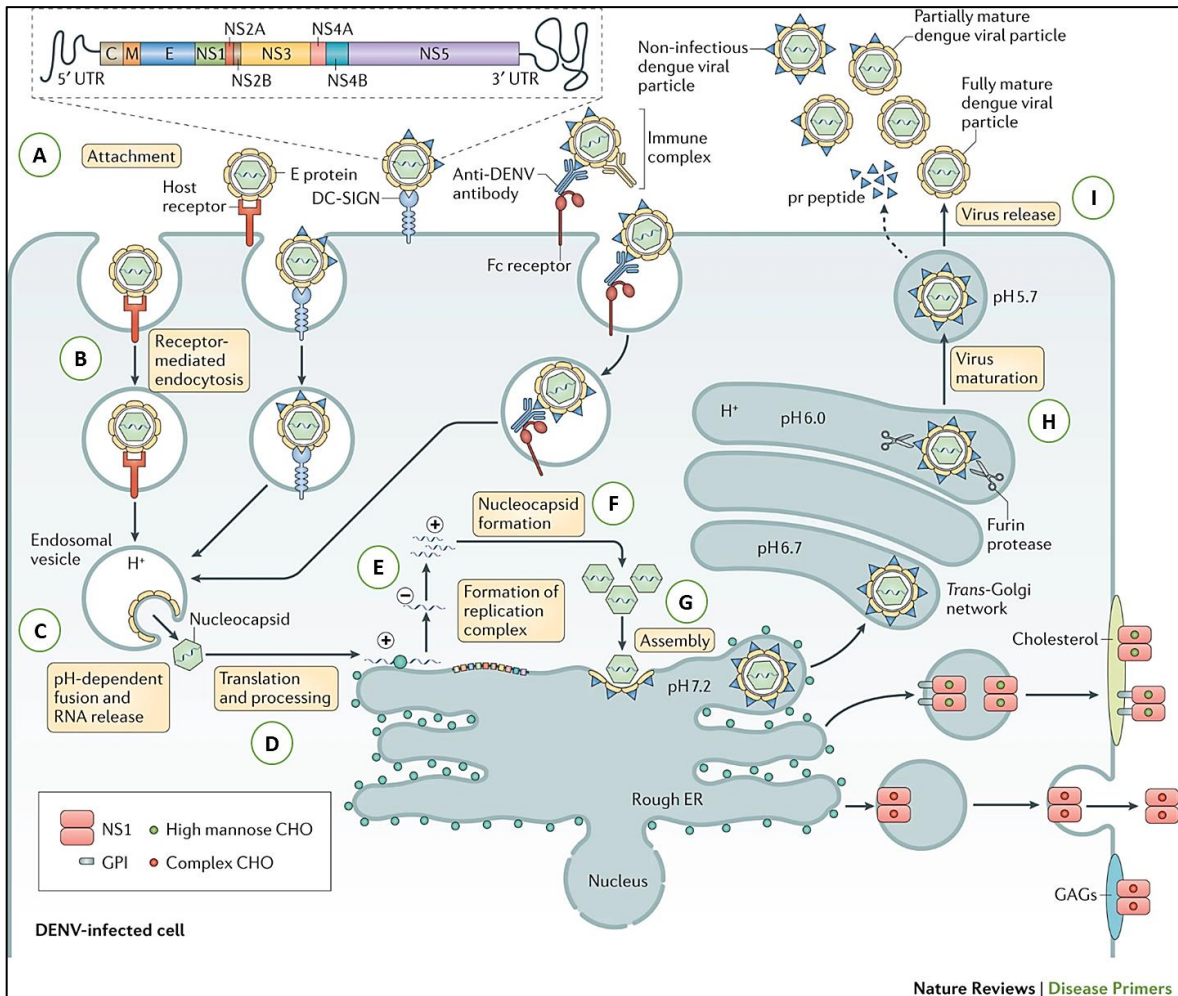


Figura 2. Ciclo replicativo del virus dengue. Partículas virales de DENV se adhieren e ingresan a la célula hospedera por endocitosis mediada por receptor (**A y B**). Posteriormente, los viriones dentro de los endosomas, se fusionan con la membrana endosomal, liberando la nucleocápside (**C**), la cual posteriormente libera el genoma viral, el cual es traducido por los ribosomas del retículo endoplásmico (ER) para generar una poliproteína, que será procesada por proteasas celulares y virales (**D**), para generar proteínas estructurales (C, M y E) y proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Las proteínas NS, formaran el complejo replicativo (RC), estructura que sintetizara nuevas copias del genoma viral (**E**) y que posteriormente será capturado por la cápside para formar la nucleocápside (**F**), la cual interaccionara con las proteínas estructurales (ancladas a la membrana de ER) para formar un virión inmaduro (**G**). Los viriones inmaduros pasarán del ER a la Red Trans-Golgi (TGN) para su maduración (**H**) y finalmente, serán liberados al medio extracelular mediante exocitosis y continuarán con un nuevo ciclo de infección (**I**). Más información se presenta en el texto (Imagen de Guzmán *et al.*, 2016).

5.5 Ciclo replicativo de DENV en mosquitos.

El ciclo replicativo del DENV dentro de su vector (mosquitos del género *Aedes*), se asume que es muy similar a lo que ocurre en líneas celulares de vertebrados, sólo que, a diferencia de los invertebrados, los vertebrados no son capaces de modular la infección viral hasta niveles no patogénicos, un efecto que en los mosquitos se sugiere está determinado por mecanismos de defensa antiviral que involucra las vías de señalización Toll, IMD, JAK/STAT y las de RNA interferentes (RNAi) (siRNAs, miRNAs y piRNAs), así como la misma microbiota bacteriana del vector (Sim *et al.*, 2014; Blair y Olson., 2014; Blair y Olson., 2015; Olson y Blair.,2015; Cheng *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019).

En líneas celulares de mosquito, solo se ha analizado el mecanismo inicial de entrada del DENV a la célula huésped, el cual involucra la adherencia del virión a receptores específicos de la célula, seguido de su internalización al citoplasma de la célula huésped. En la línea celular C6/36 derivada del mosquito *Ae. albopictus* se han identificado posibles receptores para el DENV, dentro de los que se encuentran 2 glicoproteínas de 40 y 45 kDa propuestas como receptores para DENV-4 (Salas-Benito *et al.*, 2007), 2 proteínas de 67 kDa y 80 kDa que reconocen los cuatro serotipos del DENV (Mercado-Curiel *et al.*, 2006; 2008). Otras investigaciones han reportado una proteína de unión a laminina como un receptor para DENV-3 y 4, pero no para DENV-1 y 2 en células C6/36. La prohibitina, también ha sido propuesta como un receptor de unión para DENV-2 tanto para células de *Ae. albopictus* como de *Ae. aegypti* (Acosta *et al.*, 2008; Acosta *et al.*, 2011). Además de la identificación de los posibles receptores del DENV en células de mosquito, también se ha determinado el mecanismo de ingreso del virus a la célula huésped, en donde se ha visto que los cuatro serotipos del DENV (DENV-1, 2, 3 y 4) ingresan a las células C6/36 por medio de una endocitosis mediada por receptor que depende de vesículas cubiertas con clatrina (Acosta *et al.*, 2008; Mosso *et al.*, 2008; Carro y Cherry., 2020).

Con respecto al mosquito *Ae. aegypti*, solo se ha analizado la presencia del DENV-2 en diferentes órganos del mosquito a partir de una cinética de infección. Se ha observado que dos días después de la infección, el virus es localizado en células epiteliales del estómago y su presencia incrementa hasta los 10 días post infección (dpi). También se observó que el virus se aloja en el sistema traqueal entre los 3 y 5 dpi, sugiriendo que este sistema facilita la diseminación del virus hacia otros tejidos (Salazar et al., 2007). En las glándulas salivales y tejido neural, el virus aparece a los 4 días, donde persiste. En las glándulas salivales la infección ocurre principalmente en la región distal de los lóbulos laterales, que parece ser el primer sitio infectado, mientras que, en los lóbulos mediales y la región proximal de los laterales, la infección ocurre de forma tardía (Salazar et al., 2007). Es importante mencionar que aún quedan por conocer los mecanismos de proliferación del DENV dentro del mosquito, incluyendo los componentes celulares del hospedero que participan en la proliferación del virus y que podrían ayudar a modular la infección, generando niveles de viremia no patogénicos para el mosquito.

5.6 DENV y su interacción con factores del hospedero.

El ciclo replicativo de DENV incluye adhesión a la célula blanco, endocitosis, traducción de proteínas, síntesis de RNA, ensamble, egreso y maduración de los viriones y todos los pasos del ciclo involucran factores de la célula hospedera, no todos identificados y caracterizados, incluyendo proteínas y micro RNAs (miRNAs), los cuales pueden regular positiva o negativamente los procesos (Wang y Zhang, 2017). DENV es un parásito intracelular obligado que en su evolución ha desarrollado estrategias para secuestrar y utilizar factores del hospedero para realizar su replicación, pero también debe evadir las funciones de otros factores del hospedero que protegen a las células de la infección y replicación del virus (Wang and Zhang, 2017).

5.7 Genoma viral de DENV y factores del hospedero.

Se conoce que entre el 5-10% del proteoma humano comprende proteínas de unión a RNA (RBPs del inglés RNA-binding proteins). Las RBPs juegan un papel crucial en la interface entre una célula del hospedero y sus patógenos, especialmente los virus, los cuales tienen una limitada capacidad codificante y dependen en gran medida de las interacciones proteína-RNA para utilizar la maquinaria de la célula huésped (Jansen et al., 2021). Con respecto al DENV, se conoce de proteínas del hospedero que interactúan directamente con el genoma viral y para la función de estos factores del hospedero sobre el DENV, son necesarios elementos reguladores en *Cis* en el genoma viral, los cuales están presentes en las regiones 3' y 5'UTR del RNA genómico viral (Clyde et al., 2006; Randall et al., 2007). Estas interacciones ayudan a la transcripción, traducción, replicación y síntesis de partículas virales; sin embargo, también se han identificado interacciones con proteínas del hospedero que inhiben los procesos antes mencionados, sugiriendo que los factores del hospedero que se unen al genoma del virus pueden tener un efecto tanto proviral como antiviral (Tabla 2).

En la actualidad, en líneas celulares de vertebrados se continúa estudiando las proteínas del hospedero que pueden interactuar con el genoma de DENV y se han encontrado proteínas con efecto tanto proviral como antiviral (Tabla 2). En contraste, hay poca información acerca de las proteínas del mosquito vector que pueden interactuar con el genoma de DENV, por lo que aún queda mucho por investigar sobre los mecanismos moleculares que se llevan a cabo en el mosquito durante la infección por virus dengue (Sessions et al., 2009).

Proteínas celulares del hospedero que interaccionan con el genoma de DENV

Proteína celular	Interacción	Participación	Referencia
RNA helicasa dependiente de ATP (DDX6)	Estructuras DB1 y DB2 ubicadas en Región 3'-UTR del genoma viral	Replicación viral Síntesis de partículas virales	Ward et al., 2011
G3BP1, G3BP2, Caprin1 y USP10,	Región 3'-UTR del genoma viral	Replicación viral	Ward et al., 2011
Proteína La (antígeno B del síndrome de Sjögren's)	Región 3'-UTR de la cadena negativa y positiva del genoma viral.	Inhibe replicación viral	Yocupicio-Monroy et al., 2007
Proteína de unión a la caja Y (YBX1)	Región 3'-UTR del genoma viral	Regulación de la transcripción y traducción viral	Paranjape and Harris, 2007
hnRNP A1, A2/B1 y hnRNPQ	Región 3'-UTR del genoma viral	Transcripción del genoma viral	Paranjape and Harris, 2007
Proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB)	Región 3' y 5'-UTR del genoma viral	Inhibición de la replicación viral	Anwar et al., 2009
NF90	Stem Loop ubicado en región 3'-UTR del genoma viral	Regulador positivo de replicación viral	Gomila et al., 2011
Exoribonucleasa 3 (ERI3)	Región 3'-UTR	Síntesis de RNA viral y partículas virales	Ward et al., 2016
hnRNP M y hnRNP F	Región 3'- y 5'-UTR del genoma viral	Estabilidad y replicación del genoma viral .	Viktorovskaya et al., 2016
RNA helicasa A (RHA)	Stem Loop ubicado en región 3'-UTR del genoma viral	Replicación viral	Wang et al., 2019

Tabla 2. Proteínas del hospedero que interaccionan con el genoma de DENV.

5.8 Proteínas no estructurales (NS) de DENV y su interacción con factores del hospedero.

Las proteínas del hospedero interaccionan tanto con el genoma de DENV, como con las proteínas no estructurales (NS), las cuales son codificadas por el genoma viral y participan en los mecanismos de replicación y ensamblado de los nuevos viriones. Por lo tanto, la identificación y caracterización de factores del hospedero que interactúan con las proteínas NS del virus, son importantes para nuestro entendimiento de los mecanismos moleculares de la replicación de DENV (Paranjape y Harris, 2007).

Para la síntesis del DENV, las proteínas virales NS (NS2A, NS2B, NS4A, NS4B, NS3 y NS5) forman el complejo replicativo (RC), una estructura membranosa generada en el retículo endoplásmico (RE) (Lescar et al., 2018). Los RC aparecen durante la infección de algunos flavivirus en líneas celulares tanto de vertebrados como de invertebrados, incluyendo células C6/36 derivadas del mosquito *Ae. albopictus* (Junjhon et al., 2014; Barreto-Vieira et al., 2020). Algunas de las proteínas del hospedero que interaccionan con proteínas NS de DENV, son: las subunidades 1 y 3 del complejo péptido señal (SPCS1 y SPCS3), que se ha demostrado que ayudan al procesamiento de la poliproteína del virus y la oligosacaril transferasa (OST), la cual interacciona y glucosila a NS1 y NS4B, lo cual es esencial tanto para la síntesis del genoma viral como para el establecimiento de la infección (Zhang et al., 2016; Lin et al., 2017; Hafirassou et al., 2017). Por otro lado, proteínas del complejo Hdr1 (complejo proteico anclado a la membrana del retículo endoplásmico, encargado de reconocer proteínas mal plegadas o subunidades huérfanas, para someterlas a traslocación, ubiquitinación y degradación proteosomal), como Hrd1, Derlina 2 y Ube2j1, son necesarias para la replicación de DENV, pero sólo Derlina 2 y Ube2j1, interaccionan con la proteína viral NS5 de DENV, interacciones que son claves para la replicación del virus (Krishnan et al., 2008; Mairiang et al., 2013; Rothan and Kumar, 2019), mientras que la proteína DNAJC14 es responsable de

estabilizar el complejo replicativo e interactuar con NS3 y NS4B de DENV (Yi et al., 2012).

Por otro lado, la proteína Reticulón 3.1A (RTN 3.1A), una proteína que reside principalmente en retículo endoplásmico y aparato de Golgi también facilita la replicación de WNV, ZIKV y DENV (Aktepe et al., 2017). Se ha propuesto que la interacción directa o indirecta de RTN 3.1A con la proteína viral NS4A, facilita la formación del complejo de replicación, ya que se ha visto que la ausencia de RTN 3.1A promueve la degradación de la proteína NS4A y eventualmente frustra la formación del complejo de replicación y por ende la producción de partículas virales (Aktepe et al., 2017). El complejo de membrana del retículo endoplásmico (EMC), también juega un papel muy importante en la replicación de varios flavivirus (Savidis et al., 2016) y se ha propuesto que EMC puede actuar como una chaperona del ER para el procesamiento de proteínas de múltiples pasos transmembrana (Shurtleff et al., 2018), tal como lo son las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B, necesarias para la replicación de los flavivirus. Hasta el momento, solo se ha reportado que EMC promueve la biogénesis de las proteínas NS4A y NS4B de DENV y ZIKV (Lin et al., 2019). También se ha reportado que EMC interactúa con NS4A y colocaliza con organelos de replicación de DENV (Lin et al., 2019), por lo tanto, EMC es considerado un factor del hospedero de vital importancia para la replicación de flavivirus (Barrows et al., 2019).

La proteína gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenas (GAPDH), es otro factor del hospedero que participa en el ciclo replicativo de DENV. Cuando GAPDH interactúa con la proteína NS3, ocurre una disminución de la actividad glucolítica de GAPDH, lo cual provoca alteraciones metabólicas en la célula hospedera, que contribuyen a una eficiente replicación y ensamble de DENV durante la infección (Silva et al., 2019). Por otra parte, las proteínas atlastina 2 y 3 (ATL2 y ATL3), las cuales son responsables de modelar, construir y estabilizar la red tubular del ER (Rajah et al., 2020), se ha visto que interactúan con las proteínas NS2B, NS3 y NS5 de DENV y ZIKV (Neufeldt et al., 2019; Monel et al.,

2019), y esto es esencial para la formación de los complejos replicativos, los cuales son de vital importancia para la síntesis del nuevo genoma viral.

Otras proteínas del hospedero de las que hay datos iniciales de interacción con proteínas de Flavivirus son las Septinas (familia de proteínas celulares multifuncionales), proteínas que participan en la proliferación del virus de la hepatitis C (HCV) (Kim et al., 2007; Akil et al., 2016) y ZIKV (interacción con Septinas, causa una división celular fallida en las neuronas)(Li et al., 2019). Sin embargo, falta información acerca del papel de las septinas de la célula hospedera durante la infección con los flavivirus (Henzi et al., 2021).

6. Proteínas tipo septina.

Las septinas son una familia de proteínas de unión a GTP, altamente conservadas, las cuales se ensamblan formando complejos hetero-oligoméricos que forman estructuras en forma de filamentos no polares, haces, anillos, jaulas y arreglos en forma de relojes de arena, cada uno con diferentes funciones dependiendo del contexto celular (Mostowy y Shenoy, 2015). Las septinas frecuentemente se asocian con una región discreta de la membrana plasmática y funcionan como anclaje celular o barreras de difusión que controlan la localización de las proteínas durante la citocinesis (Mostowy y Shenoy, 2015; Oh and Bi., 2011). Las septinas fueron identificadas originalmente en mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con defectos morfológicos y en la citocinesis (Hartwell, 1971; Weirich et al., 2008). El origen del nombre de esta proteína es porque durante la gemación de la levadura se localizan formando septos en el cuello del brote naciente, y se les considera el “cuarto componente” del citoesqueleto debido a su apariencia filamentosa, su asociación con filamentos de actina y microtúbulos (Gavrila y Gavrila., 2008), con la membrana plasmática (Mostowy y Cossart. 2012), y su participación en la dinámica del citoesqueleto y remodelamiento de membranas (Pham et al., 2014; Dolat y Spiliotis., 2016). Las septinas también participan en división, transporte y migración celular, mitosis, apoptosis, ramificación neuronal, morfogénesis de la espina neural,

espermiogénesis e incluso en la interacción patógeno-hospedero (Mostowy y Shenoy, 2015; Oh and Bi., 2011; Weirich *et al.*, 2008).

6.1 Estructura de las Septinas

Las septinas pertenecen al grupo de las proteínas pequeñas de unión a GTP de 30-60 kDa parecidas a las *P-loop* GTPasas, una super familia de proteínas que incluye a las proteínas cinesina, miosina y ras (Pan *et al.*, 2007). Las *P-loop* GTPasas poseen cinco dominios conservados dentro del dominio de unión a GTP designados como G1 a G5. El motivo G1 forma un *loop* flexible que interactúa con el grupo fosfato del nucleótido, el motivo G2 es conservado dentro de familias individuales de GTPasas, pero no a través de todas las clases; el motivo G3 contiene varios residuos hidrofóbicos, en esta región se une Mg²⁺ y puede interactuar con β y γ fosfatos de GTP, el motivo G4 es importante para la especificidad de unión a GTP y, por último, el motivo G5 es encontrado sólo en algunos de los miembros de la clase de *P-loop* GTPasas (Pan *et al.*, 2007). En particular, las septinas sólo contienen los motivos G1, G3 y G4 de unión a GTP; el elemento único de septina (SUE) que es una región de 53 aminoácidos altamente conservados con función desconocida; hacia el extremo C-terminal tiene un dominio *coiled coil*, el cual es necesario para la interacción entre septinas y en su extremo N-terminal un dominio rico en prolina y una región polibásica, la cual es necesaria para su interacción con lípidos de membrana (**Figura 4**). Entre las septinas tanto la composición de aminoácidos, como la longitud de estos dominios es variable (Mostowy y Cossart. 2012; Pan *et al.*, 2007).

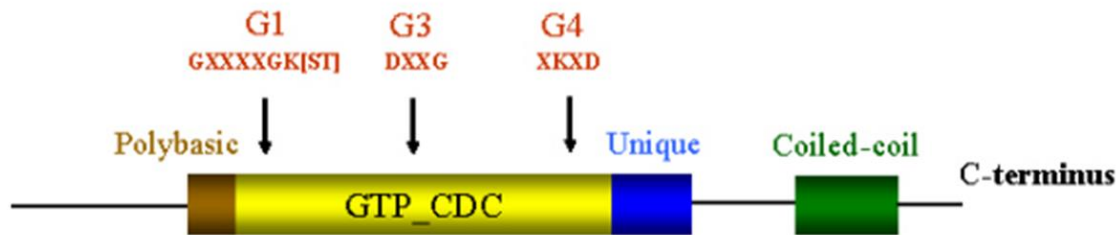


Figura 3. Dominios de proteínas tipo septina. Las septinas están constituidas por los dominios G1, G3 y G4 (Barra amarilla), los cuales interactúan con el nucleótido Guanina del GTP. La región polibásica (barra café) es un dominio que le permite a estas proteínas interactuar con lípidos de membrana. El dominio *coiled coil* (barra verde) ayuda a estabilizar la interacción entre septinas; la secuencia única de Septinas (barra azul), es una secuencia altamente conservada presente solo en esta familia de proteínas (Imagen de Pan *et al.*, 2007).

6.2 Clasificación de las septinas

Las septinas se clasifican con base en la similitud de sus secuencias primarias (Mostowy y Shenoy, 2015; Pan *et al.*, 2007) en cinco grupos, en el uno y dos están presentes moléculas de hongos y animales, mientras que los grupos tres, cuatro y cinco son específicos de hongos (Pan *et al.*, 2007; Weirich *et al.*, 2008). Las septinas de vertebrados, incluyendo al humano, son clasificadas dentro de cuatro grupos, denominados con el nombre de sus miembros fundadores: SEPT2 (SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5), SEPT3 (SEPT3, SEPT9, SEPT12), SEPT6 (SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14) y SEPT7 (miembro único). La mayoría de las septinas tienen actividad de GTPasa (habilidad para unir e hidrolizar GTP), pero ésta ausente en las septinas del grupo SEPT6 (Mostowy y Cossart, 2012). Se ha considerado que las septinas de vertebrados no tienen ortólogos claros en los invertebrados (Mostowy y Cossart, 2012).

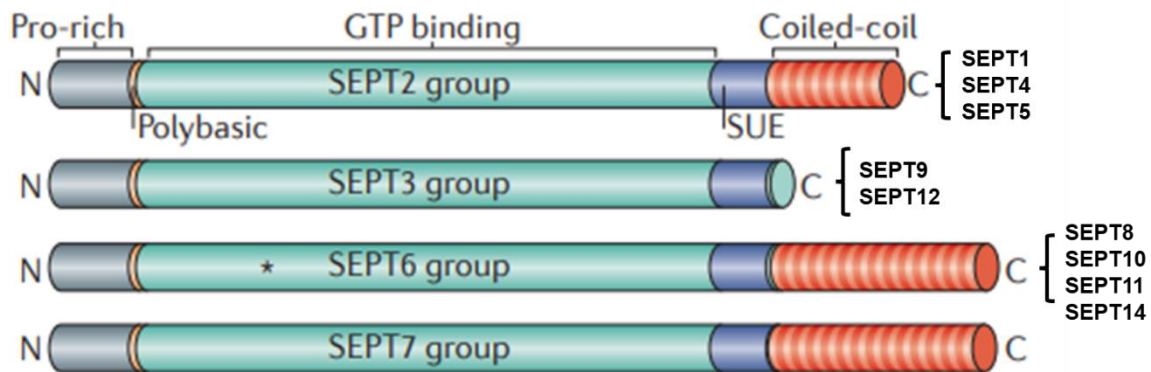


Figura 4. Clasificación de Septinas de humano. Las Septinas de humano están clasificadas dentro de cuatro grupos (SEPT2, SEPT3, SEPT6 y SEPT7), basado en similitud de secuencias. Las septina del grupo SEPT3, carecen del dominio Coiled Coil, mientras que las Septinas del grupo SEPT6, carecen de un residuo de treonina en la posición 78 (indicado con asterisco), lo cual previene la hidrólisis de GTP a GDP. Las regiones N y C terminal de estas proteínas son de longitud variable. (Imagen de Mostowy y Cossart., 2012).

6.3 Organización estructural de las Septinas.

Las septinas tienen la habilidad de organizarse en estructuras complejas usando regiones específicas para la interacción, éstas incluyen el dominio de unión a GTP (dominio de interfaz G) y las regiones de los extremos N-terminal y C-terminal (dominios de interfaz NC). Las septinas pueden formar heterooligómeros, los cuales forman complejos en forma de barras, y éstos a su vez, pueden formar filamentos y otras estructuras tales como anillos. Aunque las septinas forman hexámeros, la organización más común de multímeros de septina son los heterooctámeros palindrómicos (dos tetrámeros colocados cabezas a cabeza con subunidades de cada uno de los cuatro grupos). Las septinas del mismo grupo pueden intercambiarse en sus respectivas posiciones para generar oligómeros y polímeros de diversas combinaciones (Beise y Trimble. 2011; Valadares et al., 2017). Los oligómeros de septinas a su vez se ensamblan en multímeros filamentosos de orden superior cuya localización, parejas de unión y propiedades funcionales están determinadas por sus subunidades individuales (Valadares et al., 2017). Además, es de resaltar que,

en todos los casos, la estructura y el orden de monómeros de septina en el complejo, son ordenados de forma no polar, en contraste con la estructura de los filamentos de actina y microtúbulos (**Figura 6**) (Mostowy y Cossart. 2012; Beise y Trimble. 2011; Neubauer and Zieger., 2017; Abbey et al., 2019; Spiliotis y Kesisova, 2021).

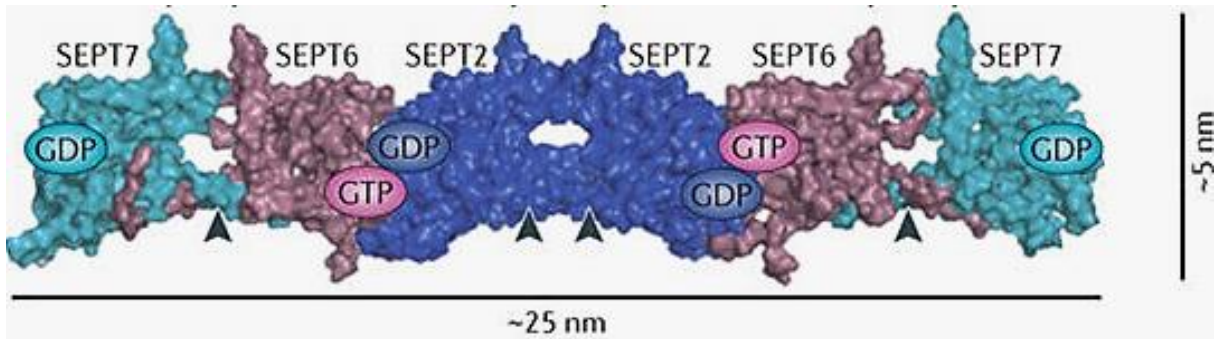


Figura 5. Modelo del ensamblaje de los complejos hetero-oligoméricos de septinas de mamíferos. En mamíferos, las septinas forman hexámeros con el patrón Sept7/6/2/2/6/7 u octámeros Sept9/7/6/2/2/6/7/9 con la interacción de Sept9 a Sept7 en ambos extremos del oligómero. En los hetero-oligómeros, las septinas no interactúan con septinas del mismo tipo, excepto la Sept2, la cual se encarga de nuclear la formación de los oligómeros. Imagen tomada de Mostowy y Cossart., 2012.

6.4 Modificaciones post-traduccionales de las septinas

Las modificaciones post-traduccionales (**PTMs**) juegan un papel muy importante en la regulación de las interacciones septina-septina y la formación de los complejos de septinas de orden superior. Las septinas, al igual que otras proteínas, sufren cambios post-traduccionales como SUMOilación, ubiquitinación, acetilación y fosforilación (Rodríguez y Momany, 2012).

6.4.1 SUMOilación de septinas.

La SUMOilación (*Small Ubiquitin-like modifiers, SUMOs*) es una PTM parecida a ubiquitinación. En *S. cerevisiae* se ha encontrado que las septinas pueden ser modificadas covalentemente por SUMOilación durante el ciclo celular y que mutaciones en sitios específicos de SUMOilación, previenen el desensamblaje de

estructuras de orden superior, tales como anillos (Ribet et al., 2017). Es importante señalar que las modificaciones SUMO de las Septinas, pueden encontrarse tanto en el extremo N- como en el C-terminal, regiones que en esta familia de proteínas son altamente divergentes (Rodriguez y Momany, 2012). Un ejemplo de la importancia de la SUMOilación es un switch de acetilación/sumoilación que controla la localización de la septina Cdc11 de levadura, durante el ciclo celular (Kim et al., 2017).

6.4.2 Acetilación de septinas.

En *S. cerevisiae* se ha documentado que las septinas Cdc3, Cdc10, Cdc12 y Shs1 contienen múltiples sitios de acetilación que podrían intervenir en las interacciones proteína-proteína y ser parte de un mecanismo de regulación en la dinámica de las septinas (Mitchel et al., 2011). La acetilación también se ha observado en la septina Cdc11 de *Candida albicans*, tanto en la forma de levadura como en la de hifa, pero su papel aún no está claro. También se ha documentado la acetilación de las septinas AspA y AspC (ortólogos de Cdc11 y Cdc12) de *Aspergillus nidulans*. Los sitios de acetilación de septinas de hongos se han mapeado en las regiones N y C terminal, además de la región que forma el dominio de interfase G. Dado que esta región es esencial para la formación de estructuras complejas, es probable que la acetilación influya en el ensamble y estabilidad de hetero-polímeros (Rodriguez y Momany, 2012).

6.4.3 Fosforilación de septinas.

La fosforilación es un mecanismo muy importante en la regulación de las funciones las septinas. En las septinas de hongos se han predicho hasta 59 sitios de fosforilación, las cinasas Cdc28, Cla4 y Gin4 son las responsables de fosforilarlas y estas señales participan en la coordinación del ensamble y desensamble de los anillos de septina durante morfogénesis y citocinesis (Rodriguez y Momany, 2012). Al igual que otras PTMs, los sitios de fosforilación en las septinas están generalmente dispersos en los extremos divergentes N y C

(Rodríguez y Momany, 2012). Se ha descrito la dinámica de la formación y eliminación de algunas PTMs de las Septinas, durante el ciclo celular y/o en estadios de desarrollo de organismos completos. Por ejemplo, durante el ciclo celular de *S. cerevisiae*, la septina Shs1/Sep7 es fosforilada por la cinasa Gin4 sólo durante el proceso de citocinesis y una vez terminado, la septina Shs1/Sept7 es desfosforilada (Oh y Bi., 2011; Dobbelaere et al., 2003).

Las PTMs de las septinas pueden promover la formación de anillos y filamentos de septina y a su vez organizar racimos curvos de filamentos de actina. Los filamentos de actina también pueden participar en la nucleación de filamentos de septina, incluso bajo condiciones donde las septinas por si solas no forman filamentos (Mavrakís et al., 2014). En *Homo sapiens* la SEPT7 es un componente de todos los filamentos de septina. SEPT7 es fosforilada en el residuo de Thr197 por la proteína cinasa A (PKA), lo cual reduce la interacción SEPT7-SEPT7, e impide la formación de los filamentos de septina y la formación de cilios (Wang et al., 2021). La SEPT12 de mamíferos también es fosforilada en Ser198 por la PKA, lo cual interfiere con su polimerización y formación de complejos y filamentos que regulan la espermiogénesis (Lin et al., 2019). En *Drosophila*, las septinas Pnut, Sep1 y Sep2 forman un complejo hexamérico, donde se ha observado que Pnut/Sep7 (homólogo de SEPT7 de humano) es fosforilada en Thr197 por PKA durante el inicio del desarrollo embrionario, lo cual rompe el ensamblaje de los filamentos de septina (Akhmetova et al., 2018; Wang et al., 2021). La fosforilación de SEPT7 tiene un papel importante en la regulación de las funciones del complejo de septinas durante la embriogénesis (Akhmetova et al., 2018; Wang et al., 2021).

6.5 Funciones de las septinas

Las septinas participan en procesos celulares que incluyen citocinesis, ciliogénesis y neurogénesis, trabajando como *scaffolds* reclutando proteínas que pueden formar barreras de difusión para compartimentalizar dominios celulares discretos (Mostowy y Cossart. 2012). Además, durante la interacción

microorganismo patógeno-hospedero las septinas pueden ser parte de la inmunidad innata o, por el contrario, ser usadas por bacterias patógenas durante el proceso de infección (Mostowy y Cossart. 2012; Torraca y Mostowy. 2016) y, en los últimos años, se les ha vinculado con la proliferación de agentes virales dentro de la célula hospedera (Henzi et al., 2021).

6.5.1 Septinas y citocinesis.

La división celular es un evento crítico para el desarrollo de organismos multicelulares y requiere que varios procesos se realicen de forma precisa como ocurre con la segregación cromosomal y la división del citoplasma durante la citocinesis, para asegurar que cada célula hija reciba el complemento correcto de cromosomas y material celular. En mamíferos la división celular involucra la formación de un anillo contráctil en el que participan las septinas, el cual es responsable de dividir a la célula madre en dos células hijas. En células HeLa se ha observado que el silenciamiento de las Septinas 2, 6 y 7 tiene como consecuencia fallas en la citocinesis, lo cual ocasiona la formación de células multinucleadas (Kremer et al., 2005). En otros trabajos se ha demostrado que la septina 2 actúa como una proteína *scaffold*, tanto para la miosina II, como para su cinasa, en el surco de escisión de la célula en división (Joo et al., 2007). También se ha observado que la septina 7 media la localización del complejo CENP-E (Proteína E asociada a centrómero) a los cinetocoros, lo cual es esencial para una adecuada segregación cromosomal (Estey et al., 2010).

En *S. cerevisiae* se han identificado cerca de 40 proteínas que se localizan en el cuello del brote de la célula en división, de manera dependiente de septinas, las cuales actúan como *scaffold*, reclutando proteínas esenciales para la citocinesis (Beise y Trimble, 2011). Por ejemplo, en *S. cerevisiae* cuando ocurre la degradación de la cinasa Swe1p, un regulador negativo de citocinesis, se da paso a la progresión de la mitosis y esto ocurre cuando las septinas anclan o reclutan múltiples proteína cinasas en el cuello del brote de la célula madre en división. Además, también se ha visto que la función de *scaffold* de las septinas ayuda al

posicionamiento correcto del huso mitótico y la subsecuente segregación de los cromosomas (Beise y Trimble, 2011).

6.5.2 Septinas y tráfico vesicular

Las septinas participan en el tráfico vesicular con efectos diversos en los fenotipos celular y de organismo. En cerebro de ratas y en células PC12 de feocromocitoma de rata, las septinas se asocian al exocisto, un complejo evolutivamente conservado constituido de múltiples subunidades proteicas, requerido para la movilización de vesículas post-Golgi a la membrana plasmática y que en las neuritas promueve la extensión polarizada (Vega y Hsu, 2003; Oh y Bi., 2011). Debido a que las septinas también interactúan con la membrana plasmática y sintaxinas, las septinas pueden actuar como una plataforma para la movilización de vesículas, al interactuar con múltiples factores de exocitosis en la membrana plasmática (Oh y Bi., 2011). También se especula que las septinas participan en vías de endocitosis dependientes de dinamina (proteína encargada de la fisión de vesículas) y/o actina, tal como endocitosis mediada por clatrina, formación de caveolas y macropinocitosis (Maimaitiyiming et al., 2013; Song et al., 2016; Veiga y Cossart., 2006). Además, debido a su afinidad a fosoinositidos (PI) (Fosfolípidos de carga negativa), las septinas han sido identificadas en cuerpos vesiculares tales como endosomas, autofagosomas y macropinosomas, los cuales poseen en su membrana especies de PI (Song et al., 2016).

6.5.3 Septinas e inmunidad.

En mamíferos, se ha documentado que las septinas son abundantemente expresadas en macrófagos, linfocitos y células dendríticas. Sin embargo, su participación en el desarrollo y su función en células inmunes se mantiene pobremente entendido. En macrófagos, solo se conoce que las septinas 2 y 11 participan en la formación de fagosomas que ayudan al ingreso del patógeno, pero el silenciamiento de estas proteínas inhibe el proceso de fagocitosis. Por otra parte, se ha documentado que el silenciamiento de septina 7 causa alteraciones en la morfología celular de linfocitos T, ocasionado por una

disminución en la rigidez de la membrana celular, así como defectos en la motilidad, características que provocan una velocidad de rastreo reducida durante su migración (Tooley et al., 2009; Ivanov et al., 2021). Por otra parte, la ausencia de septina 9 impacta negativamente en otros aspectos del desarrollo y función de células T. En ratones deficientes de septina 9, se genera un defecto de maduración celular asociado a una disminución en la capacidad de proliferación de células T CD8+. Mientras que células T CD8+ deficientes de septina 7, presentan reducción en proliferación y fallas en citocinesis después de ser estimuladas con activadores inmunes solubles, tal como: citocinas, Ester de forbol o ionomicina (Ivanov et al., 2021).

6.5.4 Septinas en la interacción patógeno-hospedero.

Las septinas también participan en la interaccionan patógeno-hospedero. En células HeLa, CHO y JPG-3, la septina 2 (Sept2) es necesaria para la internalización de patógenos intracelulares, tales como *Lysteria monocytogenes* y *Shigella flexnery* y el silenciamiento de Sept2 disminuye la entrada de estos patógenos a la célula huésped (Huang et al., 2008; Robertin y Mostowy. 2020). Se ha determinado que Sept2 está localizada en el sitio de interacción entre el patógeno y la membrana plasmática del hospedero, ubicándose en el sitio de la copa fagocítica naciente (Huang et al., 2008) y se considera que Sept2 es importante para patógenos que entran a la célula mediante la formación del fagosoma (Mostowy et al., 2009; Mostowy et al., 2010; Mostowy et al., 2011). Además, las septinas también participan en la eliminación de patógenos, por ejemplo, una vez que *S. flexnery* ha ingresado a la célula, secreta la proteína IcsA, la cual secuestra a la proteína celular N-WASP (proteína neural del síndrome de Wiskott-Aldrich) y ésta a su vez recluta a la proteína ARP 2/3, una proteína que ayuda al patógeno a formar tallos de actina, una característica necesaria para la diseminación de la bacteria dentro de la célula. Sin embargo, la formación de los tallos de actina promueve la ubiquitinación del patógeno y con ello el reclutamiento de las septinas (Sept2, 6, 7 y 9), las cuales forman estructuras en forma de jaula alrededor del patógeno y evitan su propagación

(Mostowy et al., 2010). Además, las jaulas de septina permiten el reclutamiento de proteínas (P62, NDP52, ATG5, LC3/ATG8) que inician la formación de autofagosomas, estructuras membranosas que se encargan de eliminar al patógeno (Mostowy et al., 2011). Por otro lado, *S. flexneri* puede evadir su eliminación a partir de la síntesis de una segunda proteína de superficie denominada IcsB, la cual inhibe la formación de jaulas de septina en la superficie de la bacteria, así como el reclutamiento de los marcadores tempranos de autofagia (Mostowy et al., 2009; Mostowy et al., 2010; Mostowy et al., 2011; Mazon et al., 2014; Mostowy y Shenoy. 2015; Krokowski y Mostowy. 2016) Un fenómeno similar ocurre con *L. monocytogenes*, la cual secreta la proteína ActA, responsable de secuestrar al complejo ARP2/3 para formar tallos de actina, para poder diseminarse dentro de la célula, pero la usencia de esta proteína provoca la eliminación directa del patógeno vía autofagia, pero sin la participación de septinas (Figura) (Mostowy et al., 2011; Padrick et al., 2011).

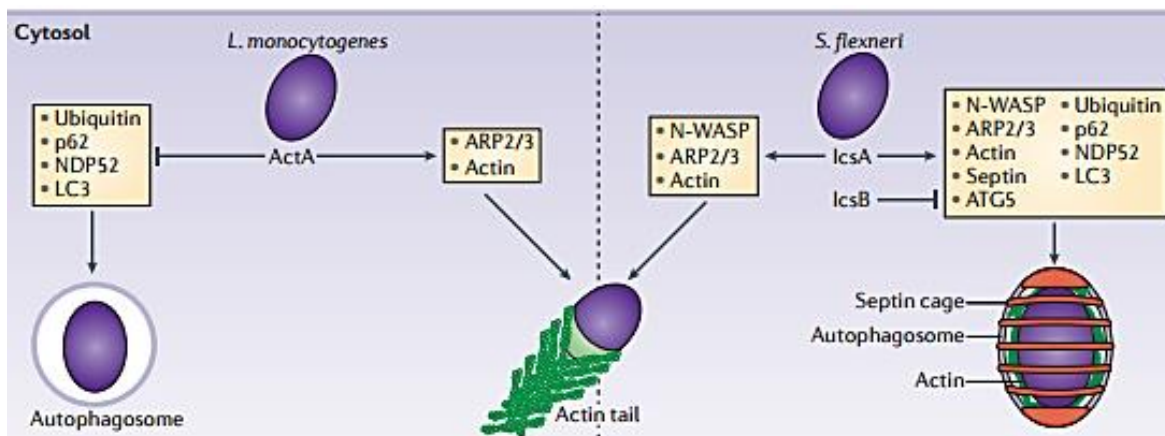


Figura 6. Patógenos intracelulares y septinas. *L. monocytogenes* y *S. flexneri*, secretan proteínas efectoras (ActA e IcsA respectivamente) que ayudan a la formación de tallos de actina, necesarios para su diseminación intracelular. En *S. flexneri*, los tallos de actina permiten la formación de jaulas de septina, estructuras implicadas en eliminar este patógeno vía autofagia; sin embargo, la secreción por la bacteria de una segunda proteína efectora (IcsB), evita la eliminación. En *L. monocytogenes*, la secreción de su única proteína efectora (ActA) permite la formación de tallos de actina para la diseminación del patógeno y al mismo tiempo inhibe su eliminación vía autofagia (Imagen de Mostowy y Shenoy., 2015).

La formación de jaulas de septina también ocurre cuando *Chlamydia trachomatis* infecta células HeLa. En este caso, el patógeno se replica dentro de vacuolas de inclusión, estructuras que son reconocidas y enjauladas por filamentos de septina 2 y 7, las cuales, en conjunto con filamentos de actina, son necesarias para la liberación del patógeno al medio extracelular, lo cual se comprobó con el silenciamiento de Sept2 y Sept7, lo que provoca una reducción sustancial de la liberación de *C. trachomatis* al exterior de la célula (Volceanov *et al.*, 2014). En otro caso, la fosforilación de septina 9, la cual está acoplada con la dinámica de la actina en la formación de los pedestales de membrana, es requerida para la adherencia y virulencia de *E. coli* enteropatogénica (EPEC); el silenciamiento de septina 9 y mutantes deficientes en fosforilación, disminuyen la adherencia a la célula hospedera y la muerte celular (Scholz *et al.*, 2015). Un efecto similar se observó en *Clostridium difficile*, el cual se une a la célula hospedera utilizando proyecciones de membrana (constituidas de septina y microtúbulos), estructuras que son desencadenadas por la toxina *Cl. difficile* transferasa (CDT), la cual despolimeriza la actina y promueve el reclutamiento de las septinas 2, 6, 7 y 9 al sitio de la adhesión de la bacteria, las cuales junto con los microtúbulos inician la formación de proyecciones de membrana que rodea a la bacteria, provocando una fuerte adherencia con la célula huésped (Nölke *et al.*, 2016).

Por otro lado, *Candida albicans*, un patógeno que invade células endoteliales a través de endocitosis (Warenda *et al.*, 2003), también utiliza a las septinas. Durante la invasión a la célula huésped *C. albicans* expresa las invasinas Als3 y Ssa1, proteínas responsables de reclutar a Sept7, N-cadherina y microfilamentos de actina, las cuales rodean al patógeno para ayudarlo a ingresar a la célula huésped (Phan *et al.*, 2013). Se ha observado que el silenciamiento de Sept7 inhibe significativamente la endocitosis de *C. albicans*, demostrando que esta septina es de vital importancia para el ingreso del patógeno a células endoteliales mediante endocitosis (Phan *et al.*, 2013). En estos ejemplos hay casos donde las Septinas participan en los mecanismos de defensa del hospedero o, inversamente, en el establecimiento de la infección y, en base a estas

observaciones se podrán sugerir nuevas ideas de su interacción con el citoesqueleto y nuevos papeles en los procesos de tráfico de membrana, autofagia y dinámica de mitocondrias (Torraca y Mostowy., 2016; Siriani *et al.*, 2016).

6.5.5 Septinas y virus

Además de participar en la interacción de la célula huésped con patógenos bacterianos y fúngicos, las septinas también desempeñan un papel importante durante las infecciones virales. En células HeLa infectadas con Vaccinia virus (virus de DNA de doble cadena, grande y citoplasmático), las septinas actúan como factores antivirales. Durante la infección, las septinas 2, 7, 9 y 11, incrementan su expresión y forman un complejo funcional en forma de jaula alrededor del patógeno, lo cual evita la replicación del virus. En acuerdo con lo anterior, el silenciamiento de la septina 2, 7 y 11, con RNAi provoca el incremento en la replicación del virus, siendo el silenciamiento de septina 11 la que produce el efecto más significativo (Beard *et al.*2014).

Las septinas también participan en la replicación o proliferación del Virus de la Hepatitis C (HCV). En células Huh7 infectadas con HCV, se demostró que la septina 6 interacciona con la proteína viral NS5b (RNA polimerasa dependiente de RNA) y con la proteína celular hnRNP A1 (Proteína de unión a RNA que ayuda al transporte del RNA entre el núcleo y citoplasma y al *splicing*); estas interacciones son importantes para la proliferación del virus; durante la infección viral, septina 6 recluta a la proteína hnRNP A1, la cual interacciona con los UTRs 5' y 3' del RNA del HCV que contienen los elementos *cis* internos requeridos para la replicación del virus, y esta interacción ayuda a la generación de nuevo genoma viral y células mutantes en hnRNP A1 y septina 6, reducen la replicación de HCV (Kim *et al.*, 2007). Todos estos resultados indican que tanto la proteína hnRNP A1 como la septina 6, son secuestrados por HCV para formar un complejo con la proteína NS5B y el RNA viral durante la replicación de su genoma. Además, se especula que la septina 6 puede ser responsable de posicionar el

complejo de replicación a un compartimiento membranosos en la célula y reclutar otras proteínas celulares, necesarias para la replicación del RNA de HCV (Kim *et al.*, 2007). En otro estudio, se observó que en células Huh7.5 infectadas con HCV, la septina 9 incrementa su expresión y, al mismo tiempo, también se incrementan los filamentos de septina 2 y 9, así como las gotas lipídicas, las cuales son necesarias para la propagación viral y producción de viriones. Cuando la septina 9 fue silenciada con RNAi se generó una reducción en la cantidad de gotas lipídicas, así como una reducción significativa en la replicación de HCV (Akil *et al.*, 2016). Estos resultados, sugieren que las septinas 2, 6 y 9, son esenciales para la proliferación de HCV.

A pesar de todo lo anterior, aún se necesitan más estudios para entender que otras funciones podrían desempeñar las septinas del hospedero durante la infección con diferentes agentes patógenos, bacterias, hongos y virus.

6.6 Septinas en insectos

Las proteínas tipo septina son conservadas en la evolución, y aunque en los genomas de diversos insectos se encuentran genes candidatos a codificar para estas proteínas, solo se han caracterizado en *D. melanogaster*. En ese organismo existen cinco genes que codifican septinas: Sep1, Sep2, Sep4, Sep5 y Pnut/Sept7. Las septinas Pnut, Sep1 y Sep2 (homólogos de las septinas humanas SEPT7, SEPT6 y SEPT2, respectivamente) pueden formar complejos hetero-hexaméricos con dos de cada una de estas subunidades de septinas (Field *et al.*, 1996; Huijbregts *et al.*, 2009), formando a su vez, filamentos no polares que pueden ensamblarse en estructuras de orden superior, como anillos. Las septinas 2 y 5 son de vital importancia durante la ovogénesis (Guruharsha *et al.*, 2011; O'Neill y Clark, 2013; 2016). En cuanto a las septinas 1, 4 y Pnut juegan un papel esencial durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* (Fares *et al.*, 1995; Field *et al.*, 1996; Adam *et al.* 2000; Akhmetova *et al.*, 2018). También se ha determinado su participación en citocinesis (Shih *et al.*, 2002), así como su interacción con la membrana celular y componentes del citoesqueleto como:

microtúbulos, filamentos de actina y con la miosina no muscular tipo II (Mavrakis *et al.*, 2014; Mavrakis *et al.*, 2016; Mavrakis. 2016). Para el caso de otros insectos, la información es limitada y solo se conoce la presencia de estas proteínas a través de análisis bioinformáticos de bases de datos (Pan *et al.*, 2007).

6.6.1 Septinas en mosquitos

En la actualidad, únicamente en el mosquito *Ae. albopictus* se ha identificado la expresión de un gen que codifica para una septina similar a Pnut, la cual, durante el ciclo de vida del mosquito, no presenta cambios en su expresión entre las etapas de desarrollo larvario, pero sí tuvo un cambio significativo en su expresión durante la etapa de mosquito adulto (Avicor *et al.*, 2016). En *D. melanogaster* se observó un efecto similar con Pnut, lo cual puede ser justificado al considerar que esta septina es requerida en gran cantidad para procesos específicos como ovogénesis y espermatogénesis, lo cual ocurre únicamente en las etapas de mosquito adulto (Avicor *et al.*, 2016). El estudio de proteínas tipo septina en insectos, es necesario para entender sus funciones específicas en invertebrados y, dados los antecedentes de sus funciones en inmunidad y/o mantenimiento en los ciclos de patógenos, en mosquito y otros vectores responsables de transmitir enfermedades al hombre.

7. Antecedentes directos

González-Calixto *et al* (2015), trabajando con la línea celular C6/36 derivada del mosquito *Ae. albopictus*, demostraron que cuando las células son sometidas a estrés por ayuno de nutrientes (ausencia de suero fetal bovino en el medio de cultivo) o químico por tratamiento con Dexametasona u hormonal con Prostaglandina E2, ocurren cambios en la abundancia y fosforilación de algunas proteínas. Una de las proteínas identificadas, que cambió ambas características fue la que tiene el número de acceso AAEL004668, la cual al ser analizado el producto predicho a partir del gene en la base de datos de Uniprot, se determinó que es una proteína de unión a GTP perteneciente a la familia de las Septinas y al ser comparada mediante Blast con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), se determinó que es una proteína posiblemente ortóloga a la septina 2 de *D. melanogaster* y la Septina 6 de *Homo sapiens*. Durante la inducción del estrés en células C6/36 con ayuno de nutrientes, la septina AAEL004668 mostró un incremento de 16.8 veces en la fosforilación de los residuos de treonina y 1.43 veces en los residuos de serina. En células tratadas con dexametasona la fosforilación de septina AAEL004668 se vio inhibida, mientras que en el tratamiento con Prostaglandina E2 no hubo cambios en la fosforilación (Gonzalez-Calixto *et al.*, 2015). Estos datos indicaron que la septina AAEL004668 puede responder de forma variable a diferentes tipos de estrés y, posiblemente, estos cambios en la fosforilación estén relacionado con la activación de vías de señalización en las cuales participe esta proteína.

8. Justificación

En los mosquitos del género *Aedes* es importante conocer las moléculas de las células huésped que interactúen con las del virus dengue participando en su desarrollo y con estos datos identificar posibles blancos de intervención en el mosquito.

Considerando que en células de mamífero las septinas son proteínas que participan en múltiples procesos celulares como citocinesis, tráfico vesicular, segregación cromosomal, eliminación de patógenos intracelulares (bacterias y virus), así como su interacción con componentes específicos de virus del género *Flavivirus*, resulta interesante analizar la existencia y expresión de este tipo de proteínas en líneas celulares derivadas de especies de mosquito (*Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*), esto con la finalidad de establecer una posible participación de estas proteínas durante el ciclo replicativo de DENV y con ello enriquecer el conocimiento de la función de proteínas del hospedero durante el proceso de infección del virus dentro de su vector, un conocimiento que hasta la fecha sigue siendo muy limitado.

9. Objetivos

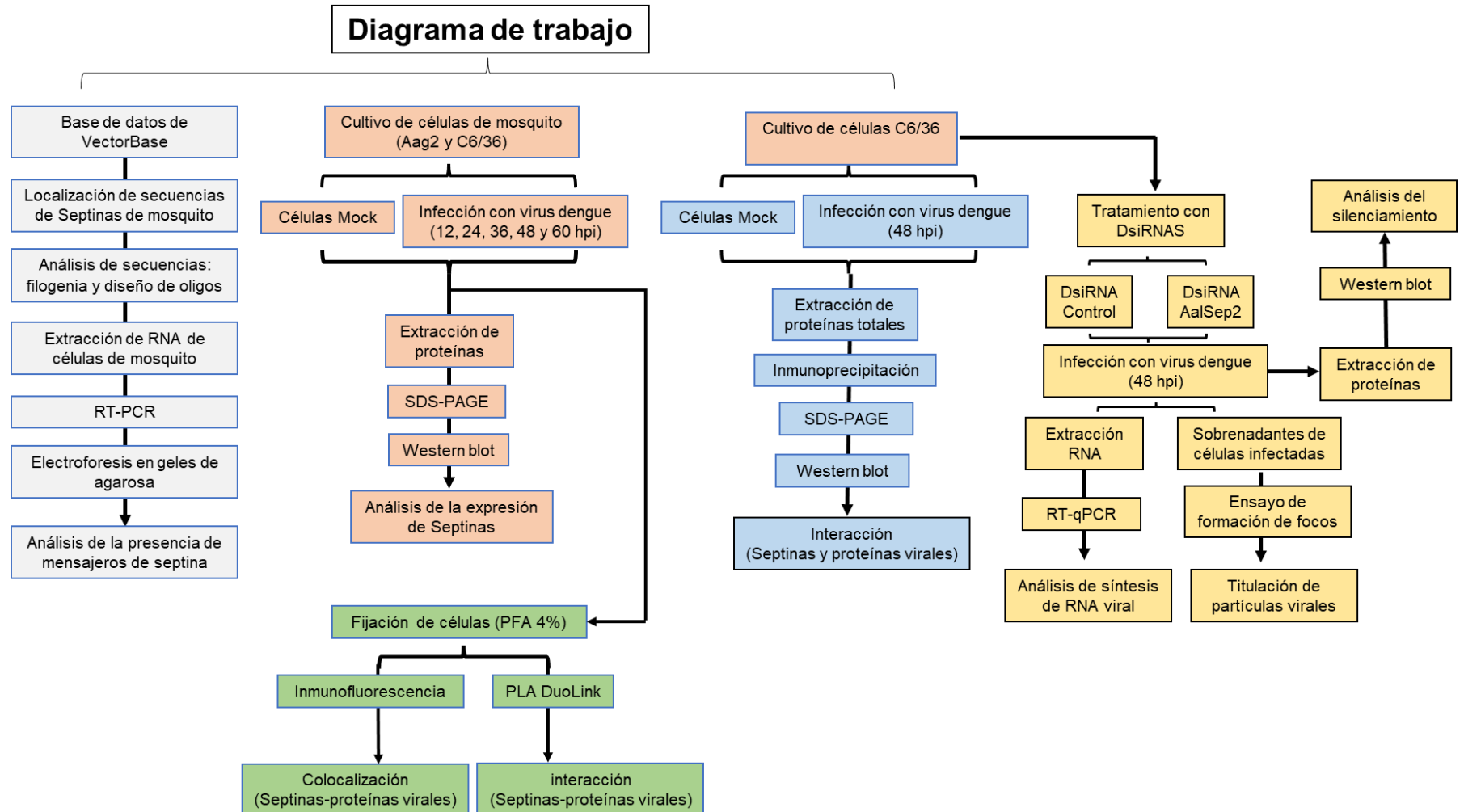
9.1 Objetivo general

Estudiar la participación de las proteínas tipo septina durante el ciclo replicativo del virus dengue en células de mosquito

9.2 Objetivos particulares

1. Identificar y caracterizar *in silico* las septinas de *Aedes sp.*
2. Analizar la expresión de las septinas en células de mosquito sanas e infectadas con DENV.
3. Identificar proteínas de DENV que interactúan con la septina 2 durante la infección de células Aag2 y C6/36.
4. Investigar la función de las septinas en la replicación de DENV.

10. Diagrama de trabajo



11. Material y métodos

11.1 Búsqueda de secuencias tipo septina en mosquitos del género *Aedes*.

La secuencia de aminoácidos de la septina 6 de *H. Sapiens* (HsSept6), obtenida de la base de datos de UniProt con número de acceso Q14141 (<https://www.uniprot.org/>), fue utilizada como molde para buscar secuencias homólogas en las bases de datos de VectorBase específicas de mosquitos (<https://www.vectorbase.org/>). En las secuencias de proteínas tipo septina Tanto del genoma de *Ae. albopictus* como de *Ae. aegypti*, se identificaron los motivos característicos de este tipo de proteínas utilizando el programa SMART (Simple modular Architecture Research Tool; <http://smart.embl-heidelberg.de/>). La presencia de dominios Coiled Coil fue analizada utilizando el servidor PairCoil (<http://cb.csail.mit.edu/cb/paircoil2/paircoil2-like.html>). Además, las secuencias identificadas fueron sometidas a múltiples alineamientos de secuencias y análisis filogenéticos con septinas de *H. sapiens* y *D. melanogaster*, utilizando el programa Clustal W versión 2.0.21 (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Un árbol filogenético fue construido con el software Muscle (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), el cual fue generado a partir de secuencias de aminoácidos y un análisis filogenético fue desarrollado por el método de mínima evolución utilizando el software MEGA-X y valores de *bootstrap* de 1000 réplicas.

11.2 Cultivos celulares

Células de mosquito C6/36 (CRL-1660; ATCC) y Aag2 (Proporcionadas por la Dra. Ma. Isabel Salazar Sánchez de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN) derivadas de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* respectivamente, fueron crecidas a 28°C en medio EMEM (Eagle's minimum essential medium) (30-2003; ATCC), para células C6/36 y medio Schneider para células Aag2. Los medios de cultivo fueron suplementados con suero fetal bovino al 5% (SFB) y 100 U/ml penicilina/estreptomicina. Las células BHK-21 derivadas de riñón de hámster bebe (CCL-10; ATCC), fueron crecidas a 37°C en medio de cultivo EMEM suplementado con SFB al 5% y 100 U/ml penicilina/estreptomicina, mientras que

las células epiteliales Vero E6, derivadas de riñón de mono (CRL-1586; ATCC) fueron crecidas a 37°C en medio de cultivo EMEM suplementado con SFB al 10% y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina.

11.3 Virus

La cepa filipina H241 de dengue serotipo 4 (DENV4), fue propagada en cerebro de ratones lactantes (ICR; CD-1) proporcionados por la unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio del CINVESTAV-IPN, México (UPEAL-CINVESTAV-IPN), como se describió previamente ([Gould, 1991](#)) siguiendo la NOM-062-ZOO-1999, número de protocolo 0098-14. Los títulos de DENV4 en cerebros de ratón homogenizados o en sobrenadantes colectados de células, fueron determinados por ensayos de formación de focos en células BHK-21. Diluciones seriadas de *stocks* virales o sobrenadantes de experimentos (recolectados de células C6/36 o Aag2 infectadas con DENV) fueron diluidos en medio libre de SFB y fueron adicionados a monocapas confluentes de células BHK-21 de una placa de 96 pocillos; el inóculo se incubó durante 2 horas a 37°C (permitiendo la adherencia y entrada del virus). Posteriormente, las células se lavaron con PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.9 mM NaH₂PO₄, 0.8 mM Na₂HPO₄, Ph 7.5); entonces se adicionó medio de cultivo EMEM suplementado con SFB al 10% y se incubó por 48 horas. Después de la incubación, las células se fijaron con metanol frío y la cuantificación de las células infectadas se llevó a cabo marcando con un anticuerpo anti-E ([GTX57154](#)) de flavivirus, utilizando el kit VECTASTAIN ABC-peroxidasa de rábano picante (HRP) de ratón ([PK-4002; Vector laboratorios](#)) y el kit substrato DAB-peroxidasa ([SK-4100; Vector Laboratories](#)).

11.4 Extracción de RNA

Células C6/36 y Aag2 infectadas o no, y cultivadas a 28°C hasta una confluencia del 80-90%, se lavaron en dos ocasiones con PBS estéril para eliminar restos de medio y SFB. Después de los lavados las células fueron despegadas y resuspendidas en 300 µl de PBS estéril, la suspensión celular se colocó en tubos para eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. Después de la centrifugación se descartó el sobrenadante y a la pastilla celular se le añadieron 400µl de Trizol (#cat 15596018; [Invitrogen, Life Technology](#)) y 400 µl de cloroformo, se mezcló en vórtex por 30 s y se incubó a 4°C por 15 min. Después de la incubación, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, se separó la fase acuosa en un tubo nuevo y se le añadieron 800 µl de isopropanol frío y se incubó a 4°C por 30 min. Después de la incubación la muestra se centrifugo a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 800 µl de etanol frío al 75% y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4°C; después se descartó el sobrenadante y la pastilla obtenida (RNA total), se resuspendió en 50 µl de agua libre de RNAsa. Posteriormente, el RNA fue tratado con DNasa I (#cat [EN0521; Thermo Scientific](#)), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la cantidad y calidad del RNA, fue determinado por absorbancia a 260/280 nm y por electroforesis en geles de agarosa al 1%. El producto se almaceno a -20°C hasta su uso.

11.5 Síntesis de cDNA.

Para la síntesis de cDNA, se utilizaron 1000 ng de RNA libre de DNA, obtenido de células C6/36 y Aag2. El RNA fue colocado en tubos para microcentrífuga de 0.6 ml, se añadió Oligo dT y se incubó a 70°C por 10 min. Posteriormente, la reacción se incubó a 4°C por 5 min. Después, se añadió el amortiguador 5X, DTT y dNTPs, incubándose a 42°C por 2 min. Después de la incubación se añadió la transcriptasa reversa SuperScript II (#cat [18064022; Thermo Scientific](#)) y se incubó a 42°C por 50 min, posteriormente, la reacción se incubó a 72°C por 10 min (para inactivar la reacción) y el producto obtenido (cDNA) se guardó a -20° hasta su uso.

11.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR)

El cDNA generado a partir del RNA total de células de mosquito (C6/36 y Aag2), fue utilizado para realizar ensayos de RT-PCR (del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), para la amplificación de fragmentos específicos correspondientes a mensajeros de septinas de *Ae. albopictus* (*aalsep1*, *2*, *3* y *4*) y *Ae. aegypti* (*aaesep1* y *2*), respectivamente. Las secuencias codificantes (CDS del inglés Coding sequence) de oligonucleótidos pertenecientes a septinas de mosquito, fueron obtenidas de la base de datos de VectorBase y a partir de las CDS se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de septinas de mosquito (**Tabla 3**). El diseño de los iniciadores se realizó utilizando la plataforma Primer 3 plus (<https://primer3plus.com/>). Los iniciadores correspondientes a las septinas de *Ae. aegypti* se diseñaron utilizando la secuencia codificante completa de *aaesep1* y *aaesep2*, mientras que para *aaesep7*, solo se utilizó una pequeña fracción de la secuencia codificante ubicada en el exón 10. Los iniciadores de las septinas *aalsep1*, *aalsep2* y *aalsep4* de *Ae. albopictus* se diseñaron utilizando una secuencia ubicada en el exón 4 de cada una de sus respectivas secuencias codificantes, mientras que para *aalsep7* se utilizó una secuencia ubicada en el exón 1 de su secuencia codificante. El diseño de los iniciadores del gen ribosomal *s7* se diseñaron utilizando una secuencia ubicada entre el exón 1 y 2 de su respectiva secuencia codificante.

<i>Aedes albopictus</i>			
Gene	Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplificado en nucleótidos (nt)
AALF019773 (<i>aalsep1</i>)	aalsep1-F Aalsep1-R	5'-CAGGTGAGGTACTATCCGAC-3' 5'-TCTTAGCCTGCATCTGGGCA-3'	96 nt
AALF008077 (<i>aalsep2</i>)	aalsep2-F aalsep2-R	5'-AGTTCGACAAGCTGAAGAAAGA-3' 5'-AGCTGCCATCTGCGATT-3'	116 nt
AALF021047 (<i>aalsep4</i>)	aalsep4-F aalsep4-R	5'-CTTCCAGTCACGAATCCAGTA-3' 5'-GGGAAACTGAGACAGGAAACA-3'	101 nt
AALF006268 (<i>aalsep7/pnut</i>)	aalsep7-F aalsep7-R	5'-GGGCCGCCGGTTCACCCGGTGA-3' 5'-CAACGATAGCGCCCGGCC-3'	210 nt
<i>Aedes Aegypti</i>			
AAEL005493 (<i>aaesep1</i>)	aaesep1-F aaesep1-R	5'-ATGTCGACGGATTCGGGAAA-3' 5'-TTATTTCTGCGCCTGGATCT-3'	1,098 nt
AAEL004668 (<i>aaesep2</i>)	aaesep2-F aaesep2-R	5'-GACGTTGATGTGCAAAAGCAGC-3' 5'-TCATTTCTTTTGCTTTTGCCC-3'	1,157 nt
AAEL019546 (<i>aaesep7/pnut</i>)	aaesep7-F aaesep7-R	5'-CCACGATGTGCTGCTGCAG-3' 5'-CCATCAGCGTGAACCTGAAACC-3'	210 nt
S7	S7-F S7-R	5'-AGGTGATCAAGGCCGGTGGC-3' 5'-CGATCTCAGGAGCGCGGTG-3'	290 nt

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para la amplificación de Septinas de mosquito. Secuencia de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de fragmentos específicos de los mensajeros que codifican para las septinas *aalsep1*, *aalsep2*, *aalsep4* y *aalsep7* de *Aedes albopictus*, así como 2 secuencias de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la secuencia codificante de los mensajeros de las septinas *aaesep1* y *aaesep2* de *Ae. aegypti*. Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando la plataforma Primer3Plus.

La amplificación de septinas de mosquito por PCR, se realizó utilizando la siguiente mezcla de reacción: en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, se colocó 100 ng de cDNA de C6/36 o Aag2, agua inyectable estéril (cbp 25 µl), amortiguador 10x, MgCl₂ 50 mM, dNTPS 10 mM, iniciadores específicos a una concentración de 10 mM y Taq DNA polimerasa (5U/µl) (#cat EP0406; Thermo Scientific). Para amplificar los mensajeros de septinas de *Ae. albopictus*, la mezcla de reacción fue sometida a las siguientes condiciones de PCR: un ciclo de 95°C por 4 min y 35 ciclos: 94°C por 1 min para desnaturalización, 55°C por 30 s para alineamiento y 72°C por 2 min para extensión. Para amplificación de los fragmentos de septinas de *Ae. aegypti*, las condiciones fueron las siguientes: un ciclo de 95°C por 4 min y 35 ciclos: 94°C por 2 min para desnaturalización,

60°C por 90 s para alineamiento y 72°C por 2 min para extensión. Como control para los procesos de extracción se amplificó un fragmento correspondiente al gen S7, el cual se expresa de forma constitutiva y codifica para una proteína ribosomal de la subunidad 40S. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 y 2%, teñidos con bromuro de etidio y observados con luz ultravioleta. Las imágenes fueron registradas con un fotodocumentador LAS 4000 utilizando el sistema ImageQuant ([Ge Healthcare](#)).

11.7 Extracción de proteínas.

Células C6/36, Aag2 y Vero, crecidas en placas de 24 pocillos, hasta una confluencia del 80-90%, se lavaron con PBS estéril en dos ocasiones con la finalidad de eliminar restos de medio de cultivo y SFB. Después de los lavados, se añadieron 100 µl de amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCL 25 mM, pH 7.6, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, Desoxicolato de sodio al 1%, SDS 0.1%, Glicerol al 5%), los tubos se incubaron en movimiento a 4°C por 10 min. Después de la incubación, el lisado celular, se colectó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min, el sobrenadante (proteínas totales) se recuperó en un tubo nuevo y se añadió 30 µl de un coctel de inhibidores de proteasas (10mM) (Complete™, [Roche Diagnostics Deutschland GmbH](#)) y de fosfatasa (10mM) (PhosStop™, [Roche Diagnostics Deutschland GmbH](#)). Finalmente, las proteínas obtenidas, fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

11.8 Western Blot.

Las proteínas totales de células C6/36, Aag2 y Vero, se cuantificaron utilizando el kit de cuantificación de proteínas BCA™ (Pierce #cat [23225](#); [Thermo Scientific](#)). (La concentración promedio de proteína obtenida por cada muestra, fue de 2.5 µg/µl). Después, 30 µg de proteína se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, se añadió amortiguador de carga de Laemmli (Glicerol al 40%, Tris-HCl 240 mM, pH 6.8, SDS al 4%, azul de bromofenol al 0.04% y β-mercaptoetanol al 5%) y las muestras se calentaron a 95°C por 5 min; posteriormente, las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE al 12% (Sodium

Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Después del corrimiento electroforético, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm ([RPN303D; Amersham Hybond ECL](#)) a 100 miliamperios (mA) por una hora. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales anti-septina 2 de humano (anti-HsSept2) (#cat [ab224410-ABCAM](#)), anti-Septina 6 de humano (anti-HsSept6)(#cat [GTX34192; GeneTex](#)) y anti-GAPDH de humano (#cat [GTX100118; GeneTex](#)), generados en conejo, se diluyeron (1/2000) en una solución de PBS-Tween 0.1% y albúmina sérica (BSA) al 2% ([BAC62, Equitech-Bio, Inc](#)). Los anticuerpos anti-HsSept2 (reconoce la secuencia completa de la proteína) y anti-HsSept6 (reconoce un fragmento entre los aminoácidos 200-280), fueron utilizados para identificar la septina 1 y 2 de mosquitos, dado que la secuencias que se utilizaron para la generación de los anticuerpos presentan una identidad del 80 % con las correspondientes septinas de mosquito. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron en tres ocasiones con PBS-Tween 0.1% y se incubaron con un anticuerpo secundario específico conjugado a HRP (Goat anti-Mouse-IgG H&L-HRP, # cat [ab205719-ABCAM](#) o Goat anti-Rabbit IgG H&L-HRP, # cat [31460, Thermo Scientific](#)), el cual fue diluido en PBS-Tween 0.1% (1/60000). La señal HRP se detecto utilizando el substrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico PLUS™ ([Thermo Scientific](#)) y las imágenes digitales fueron obtenidas utilizando el sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) y analizadas con el software imageJ.

11.9 Infección de células de mosquito con DENV4

Células C6/36 y Aag2, crecidas en placas de cultivo de 24 pozos (# Cat [142475-Thermo Scientific](#)) hasta una confluencia del 80-90%, fueron lavadas en tres ocasiones con medio EMEM ([30-2003; ATCC](#)) libre de SFB; después de los lavados las células se incubaron por 2 h con DENV4 a una multiplicidad de infección de 3 (MOI:3). Para los análisis por Western blot, las células se lisaron a diferentes tiempos de infección (12, 24, 36, 48 y 60 horas post infección), con amortiguador de lisis RIPA (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pH 8.0, Tris 50 mM, pH

8.0, NP-40 1%, desoxicolato de sodio 0.5% y SDS 0.1%), suplementado con los inhibidores de proteasas Complete™ y fosfatasas PhosStop™ (10mM) ([Roche Diagnostics Deutschland GmbH](#)). Las proteínas totales obtenidas de las células infectadas con DENV4, se sometieron a SDS-PAGE y Western blot, como se describió anteriormente, en donde se utilizó el anticuerpo primario anti-HsSept6 (#cat [GTX34192](#); [GeneTex](#)), para analizar la expresión de la septina 2 de células C6/36 (AalSep2) y Aag2 (AaeSep2), durante la infección con DENV. Como un control de carga se utilizó la inmunodetección de gliceraldehido-3-fostato deshidrogenasa con el anticuerpo anti-GAPDH (#cat [GTX100118](#); [GeneTex](#)).

11.10 Microscopia confocal de células de mosquito infectadas con DENV4

Células de mosquito (C6/36 y Aag2), crecidas sobre cubreobjetos de vidrio dentro de placas de cultivo de 24 pozos, se lavaron con medio EMEM libre de SFB y se incubaron por 2 h con DENV4 a una MOI de 3. Después de la infección, las células fueron cultivadas con medio EMEM suplementado con SFB al 10 %. A las 12, 24, 36, 48 y 60 hpi, las células infectadas crecidas en cubreobjetos de vidrio, se colectaron y se fijaron con paraformaldehido al 4% durante 10 min a temperatura ambiente, después de la fijación, las células se lavaron en tres ocasiones con PBS-Tween 0.1% por 5 min, se permeabilizaron con PBS-Triton X-100 al 0.2% por 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente en tres ocasiones con PBS-Tween 0.1% y se bloquearon con una solución de SFB al 10%, albúmina al 3% y glicina 10 mM en PBS (solución de bloqueo), durante 30 min a temperatura ambiente. Después, las células se incubaron con los anticuerpos primarios anti-HsSept6 (# cat [GTX34192](#); [GeneTex](#)) y anti-NS3 (# cat [GTX629477](#); [GeneTex](#)) (anticuerpos generados en conejo y ratón respectivamente), durante toda la noche a 4°C. Posterior a la incubación con los anticuerpos primarios, las células se lavaron nuevamente con PBS-Tween 0.1% en tres ocasiones y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa-594 o Alexa 647 ([A-11037](#) y [A-2704](#), respectivamente; [Thermo Scientific](#)) y con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 488 o Alexa 594 ([A-10680](#) y [A-21044](#); [Thermo Scientific](#)), durante toda la noche a 4°C.

Después de la incubación, las células se lavaron con PBS-Tween 0.1% y el núcleo fue teñido con DAPI ([62247, Thermo Scientific](#)) por 20 min. Las células se lavaron con PBS estéril y las laminillas se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio, utilizando el medio de montaje para fluorescencia FluoroShield con DAPI ([ab104139;ABCAM](#)). La inmunofluorescencia de las laminillas fue analizada utilizando el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700 (Zeiss,Oberkochen, Germany).

11.11 Análisis de colocalización de proteínas por microscopia confocal

Para colocalizar las proteínas en estudio en las células de mosquito durante la infección con DENV, éstas se marcaron con anticuerpos y se observaron por la señal de fluorocromos específicos. Células de mosquito (C6/36 y Aag2) cultivadas en cubreobjetos, se infectaron con DENV4 a una MOI de 3, durante 48 h. Posterior a la infección, las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se trataron con solución de bloqueo, se permeabilizaron con PBS-Triton X-100; se incubaron con el anticuerpo de conejo anti HsSept6 y con anticuerpos monoclonales preparados contra las proteínas del DENV producidos en ratón: anti-Cápside (#cat [GTX633632; GeneTex](#)); anti-E (#cat [GTX57154; GeneTex](#)); anti-NS1 (#cat [GTX630556; GeneTex](#)); anti-NS3 (#cat [GTX629477; GeneTex](#)); anti-NS5 (#cat [GTX629446; GeneTex](#)), cada uno por separado. Las células se lavaron como se describió anteriormente y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 647 ([A-2704; Thermo Scientific](#)) y con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 488 ([A-10680; Thermo Scientific](#)); finalmente, el núcleo de las células fue teñido con DAPI ([62247, Thermo Scientific](#)). Las células se montaron sobre portaobjetos de vidrio, utilizando el medio de montaje FluoroShield con DAPI ([ab104139;ABCAM](#)). La inmunofluorescencia de las células fue analizada con un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700 ([Zeiss, Oberkochen, Germany](#)). La posible colocalización entre las proteínas de interés, fue determinada calculando el coeficiente de correlación de Pearson (PCC) un método estadístico para evaluar la colocalización entre dos proteínas, sobre las imágenes de fluorescencia

obtenidas en dos canales de emisión, correspondientes a la señal obtenida con dos anticuerpos diferentes. Los valores obtenidos por PCC deben estar por encima de 0.5 ($PCC \geq 0.5$), para considerar una colocalización verdadera entre las marcas fluorescentes de dos moléculas diferentes (Dunn KW et al., 2011). El PCC se obtuvo a partir de 20 imágenes independientes, utilizando el software de procesamiento de imágenes ICY, así como el plugin Colocalization Studio (<http://icy.bioimageanalysis.org/>).

11.12 Ensayos de ligación por proximidad (Proximity Ligation Assay, PLA)

La posible interacción entre la septina 2 de mosquito (AaSep2 o AaeSep2) y las proteínas E, C, NS1, NS3 y NS5, se analizó utilizando el kit *in situ* Duolink PLA (Sigma Aldrich), que está diseñado para que cuando dos moléculas están a una distancia ≤ 40 nm entre ellas, se genere una señal fluorescente que indica interacción entre las proteínas que se están analizando. El mecanismo de ensayos PLA está basado en el uso de anticuerpos primarios específicos (**Figura 7, paso 1**) que deben estar generados en especies diferentes (por ejemplo, conejo/ratón), estos anticuerpos, posteriormente se unirán a sus respectivos anticuerpos secundarios denominados como sondas PLA (Plus (+) y Minus (-)) (**Figura 7, paso 2**). Las sondas PLA poseen una hebra de DNA única. Si las proteínas de interés interactúan entre sí, las sondas de ADN se hibridan para formar ADN circular. Este ADN se puede amplificar y visualizar mediante sondas de oligonucleótidos complementarias marcadas con fluorescencia (**Figura 7, paso 3**). Las interacciones se visualizan como puntos, y el número y la intensidad de los puntos se pueden cuantificar mediante microscopía de fluorescencia.

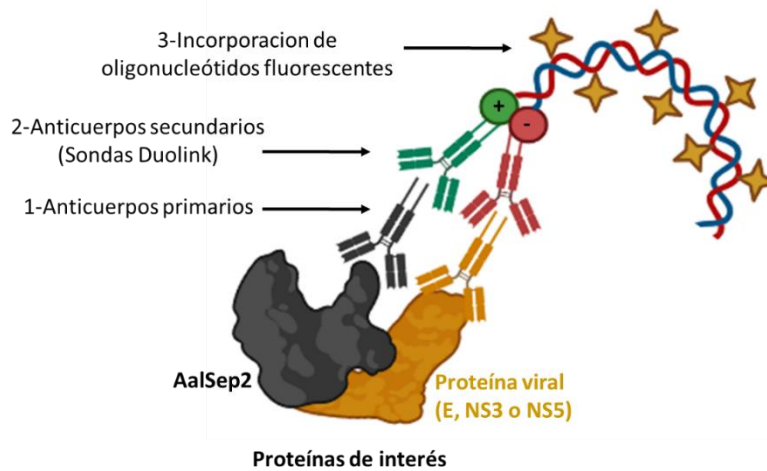


Figura 7. Representación esquemática de la posible interacción entre la septina AalSep2 (negro) con proteínas del virus DENV (amarillo) utilizando el kit *in situ* Duolink.

Células C6/36 y Aag2 infectadas con DENV4 por 48 hpi, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con PBS-Triton X-100 al 0.2%. Posteriormente, las células se incubaron por 1 h con la solución de bloqueo y se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios específicos, los cuales fueron utilizados a una dilución de 1:50 para AalSep2 (utilizando anti-HsSept6) y 1:50 para las proteínas virales (utilizando anti-E, C, NS1, NS3 y NS5). Las células se lavaron en tres ocasiones con PBS-Tween 0.1% y después se incubaron con las sondas fluorescentes del kit *in situ* Duolink PLA (las sondas fueron diluidas en reactivo de hibridación Duolink a una dilución de 1:5 y utilizadas para la detección de los anticuerpos primarios de ratón y conejo) a 37°C por 40 min en una cámara húmeda. Las células se lavaron nuevamente en tres ocasiones con PBS-Tween 0.1% y se incubaron con una solución de ligación (constituida de reactivo de ligación Duolink, utilizado en una dilución 1:5 y ligasa Duolink en una dilución 1:40) a 37°C por 30 min dentro de una cámara húmeda. Posteriormente, las células se lavaron en dos ocasiones con PBS-Tween 0.1% y se incubaron con la polimerasa del kit Duolink Far Red Detection (utilizada para amplificar la señal fluorescente de las sondas) (Sigma Aldrich) durante 90 min a 37°C en una cámara húmeda. Después, para remover las sondas que no se unieron, las células se lavaron en dos ocasiones con la solución A (10 mM Tris-HCl, pH 7.4,

150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). Posteriormente, se lavaron en una ocasión con PBS-Tween 0.1%, se incubaron con DAPI durante 15 min, y después las células se lavaron en dos ocasiones con la solución B (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 100 mM NaCl) y finalmente, las células crecidas en los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje fluoroShield con DAPI (# cat [ab104139; ABCAM](#)). Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 700 y la señal fluorescente generada por el PLA de al menos 20 células, se obtuvo a partir del análisis de imágenes de proyección máxima, utilizando el complemento Spot Detector del Software de imágenes Icy. Como controles negativos, se utilizaron células no infectadas (Mock), incubadas con ambos anticuerpos primarios y células infectadas con DENV, incubadas únicamente con el anticuerpo anti-HsSept6, las cuales fueron procesadas en paralelo a las muestras problema.

11.13 Inmunoprecipitación (IP).

La inmunoprecipitación (IP) permite recuperar proteínas específicas de una mezcla compleja aprovechando la unión de anticuerpos específicos. Células C6/36 infectadas con DENV, se lisaron con un amortiguador de IP no desnaturizante (PBS, pH 7.4, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5% glicerol con un coctel de inhibidores de proteasas) y el lisado obtenido, se almaceno a -20°C hasta su uso. La coimmunoprecipitación (Co-IP), se realizó utilizando el Kit Thermo Scientific Pierce Co-IP ([26149](#)), siguiendo las instrucciones del fabricante. El primer paso, fue el acoplamiento por 2 h de 10 µg del anticuerpo policlonal anti-HsSept6 (GTX34192: Genetex) con la resina de acoplamiento AminoLink Plus. Para capturar las proteínas unidas a la Septina, la resina con el anticuerpo adherido se lavó y se incubo durante toda la noche con los lisados de células C6/36 infectadas con DENV. Después de la incubación, la resina se lavó con un amortiguador de lavado IP (PBS, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5% glicerol) y las proteínas unidas se recuperaron utilizando un amortiguador de elución IP (50 mM HEPES, pH 5.0). Células C6/36 no infectadas, fueron utilizadas como control para analizar uniones no específicas, recibiendo el mismo tratamiento para Co-

IP. Los precipitados fueron analizados por WB, utilizando el anticuerpo anti-HsSept6, anti-NS3 y anti NS5 de DENV. Las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a HRP (anti-rabbit-HRP o anti-mouse-HRP) y se revelaron utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto (Thermo Scientific). Las imágenes fueron registradas utilizando el fotodocumentador LAS4000.

11.14 Microscopia electrónica de transmisión (MET).

La localización de la septina 2 de mosquito de *Ae. albopictus* (AalSep2), en complejos replicativos de células infectadas con DENV4, fue evaluada por microscopia electrónica de transmisión (MET). Células C6/36 crecidas en frascos de cultivo de 25 cm² hasta una confluencia del 80-90%, se infectaron con DENV4 a una MOI de 3 durante 48 h. Después de la infección, las células se lavaron con PBS estéril en tres ocasiones (para eliminar restos de medio y SFB) y se fijaron con paraformaldehído 4%/glutaraldehído 5% durante 1 h a temperatura ambiente; posteriormente, las células fueron deshidratadas utilizando diferentes concentraciones de etanol y embebidas en resina acrílica (LRWhite) polimerizada por irradiación de luz UV a 4°C, durante toda la noche. Después, se obtuvieron cortes de 70 nm de grosor que se montaron en rejillas de níquel cubiertas con una película de Formvar (Sigma Aldrich). Para el inmuno marcaje de la septina a evaluar, las rejillas se incubaron con PBS suplementado con SFB al 10% (para bloquear uniones no específicas) a 25°C por 1 h y enseguida, se incubó con el anticuerpo que reconoce a la septina AalSep2 de mosquito (utilizando anti-HsSept6 (#cat GTX34192-Genetex)) a una dilución de 1:50 con PBS suplementado con SFB al 5%), durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación, las rejillas se lavaron en cinco ocasiones con PBS estéril e incubadas por 1 h a temperatura ambiente con una IgG anti-conejo acoplada a nano partículas de oro de 15 nm (Ted Pella Inc. Redding, CA, USA), la cual se diluyó en PBS (1:10) y utilizado como anticuerpo secundario. Finalmente, los cortes fueron contrastados con acetato de uranio y citrato de plomo y observados en el microscopio electrónico Jeol JEM-1011 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan). Células Mock

tratadas bajo las mismas condiciones que las células infectadas y células infectadas incubadas únicamente con el anticuerpo secundario, se utilizaron como controles de especificidad de la marca.

11.15 Silenciamiento de la expresión de septina AalSep2 y AaeSep2 en células de mosquito mediante DsiRNAs específicos

Para evaluar el papel de la septina 2 de mosquito en la replicación viral, se diseñaron silenciadores específicos dirigidos contra la septina AalSep2 y AaeSep2, de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* respectivamente. Los DsiRNAs (Dicer-Substrate Short Interfering RNAs), se diseñaron a partir de la secuencia codificante de los mensajeros *aalsep2* y *aaesep2*, utilizando la plataforma Integrated DNA Technologies (IDT) (Tabla 4).

Duplex AalSep2-DsiRNA-AalSep	
Sequence 1	5'-CAUGGUUAGAUUGAAGUUGACAATC-3'
Sequence 2	3'-UCGUACCAAUCUAACUUAACUGUUAG-5'
Duplex AaeSep2-DsiRNA	
Sequence 1	5'-GGAUCUGGUUUGCAUGAAAAAATG-3'
Sequence 2	3'-AACCUAGACCAAACGUACUUUUUUAAC-5'
Duplex No Targeting-DsiRNA	
Sequence 1	5'-CUUCCUCUCUUUCUCUCCCUUGUGA-3'
Sequence 2	3'-UCACAAGGGAGAGAAAGAGGAAGGA-5'

Tabla 4. Secuencia de silenciadores dirigidos contra la septina AalSep2 y AaeSep2 de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* respectivamente.

Una vez diseñados los silenciadores (secuencias de 20-25 nucleótidos dirigidos contra una región específica del mensajero de septina *aalsep2* y *aaesep2*), células C6/36 y Aag2, crecidas hasta una confluencia del 80-90%, se lavaron en tres ocasiones con medio de cultivo libre de SFB y se transfectaron con los DsiRNAs específicos (DsiRNA-AalSep2 para células C6/36 y DsiRNA-AaeSep2 para células Aag2), a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 nM), utilizando el reactivo de transfección HiPerfect (Qiagen). La concentración óptima de cada

silenciador fue de 100 nM y fue determinado por ensayos de WB. Como control negativo, ambas líneas celulares fueron tratadas con un DsiRNA-NT (DsiRNA-No Target) a una concentración de 100 nM. La incubación de las células con los DsiRNAs se llevó a cabo a 28°C durante 5 h (células con una confluencia de 80-90%, se lavaron con medio de cultivo libre de SFB, posteriormente se colocaron 6 µl de reactivo Hiperfect más 10 µl de silenciador (100 nM)); después, se agregaron a las células medio de cultivo EMEM o Schneider suplementado con SFB al 10% y se incubaron a 28°C durante 48 h. Posteriormente, las células se lavaron en tres ocasiones con PBS estéril, se extrajeron las proteínas totales y la eficiencia del silenciamiento de la septina AalSep2 y AaeSep2 (Utilizando anti-HsSept6), se evaluó por WB, utilizando la expresión de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) ([GTX100118; Genetex](#)) o actina ([ab14128; ABCAM](#)), como controles de carga. Los niveles de expresión de la septina 2 de mosquito (AalSep2 o AaeSep2) de células tratadas con DsiRNAs específicos (DsiRNA-AalSep2 o DsiRNA-AaeSep2), en relación con las células transfectadas con el DsiRNA-NT (control), fueron cuantificadas por análisis densitométricos de las imágenes obtenidas en el LAS-4000, utilizando el Software ImageJ. El efecto de los DsiRNA en la expresión de septina 2 de mosquito (AalSep2 o AaeSep2), también se comprobó por microscopia confocal como se describió anteriormente. La cuantificación de la fluorescencia de células tratadas con DsiRNA-AalSep2 o DsiRNA-AaeSep2, se realizó por el análisis de la proyección máxima (fluorescencia total emitida por cada una de las imágenes confocales) de al menos 50 células y las diferencias en la marca fluorescente, se determinó en relación con la fluorescencia de células tratadas con el DsiRNA-NT (control).

11.16 Titulación viral de células de mosquito tratadas con DsiRNAs

Para la titulación de DENV en células BHK21 a partir de ensayos de formación de focos se utilizaron los sobrenadantes de Células C6/36 y Aag2 infectadas con DENV y tratadas con DsiRNAs (DsiRNA-AalSep2 y DsiRNA-AaeSep2 respectivamente) a una concentración de 100 nM e infectadas con DNV4 durante 48 h. Los sobrenadantes se sometieron a diluciones seriadas 1:10 en medio

EMEM libre de SFB y se añadieron a una monocapa de células BHK21 crecidas en placas de 96 pocillos. El inóculo viral se dejó en contacto con las células a 37°C por 2 h, después las células se lavaron en una ocasión con PBS y enseguida, se adicionó medio EMEM suplementado con SFB al 10% y a las 48 hpi, las células se fijaron con metanol frío y se marcaron con un anticuerpo anti-proteína E ([GTX57154; GeneTex](#)), seguido de un anticuerpo anti-ratón acoplado a HRP usando el kit VECTASTAIN ABC-HRP ([PK-4002; Vector Laboratories](#)) junto con el kit Substrato DAB-peroxidasa ([SK-4100; Vector Laboratories](#)), para visualizar las células infectadas. Las diferencias en los títulos virales de sobrenadantes de células tratadas con DsiRNA-AalSep2 o AaeSep2, se determinó en relación con el título viral de sobrenadantes de células tratadas con un DsiRNA-NT (control).

11.17 Cuantificación de RNA viral de DENV en células C6/36 tratadas con DsiRNAs.

Después de recolectar los sobrenadantes de los cultivos de las células C6/36 infectadas con DENV4 (MOI:3) y tratadas con DsiRNAs (DsiRNA-AalSep2 o DsiRNA-NT/DsiRNA-control), las células se recuperaron y se lavaron en tres ocasiones con PBS estéril para eliminar restos de medio de cultivo, y se aisló el RNA total con el reactivo Trizol ([Invitrogen](#)) como se describió anteriormente. El RNA obtenido se usó en ensayos de RT-PCR en tiempo real, para la cuantificación de los niveles de RNA genómico viral de DENV4. Para ello, 0.1 µg de RNA total fue utilizado para determinar el número de copias genómicas de DENV4. La RT-PCR cuantitativa de un solo paso, se estandarizó en reacciones de 25 µl utilizando el kit QuantiTect probe RT-PCR ([Qiagen, Valencia, CA](#)), empleando 500 nM de los iniciadores: CFD2 (5'-GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC-3') o mFU1 (5'-TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAA-3') (amplificando una región conservada del mensajero que codifica la poliproteína de DENV)([Daidoji et al., 2021](#)) y 50 nM de sonda marcada ([DENV4-FAM; TaqMan](#)). Para la detección de los iniciadores y sondas para DENV4, se utilizaron las condiciones descritas por

Chien *et al* (2006) y Lanciotti *et al* (2008). Por lo tanto, las condiciones para la detección de DENV4 fueron las siguientes: 50°C por 30 min, 95°C por 15 min, 50°C por 30 s, 72°C por 1 min, 45 ciclos de: 95°C por 15 s y 48°C por 3 min. El análisis en tiempo real de las muestras se llevó a cabo en un equipo 7500 Fast PCR siguiendo las instrucciones del fabricante ([Applied Biosystems, Foster City, CA](#)) y los resultados se analizaron utilizando el Software StepOne v2.3. Cabe mencionar que cada ensayo fue realizado por duplicado con dos replicas técnicas y para determinar el número de copias de RNA de DENV en 1×10^5 células, se utilizó una curva estándar con diluciones seriadas de un stock viral ([Caraballo et al., 2022](#)). Valores de Ct (Umbral de detección de RNA viral) de RT-qPCR de células infectadas con DENV y tratadas con DsiRNAs y valores de la curva estándar, se utilizaron para estimar la cantidad de copias virales ([Caraballo et al., 2022](#)). Las diferencias en el número de copias de RNA viral de células tratadas con DsiRNA-AalSep2, se determinó en relación con el número de copias de RNA viral obtenida de células tratadas con un DsiRNA-NT (control).

11.18 Viabilidad Celular.

La viabilidad celular se determinó con el ensayo de proliferación celular no radioactiva Cell Titer 96 AQueous, el cual fue utilizado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante ([MTS assay, G3580; Promega](#)). Células C6/36 cultivadas en placas de 96 pozos se trataron con un DsiRNA dirigido contra la septina AalSep2 y con un DsiRNA-NT/DsiRNA-Control, ambos a una concentración final de 100 nM, y se mantuvieron hasta 48 h después de la transfección. La viabilidad celular se expresó como un porcentaje con respecto a la condición control (células transfectadas con DsiRNA-NT/DsiRNA-Control), la cual fue tomada como 100% de viabilidad. Se realizaron tres replicas biológicas para cada condición. Nota: Otro grupo de células C6/36 fu simultáneamente tratada con los mismo DsiRNAs y utilizadas para ensayos de Western blot.

11.19 Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados utilizando la prueba estadística ANOVA de una vía, la cual permitió identificar cambios de expresión significativos de septina AalSep2 o AaeSep2 durante una cinética de infección, mientras que la prueba estadística t de Student (t-test), se utilizó para establecer diferencias significativas de expresión de septina AalSep2 y AaeSep2 entre células silenciadas y no silenciadas. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism, versión 8.01.

El número de copias de DENV a partir de 100 ng de RNA de células C6/36 infectadas con DENV y tratadas con DsiRNA-AalSep2 o DsiRNA-NT/DsiRNA-Control, se determinó utilizando una curva estándar con diluciones seriadas de un stock viral (Caraballo et al., 2022). La prueba estadística t de Student (t-test), se utilizó para establecer diferencias significativas entre el número de copias virales presentes en células silenciadas en comparación a al número de copias virales de células no silenciadas.

12. Resultados.

12.1 Identificación *in silico* de los genes de septina de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*

Para buscar secuencias homólogas a septina en los genomas de los mosquitos *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* se utilizó el programa tBLASTn usando como modelo la secuencia de aminoácidos de la septina 6 de *H. Sapiens* (HsSept6, UniProt Q14141). Cuatro genes de septina fueron identificados en ambos genomas: AALF019773, AALF008077, AALF021047 y AALF006268 para *Ae. albopictus* y AAEL005493, AAEL004668, AAEL011012 y AAEL019546 para *Ae. aegypti*. El análisis con Blastx de los genomas almacenados en GenBank de cada uno de los genes de septina identificados en mosquito, mostró similitud de secuencias con genes de septina de *D. melanogaster*, y permitió nombrar a estos genes como: *aalsep1* (AALF019773), *aalsep2* (AALF008077), *aalsep4* (AALF021047), *aalsep7* (AALF006268) para *Ae. albopictus*, y *aaesep1* (AAEL005493), *aaesep2* (AAEL004668), *aaesep4* (AAEL011012) y *aaesep7* (AAEL019546) para *Ae. aegypti*. Para los genes *aalsep1*, *aalsep2* y *aaesep4*, están predichos en la base VectorBase cuatro exones y tres intrones, mientras que para el gen *aalsep7* hay nueve exones y ocho intrones (**Figura 8**). Por otro lado, para los genes *aaesep1* y *aaesep2*, se predicen cuatro exones y tres intrones, el gen *aaesep4* contiene seis exones y cuatro intrones, y para el gen *aaesep7* hay seis combinaciones posibles de transcritos originados a partir de 11 exones y 10 intrones; en *Ae. aegypti* sólo *aaesep2* tiene un transcrito único en tanto que para los genes *aaesep1*, *aaesep4* y *aaesep7* puede haber más de un transcrito con sus correspondientes mRNAs maduros (**Figura 8, Tabla 5**). En contraste, para todos los genes de *Ae. albopictus* se predice un transcrito único que generaría un solo mRNA maduro (**Tabla 5 y 6**).

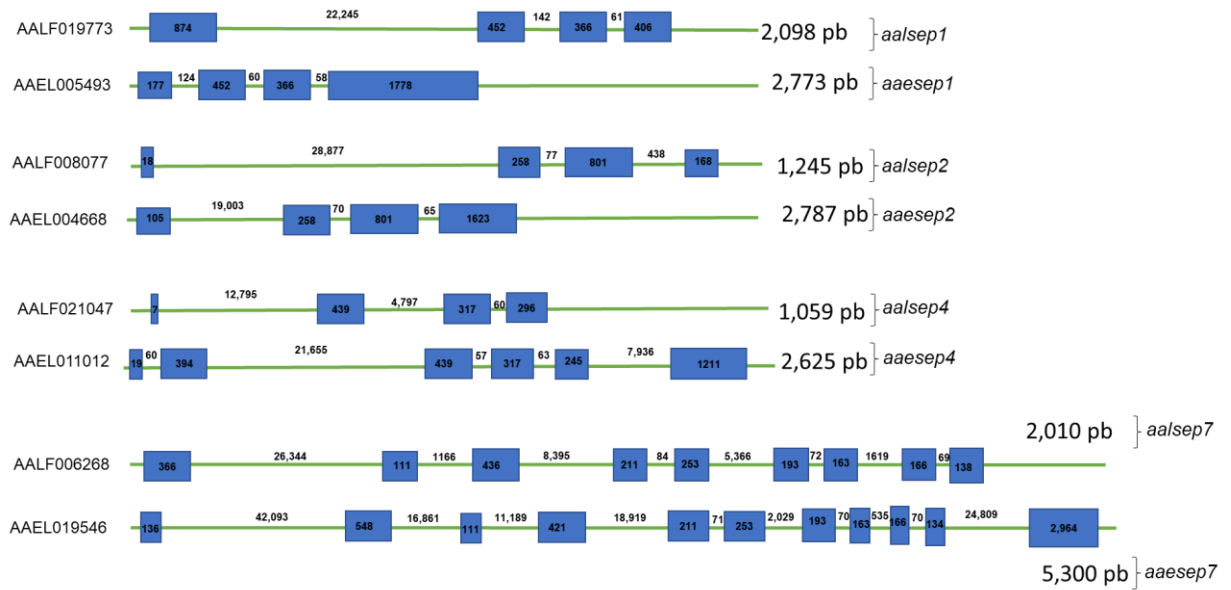


Figura 7. Estructura de los genes de septina de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*. A la izquierda se anota el identificador en la base de datos de VectorBase. Las cajas azules representan exones, y las líneas verdes intrones; los números indican el tamaño en pares de bases de los segmentos de DNA.

<i>Aedes albopictus</i>			<i>Aedes aegypti</i>		
gene (transcrito)	Exones	Intrones	gene (transcrito)	Exones	Intrones
<i>aalsep1</i> (AALF019773-RA)	4	3	<i>AeaeSep1</i> (AAEL005493-RA) (AAEL005493-RB)	4 4	3 3
<i>aalsep2</i> (AALF008077-RA)	4	3	<i>AeaeSep2</i> (AAEL004668-RA)	4	3
<i>aalsep4</i> (AALF021047-RA)	4	3	<i>AeaeSep4</i> (AAEL011012-RA) (AAEL011012-RB)	6 6	5 5
<i>aalsep7</i> (AALF006268-RA)	9	8	<i>AeaeSep7</i> (AAEL019546-RB) (AAEL019546-RA) (AAEL019546-RC) (AAEL019546-RD) (AAEL019546-RE) (AAEL019546-RF) (AAEL019546-RG) (AAEL019546-RI) (AAEL019546-RJ) (AAEL019546-RK) (AAEL019546-RM) (AAEL019546-RN) (AAEL019546-RO) (AAEL019546-RP) (AAEL019546-RQ) (AAEL019546-RR)	11 11 15 16 15 14 14 12 14 16 14 13 15 15 13 15 13 12	10 10 14 15 14 13 11 13 15 13 12 14 14 12 11

Tabla 5. Genes de septina en mosquitos del género *Aedes*. Lista de Genes, exones, intrones y transcritos predichos para proteínas tipo septina en *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*.

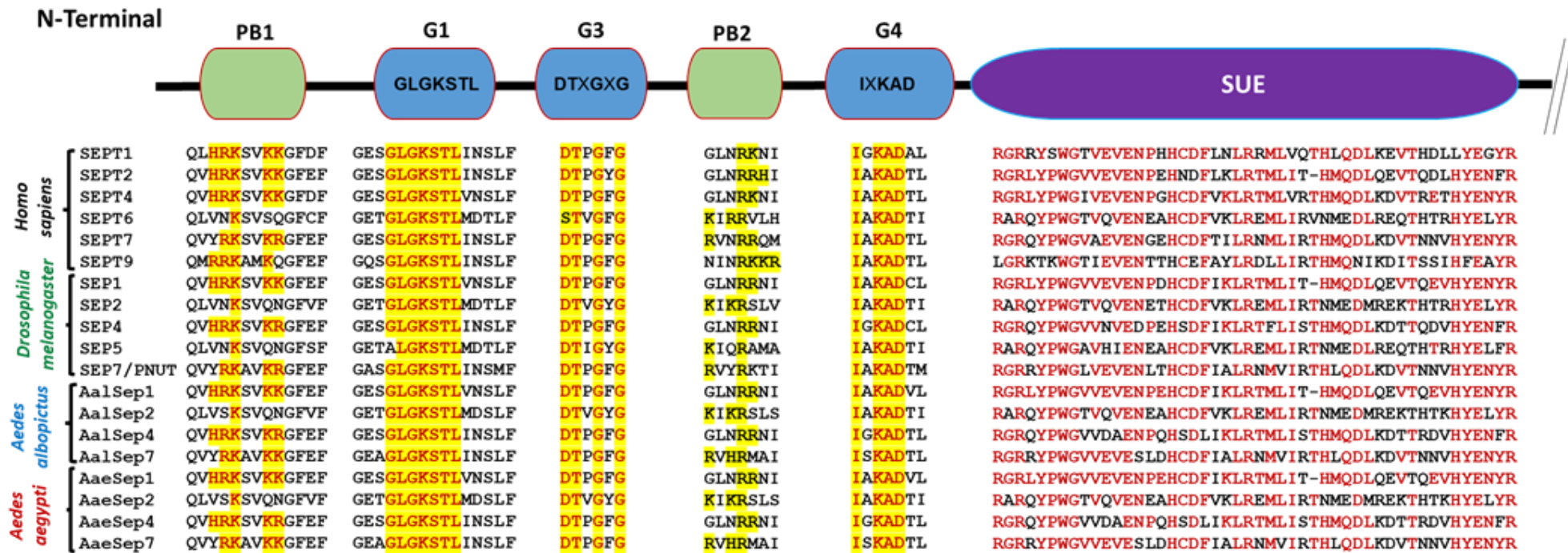
<i>Aedes albopictus</i>					<i>Aedes aegypti</i>				
gene (transcrito)	Mensajero	Polipéptido	Peso Molecular	pl	gene (transcrito)	Mensajero	Polipéptido	Peso Molecular	pl
<i>AealbSep1</i> (AALF019773-RA)	2,098 bp	359 aa	41.19 kDa	6.1	<i>AeaeSep1</i> (AAEL005493-RA) (AAEL005493-RB)	2,773 bp 3,287 bp	365 aa 359 aa	42.0 kDa 41.2 kDa	6.1 6.1
<i>AealbSep2</i> (AALF008077-RA)	1,245 bp	414 aa	47.88 kDa	8.0	<i>AeaeSep2</i> (AAEL004668-RA)	2,787 bp	418 aa	48.1 kDa	7.8
<i>AealbSep4</i> (AALF021047-RA)	1,059 bp	352 aa	40.70 kDa	6.2	<i>AeaeSep4</i> (AAEL011012-RA) (AAEL011012-RB)	2,625 bp 2,747 bp	363 aa 363 aa	42.1 kDa 42.1 kDa	6.3 6.3
<i>AealbSep7</i> (AALF006268-RA)	2,010 bp	669 aa	74.54 kDa	9.2	<i>AeaeSep7</i> (AAEL019546-RB) (AAEL019546-RA) (AAEL019546-RC) (AAEL019546-RD) (AAEL019546-RE) (AAEL019546-RF) (AAEL019546-RG) (AAEL019546-RI) (AAEL019546-RJ) (AAEL019546-RK) (AAEL019546-RM) (AAEL019546-RN) (AAEL019546-RO) (AAEL019546-RP) (AAEL019546-RQ) (AAEL019546-RR)	5,300 bp 3,315 bp 2,901 bp 2,840 bp 2,734 bp 2,760 bp 2,830 bp 5,365 bp 2,293 bp 2,837 bp 2,781 bp 5,384 bp 2,733 bp 2,870 bp 2,592 bp 3,365 bp	679 aa 739 aa 716 aa 716 aa 804 aa 767 aa 679 aa 695 aa 685 aa 716 aa 788 aa 689 aa 804 aa 804 aa 695 aa 755 aa	75.68 kDa 81.7 kDa 8.3 kDa 81.3 kDa 90.0 kDa 86.0 kDa 77.3 kDa 77.3 kDa 77.7 kDa 81.3 kDa 88.4 kDa 76.8 kDa 90.0 kDa 90.0 kDa 77.5 kDa 83.4 kDa	9.5 9.4 7.4 7.4 7.7 7.6 7.3 9.4 6.9 7.4 8.0 9.3 7.7 7.7 9.3 9.2

Tabla 6. Características de proteínas tipo septina en *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*. deducidas a partir de las secuencias de DNA obtenidas del genoma (VectorBase). bp (pares base), aa (aminoácidos), kDa (kilo Daltones) y pl (punto isoeléctrico).

12.2 Análisis de las secuencias de las proteínas tipo septina de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*

El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de AalSep1, AalSep2, AalSep4, AalSep7, AaeSep1, AaeSep2, AaeSep4 y AaeSep7 con Septinas de *D. melanogaster* y *H. sapiens*, mostraron que las proteínas tipo septina de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*, presentan todos los dominios conservados característicos de esta familia de proteínas. Todas las Septinas de ambas especies de mosquito presentan tres dominios de GTPasa: G1 (**GLGKSTL**), G3 (**DTXGXG**) y G4 (**IXKAD**); dos dominios polibásicos, ubicados en el extremo N- y C-terminal de la región de las GTPasas; una secuencia denominada elemento único de septina (**SUE**), que le da la identidad a la familia de septinas; y el dominio *coiled coil* de longitud variable entre las septinas (**Figura 9; A y B**).

A



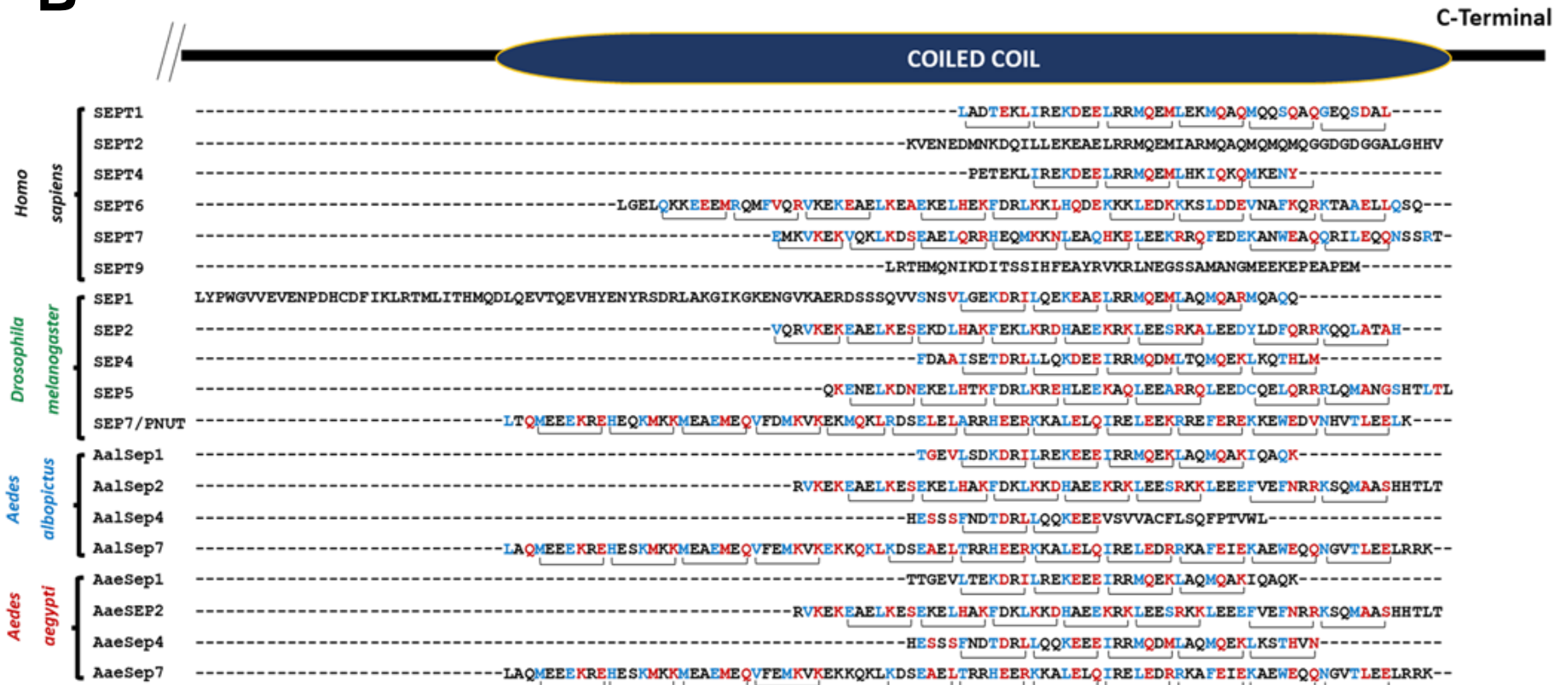
B

Figura 9. Dominios característicos de las Septinas de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*. A) Alineamiento de secuencias de aminoácidos de moléculas tipo septina de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* con secuencias de *D. melanogaster* y *H. sapiens*, donde se muestra la presencia de motivos característicos: Dominios polibásicos (PB1 y PB2), los dominios GTPasa (G1, G3 y G4), la secuencia o elemento único de septina (SUE) y los motivos *Coiled Coil*. Las letras rojas marcadas en amarillo representan aminoácidos altamente conservados correspondientes a los motivos característicos de proteínas tipo septina. B) Alineamiento de secuencias de proteínas tipo septina de mosquito con secuencias de *D. melanogaster* y *H. sapiens*, donde se muestra la presencia de un motivo *Coiled Coil* en cada una de las septinas de mosquito. Los corchetes indican los siete aminoácidos repetidos característicos de estos dominios.

Con los alineamientos se hizo el análisis filogenético de las septinas de mosquito y se observó que estas proteínas son los posibles ortólogos de cuatro de las cinco Septinas de *D. melanogaster* (SEP1, SEP2, SEP4 y SEP7/Pnut) (**Figura 10**), compartiendo una identidad de 75-85% y de *H. sapiens* (SEPT2, SEPT4, SEPT6 y SEPT7), con las que comparten una identidad de 67-72%.

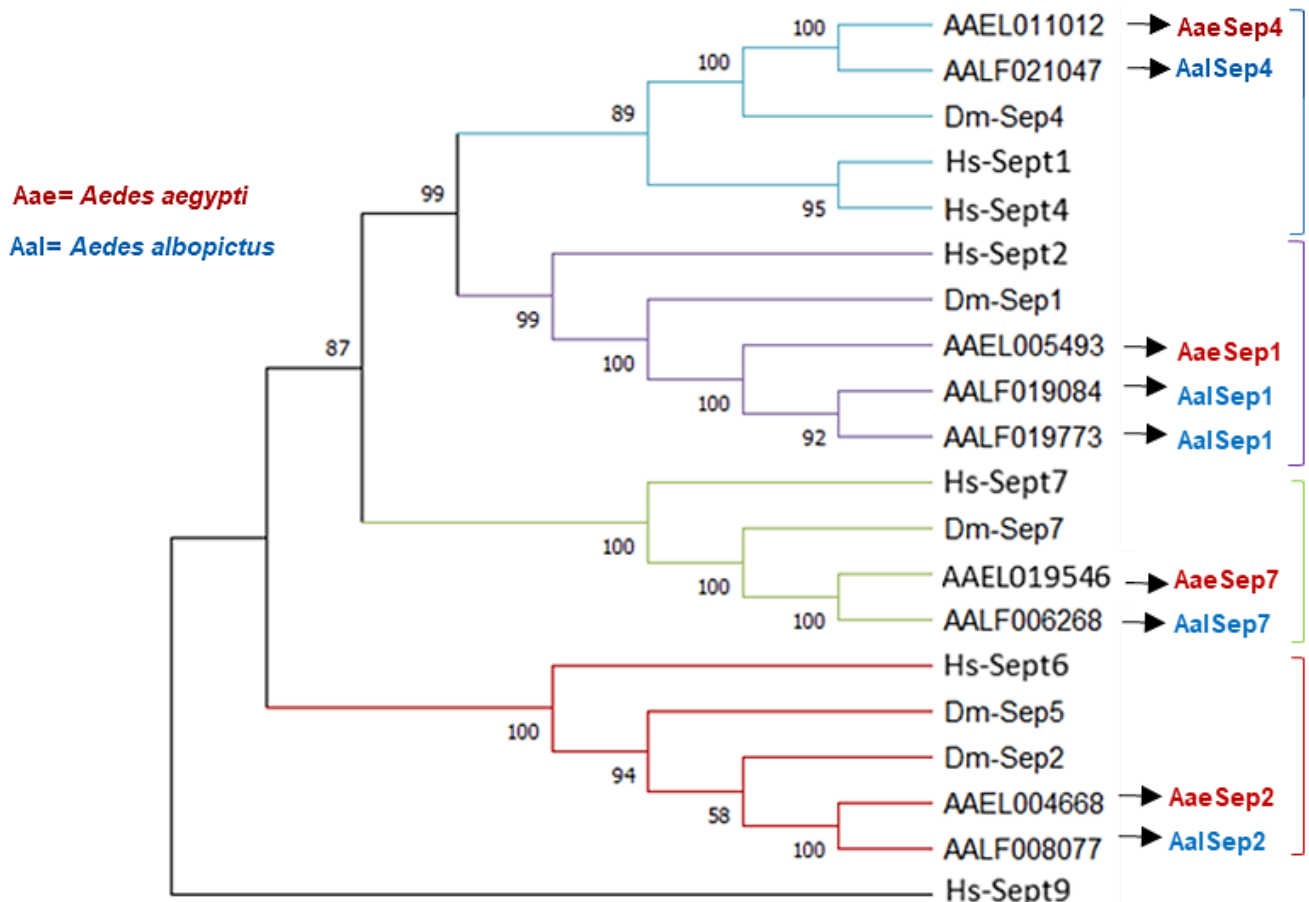


Figura 10. Filogenia de Septinas de mosquito. Para analizar las relaciones filogenéticas de proteínas tipo septina de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* con otros organismos (vertebrados e insectos), se construyó un árbol filogenético utilizando el programa MUSCLE y el método de evolución mínima con el programa MEGAX versión 10.1.8. Valores de *Bootstrap* basados en 100 réplicas, se muestran por encima de cada rama. Con base en la homología de secuencias de Septinas de mosquito con las de *D. melanogaster*, las Septinas de mosquito se nombraron como AalSep1, AalSep2, AalSep4, AalSep7, AaeSep1, AaeSep2, AaeSep4 and AaeSep7.

12.3 Expresión de los genes de septina en células de mosquito

Para analizar la expresión de los mensajeros de Septinas de mosquito en células C6/36 y Aag2, se hicieron ensayos de RT-PCR punto final, con iniciadores diseñados para la amplificación de fragmentos correspondientes a los RNAs mensajeros maduros a partir de las secuencias codificantes obtenidas de las bases de datos de VectorBase de los genes *aalsep1*, *aalsep2*, *aalsep4* y *aalsep7* de *Ae. albopictus*, así como de los genes *aaesep1* y *aaesep2* de *Ae. aegypti* (**Tabla 3**). La expresión del gen constitutivo S7, el cual codifica para una proteína de la subunidad ribosomal menor, se utilizó como control interno.

En las células Aag2 derivadas de *Ae. aegypti*, se identificaron los amplificados del tamaño esperado de 1,098 pb (mRNA 2,773), 1,157 pb (mRNA 2,787) y un fragmento de 210 pb, correspondientes a los mRNAs de *aaesep1*, *aaesep2* y *aaesep7/pnut* respectivamente (**Tabla 3 y Figura 11**). Por otro lado, en las células C6/36 derivadas de *Ae. albopictus*, se obtuvieron amplificados con los tamaños esperados de 96, 116, 101 y 210 pb, correspondientes a los fragmentos específicos de los mensajeros *aalsep1*, *aalsep2*, *aalsep4* y *aalsep7*, respectivamente (**Figura 12**). Este análisis demostró que todos los genes de septina analizados, son expresados en las líneas celulares derivadas de mosquitos del género Aedes, Aag2 y C6/36.

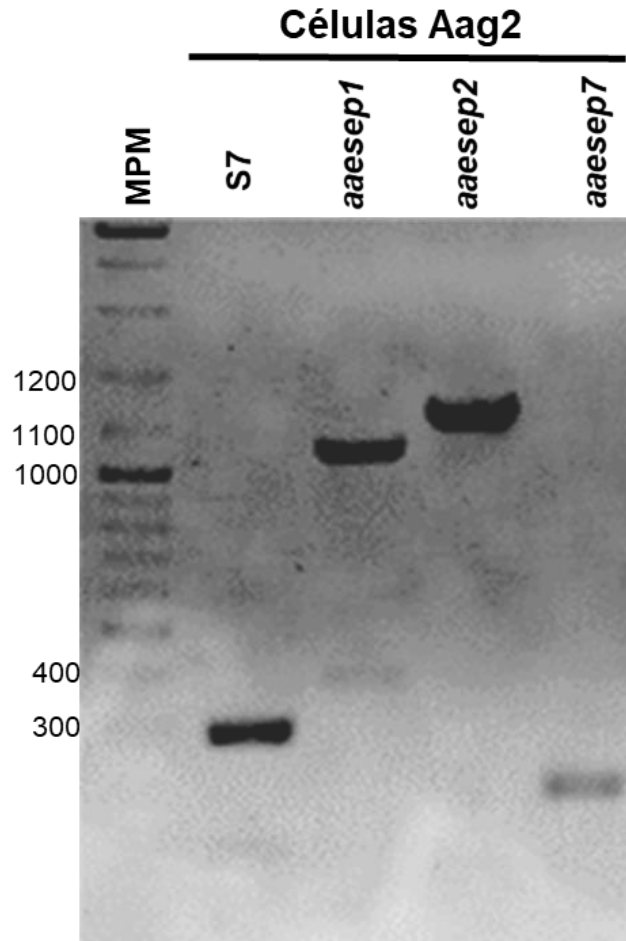


Figura 11. Expresión del RNAm de Septinas en células Aag2. El cDNA generado a partir de RNA total de células Aag2, se utilizó como molde para amplificar en ensayos de RT-PCR los mensajeros de las septinas *aaesep1* (1,098 nt), *aaesep2* (1,157 nt) y *aaesep7* (210 nt). La amplificación del RNAm de S7 fue utilizado como control interno. Los productos amplificados fueron separados en a electroforesis en gel de agarosa al 1%, se tiñeron con EtBr y se observaron con luz UV.

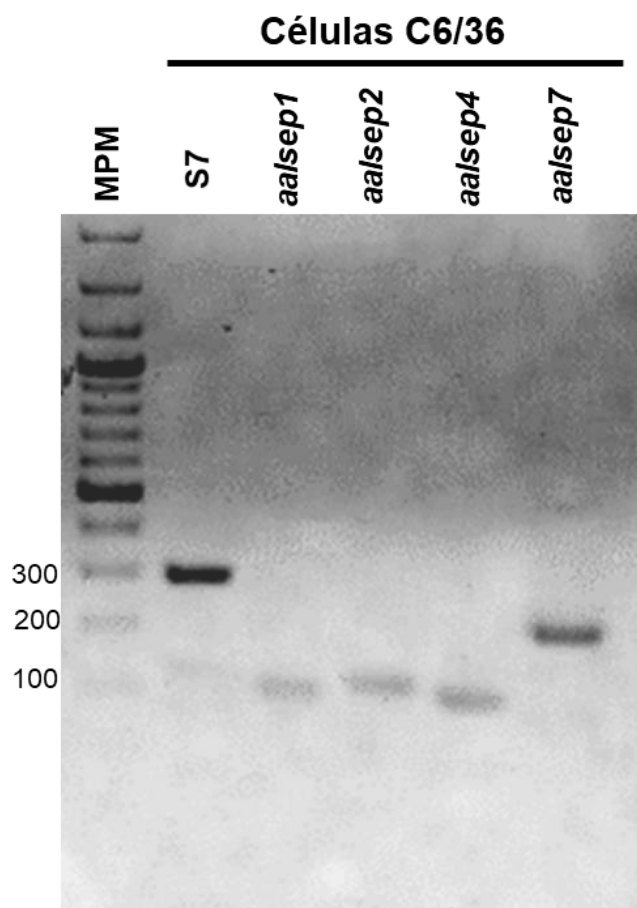


Figura 12. Expresión de RNAm de Septinas en células C6/36. El cDNA generado a partir de RNA total de células C6/36, fue utilizado como molde para la amplificación por RT-PCR de un fragmento específico de los mensajeros *aalsep1* (96 nt), *aalsep2* (116 nt), *aalsep4* (101 nt) y *aalsep7* (210 nt). La amplificación del RNAm de S7 fue utilizado como un control interno. Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% con EtBr y registrados bajo luz UV.

12.4 Expresión de la proteína septina 1 (AalSep1 y AaeSep1) y septina 2 (AalSep2 y AaeSep2) en células de mosquito.

La identificación de las proteínas AaSep1 y AaSep2 en las células de mosquito Aag2 provenientes de *Ae. aegypti* y C6/36 derivadas de *Ae. albopictus*, se realizó por ensayos de Western blot utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra septinas humanas, anti-HsSept2, ortólogo de las septinas 1 de mosquito y contra septina 6, ortólogo de las septinas 2 de mosquito (Figura 3). Las proteínas identificadas aparecieron en bandas con los pesos moleculares esperados,

aproximadamente 42kDa, para las septinas 1 (AaeSep1 y AalSep1) y 55 kDa para las septinas 2 (AaeSep2 y AalSep2). (Figuras 13 y 14).

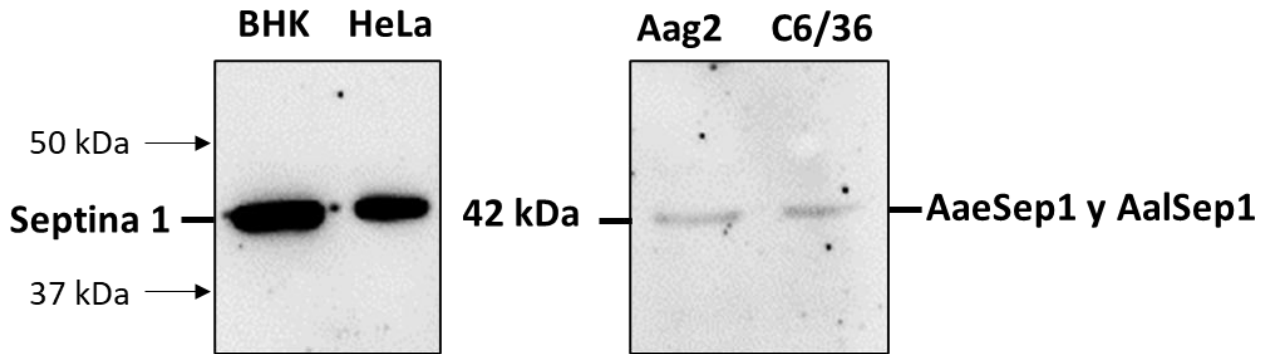


Figura 13. Inmunodetección de septina 1 en células de mosquito. Extractos proteicos totales de células Aag2 y C6/36, se analizaron por Western blot. Las muestras se separaron por SDS-PAGE al 12%, se electrotransfirieron y la septina 1 de mosquito se detectó usando un anticuerpo anti-HsSept2 (**Septina 2** de humano, ortólogo de **Septina 1** de mosquito). Extractos proteicos de células de mamífero BHK y HeLa, se utilizaron como controles positivos para la detección de **Septina 2** de vertebrados.

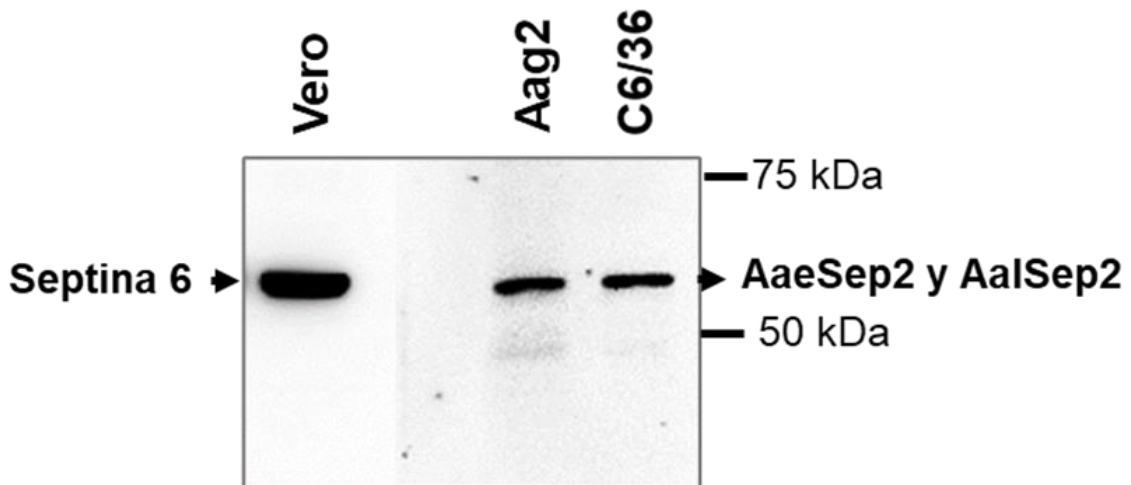


Figura 14. Inmunodetección de septina 2 en células de mosquito. Extractos proteicos totales de células C6/36 y Aag2, se analizaron por Western blot utilizando un anticuerpo anti-HsSept6 (ortólogo de las septinas AaeSep2 y AalSep2 de mosquito). Extractos proteicos de células Vero, se utilizaron como control positivo para la detección de septina 6 de vertebrados.

12.5 Expresión de la septina 2 (AaeSep2 y AalSep2) en células C6/36 y Aag2, infectadas con DENV4

Dado que se ha reportado que la septina 6 de humano participa en la replicación de flavivirus, interactuando con proteínas tanto del virus como del huésped (Kim et al., 2007), analizamos si los posibles ortólogos de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* que encontramos tienen alguna participación durante la infección con dengue. Para este fin, se estudió la expresión de AaeSep2 y AalSep2 (por ensayos de Western blot utilizando el anticuerpo anti-HsSept6 (GTX34192), en células Aag2 y C6/36, sometidas a diferentes tiempos de infección (12, 24, 36, 48 y 60 hpi) con DENV4 a una multiplicidad de infección de 3 (MOI:3). En Aag2 se observó el incremento significativo de la expresión de AaeSep2 a las 24, 36, 48 y 60 hpi (**Figura 15**) detectándose el máximo a las 48 hpi; en forma similar, en C6/36, se observó un incremento en la expresión y el máximo incremento de AalSep2 se observó a las 48 hpi (**Figura 16**). La expresión de la proteína GAPDH (anti-GAPDH, GTX100118) fue utilizada como control de carga. La inmunodetección de las proteínas NS3 (anti-NS3, GTX124252) o NS5 (anti-NS5, GTX124253) de DENV, se utilizó para el seguimiento de la infección.

Células Aag2 infectadas con DENV4 (MOI:3)

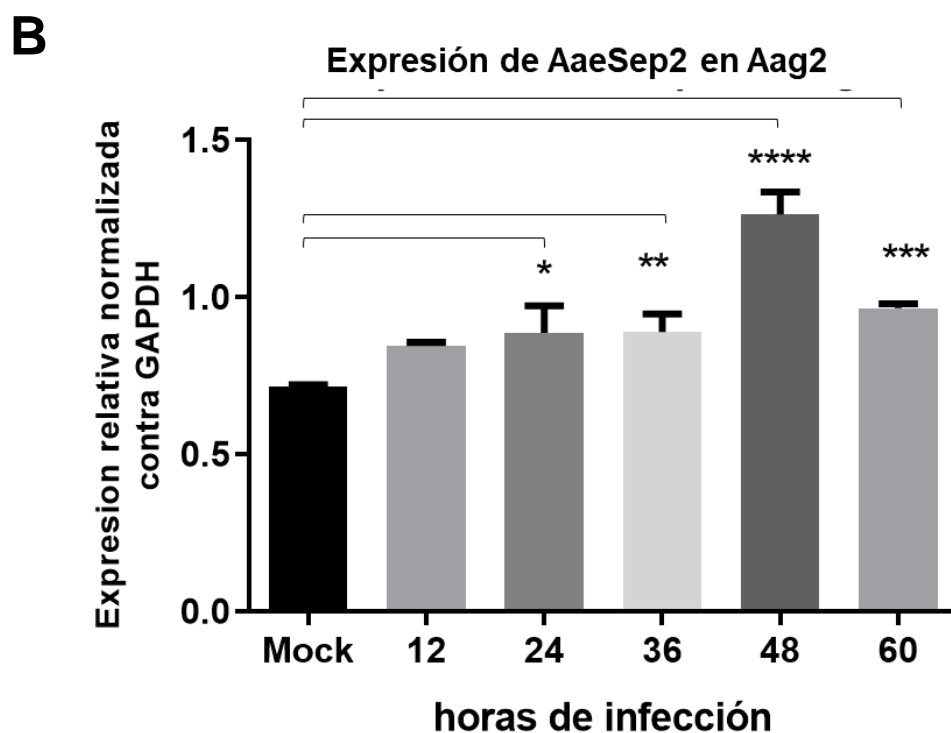
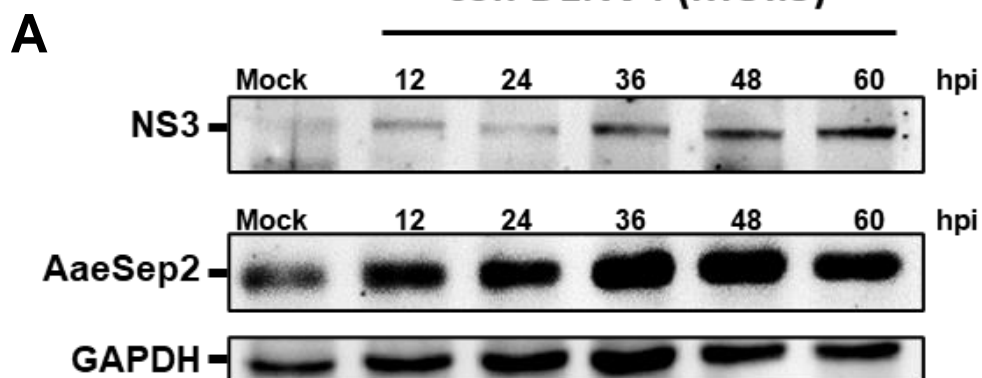


Figura 15. Expresión de la septina AaeSep2 en células Aag2 infectadas con DENV4. A) Western Blot de la cinética de infección de células Aag2 infectadas con DENV4 (MOI:3), mostro un incremento en los niveles de expresión de la septina AaeSep2 entre las 24 y 60 hpi. La proteína viral NS3 se utilizó como un control de infección y GAPDH como control de carga. **B)** Análisis densitométrico de los inmunoblots de tres experimentos independientes. El incremento más significativo de AaeSep2 se detectó a las 48 hpi, comparado con las células Mock. La significancia estadística fue determinada usando la prueba de *t* Student's (* $P < 0.0415$, ** $P < 0.0074$, **** $P < 0.00001$, *** $P < 0.0004$).

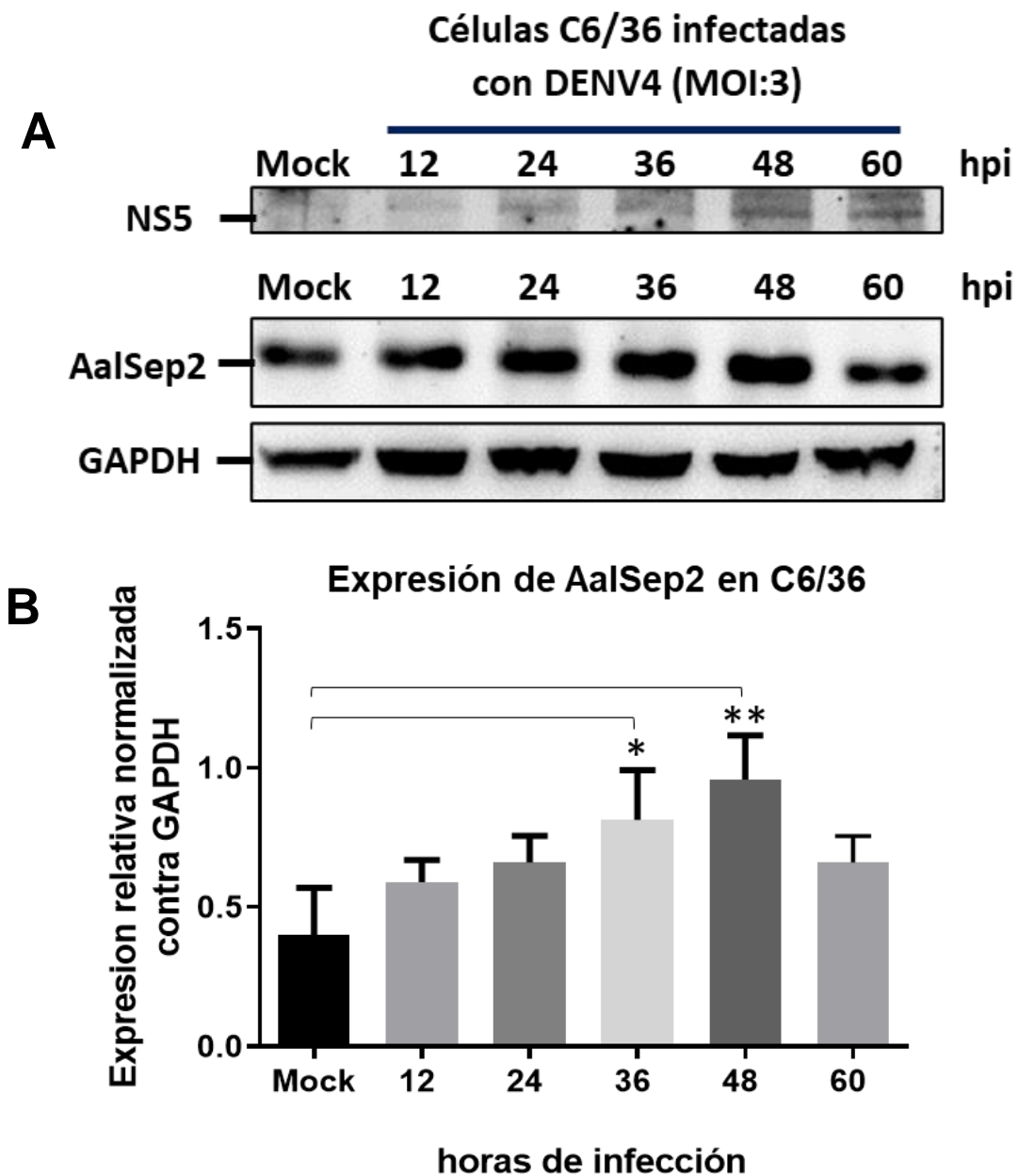


Figura 16. Expresión de la septina AalSep2 en células C6/36 infectadas con DENV4. A) Western blot de la cinética de infección de células C6/36 infectadas con DENV4 (MOI:3); la septina AalSep2 incrementó su expresión entre las 36 y 48 hpi, y a las 60 hpi disminuyó. La proteína viral NS5 se utilizó como control de infección y GAPDH como control de carga. **B)** Análisis densitométrico de inmunoblots de tres experimentos independientes, mostraron una diferencia significativa en los niveles de expresión de AalSep2 a las 36 y 48 hpi, en comparación a la expresión de AalSep2 de células C6/36 Mock (* $P < 0.0114$, ** $P < 0.0012$).

12.6 Localización celular de las septinas AaeSep2 y AalSep2 en células de mosquito (C6/36 y Aag2) infectadas con DENV4

La localización de las septinas AaeSep2 y AalSep2 en las células de mosquito Aag2 y C6/36 durante la infección con DENV4 fue monitoreada por microscopía confocal, marcando las septinas con el anticuerpo primario anti-HsSept6. Para monitorear la infección se marcó con anticuerpo la proteína viral NS3 (GTX124252) y para visualizar el marcaje se usaron anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos (Alexa 488 o Alexa 594). En las líneas celulares Aag2 y C6/36 se observó que las septinas AaeSep2 y AalSep2 presentan una expresión basal y distribución citoplasmática (**Figura 17, panel A4 y Figura 18, panel A4**). Durante la infección con DENV4 se confirmó el incremento en la expresión de AaeSep2 y AalSep2, desde las 24 hasta las 48 hpi (**Figura 17, paneles C2-E2 y C4-E4 y Figura 18, paneles C2-E2 y C4-E4**), y ésta disminuyó a las 60 hpi (**Figura 17, panel F2 y Figura 18, panel F2**). Además, entre las 24 y 48 hpi se observó una translocación parcial de ambas septinas al núcleo (**Figura 17, paneles C4-E4 y Figura 18, paneles C4-E4**).

Las septinas AaeSep2 y AalSep2 de ambas líneas celulares Aag2 y C6/36 respectivamente, tienen un comportamiento similar, en condiciones basales su localización es citoplasmática y durante la infección con DENV4 su expresión aumentó, un efecto observado por Western blot, alcanzando su máximo a las 48 hpi, y después de las 60 hpi disminuye (**Figuras 15 y 16**). Además, se observó a las 48 hpi una posible colocalización entre las Septinas AaeSep2 y AalSep2 de mosquito con la proteína viral NS3 (**Figuras 17 y 18, paneles E4**).

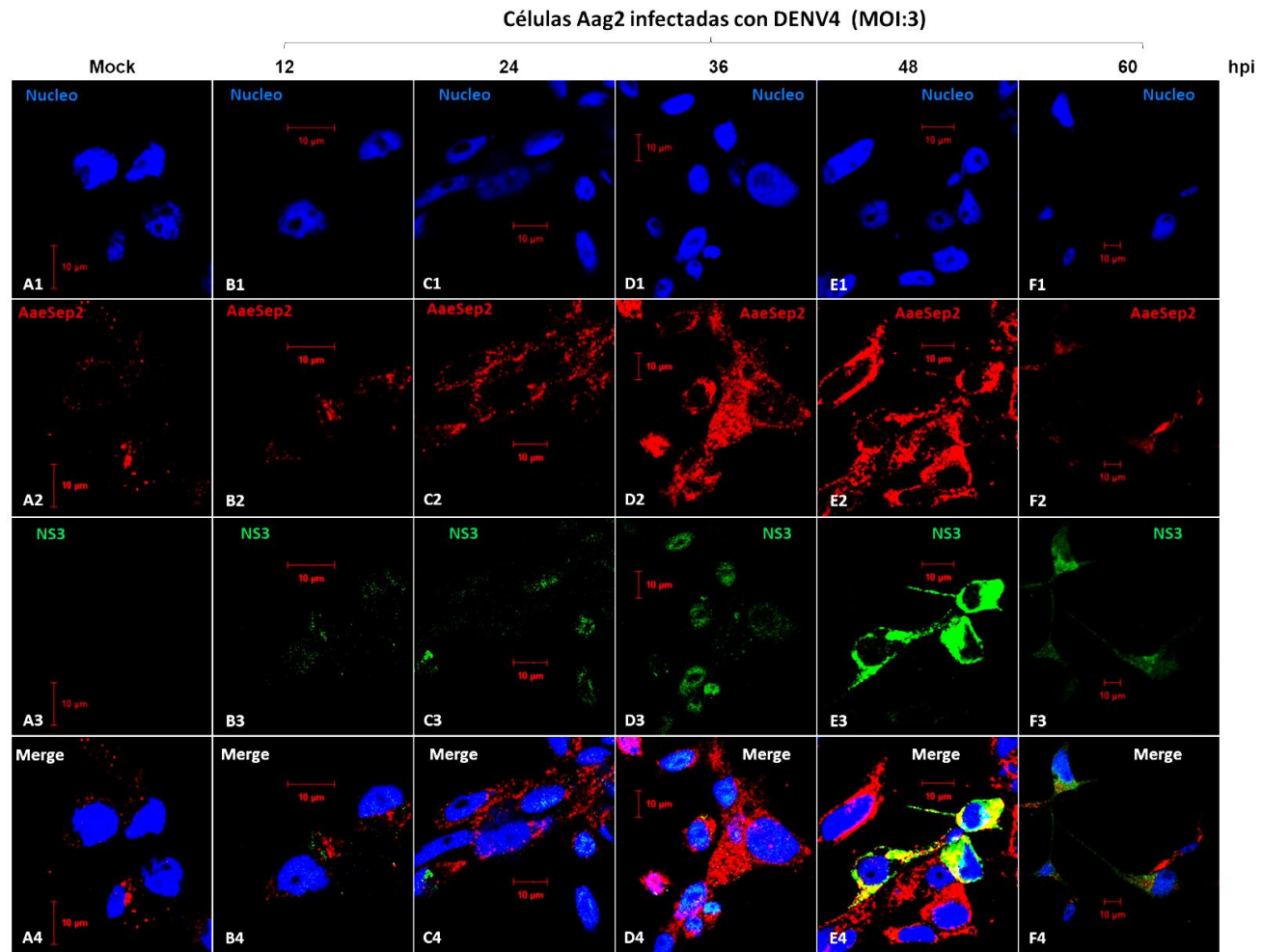


Figura 17. Localización celular de la septina AaeSep2 en células de mosquito infectadas con DENV4. Células Aag2 infectadas con DENV4 (MOI:3) fueron marcadas con anticuerpos específicos y observadas por microscopía confocal. AaeSep2 (Rojo), NS3 (Verde) y núcleo con DAPI (Azul). AaeSep2 está distribuido en el citoplasma en células Mock. Durante la infección La señal fluorescente de AaeSep2 incrementa entre las 24, 36 y 48 hpi (C2-E2 y C4-E4) y ocurre una ligera relocalización al núcleo a las 24 y 36 hpi (C2, C4 y D2, D4). La tinción de la proteína NS3 (verde), fue utilizada para dar seguimiento a la infección.

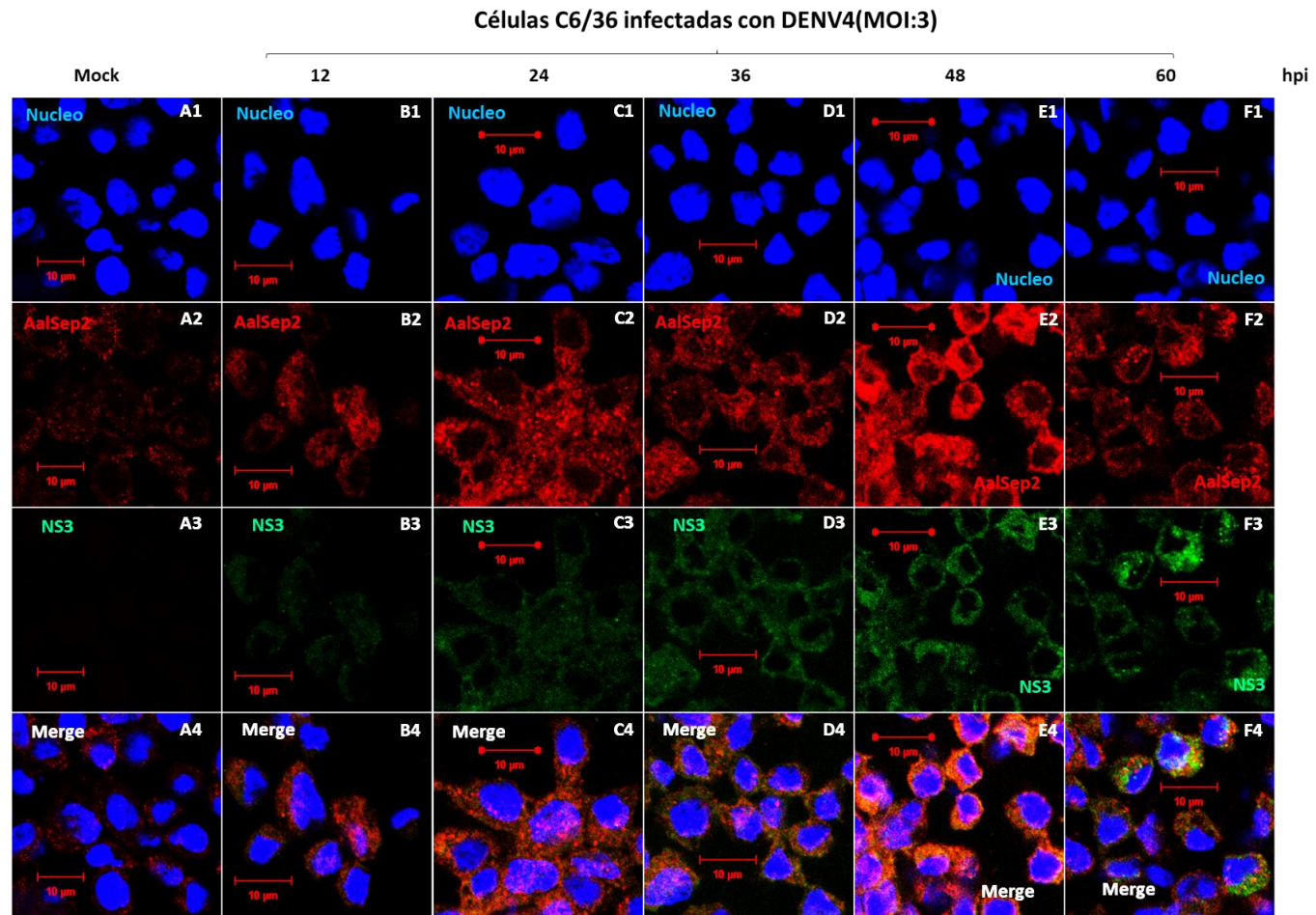


Figura 18. Localización de la septina AalSep2 en células de mosquito infectadas con DENV4. Microscopia confocal de células C6/36 infectadas con DENV4 (MOI:3), teñidas con anticuerpos específicos, AalSep2 (rojo) y NS3 (verde) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Durante la infección la señal fluorescente de AalSep2 se localizó en el citoplasma e incrementó entre las 24 y 48 hpi (C2-D2 y C4-D4) a las 24, 36 y 48 hpi una parte de AaeSep2 se translocó al núcleo. La proteína NS3 (verde), se utilizó como control de la infección viral de las células (A3-F3).

12.7 Colocalización de las Septinas AaeSep2 y AalSep2 con las proteínas C y E de DENV

Para estudiar la posible colocalización de las septinas de mosquitos *Aedes* spp. con otras proteínas virales, además de la ya observada con NS3, células de mosquito (C6/36 y Aag2) infectadas con DENV4 a una MOI:3 fueron analizadas por microscopía confocal a las 48 hpi, utilizando anticuerpos específicos contra septinas y contra las proteínas estructurales de la cápside (C), envoltura (E) y la proteína no estructural 1 (NS1) de DENV tanto en células Aag2 (**Figura 19**) como C6/36 (**Figura 20**). Para este fin, la señal de fluorescencia obtenida con anti-septina y con los anticuerpos específicos contra las proteínas virales, marcados con fluorocromos diferentes, se registró y la superposición de colores se evaluó calculando el Coeficiente de Correlación de Pearson (PCC) considerando como señales superpuestas aquellas que presentaron valores superiores a 0.5 (Dunn et al., 2011).

En ambas líneas celulares las septinas AaeSep2 (**Figura 19, paneles B4 y B5**) y AalSep2 (**Figura 20, paneles B4 y B5**), colocalizaron tanto con la proteína viral C como con la proteína E. Los valores de $PCC \geq 0.5$ para las colocalizaciones analizadas fueron: AaeSep2-C (0.51) y AaeSep2-E (0.55) (**Figura 19, paneles B6 y C6**) y, AalSep2-C (0.55) y AalSep2-E (0.60) (**Figura 20, paneles B6 y C6**), indicando una colocalización verdadera y una posible interacción entre las septinas AaeSep2 y AalSep2 con las proteínas estructurales C y E de DENV. Como era esperado, en los controles no infectados (Mock) de ambas líneas celulares (Aag2 y C636) se observó solo la expresión basal de las septinas AaeSep2 (**Figura 19, paneles A2, A4-A6**) y AalSep2 (**Figura 20, paneles A2, A4-A6**) y la ausencia de señal para NS1, (**Figuras 19 y 20, paneles A2**).

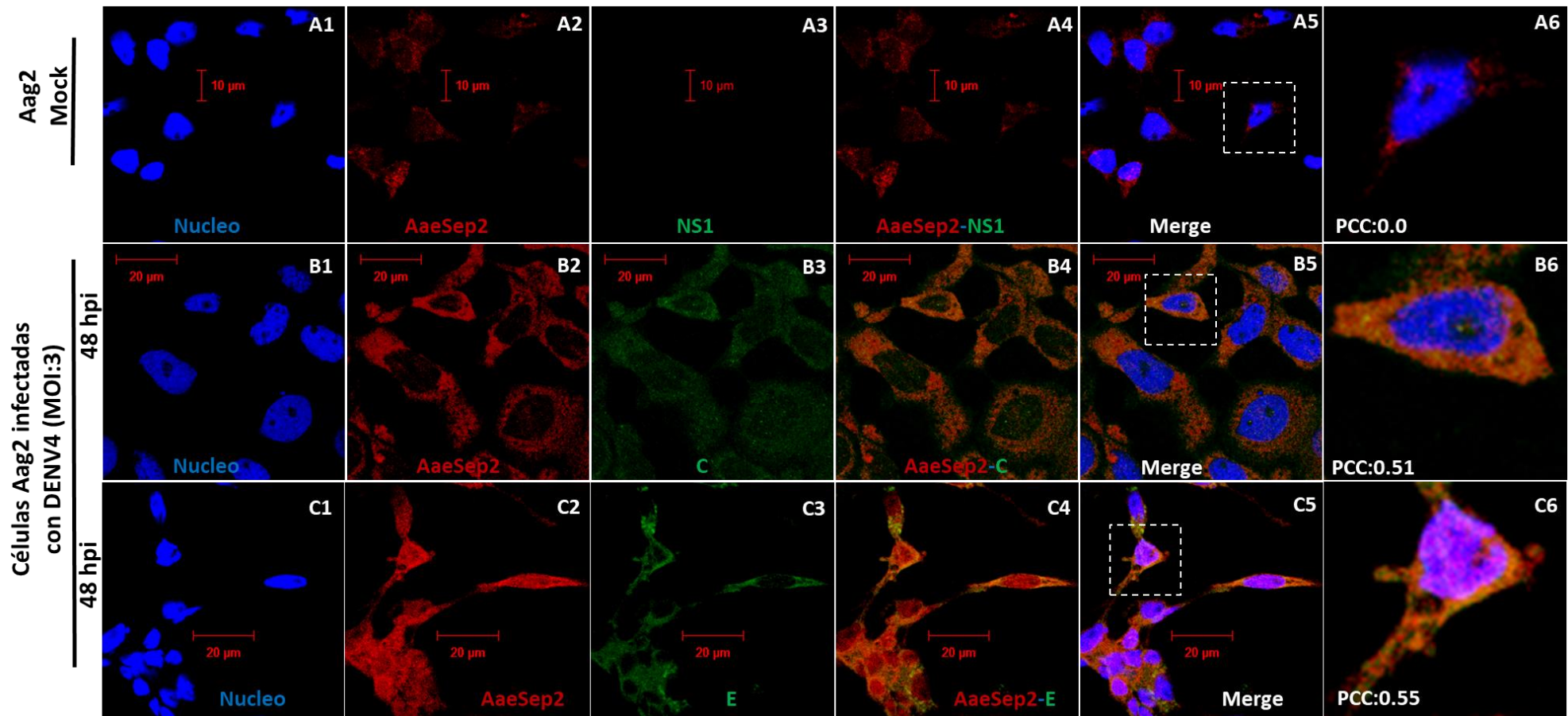


Figura 19. AaeSep2 colocaliza con las proteínas C y E de DENV. Células Aag2 infectadas con DENV4 (MOI:3), fueron teñidas para las proteínas AaeSep2 (Rojo), NS1, C y E (Verde) y núcleo (azul). Después de 48 hpi, las células fueron fijadas y analizadas por microscopia confocal, detectándose la colocalización de AaeSep2 con las proteínas virales C y E. Las áreas punteadas fueron aumentadas para mostrar detalles de áreas representativas. Las células Mock fueron negativas para NS1. La colocalización entre AaeSep2 y proteínas virales, fue evaluada mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson ($PCC \geq 0.5$) registrando al menos 25 células independientes.

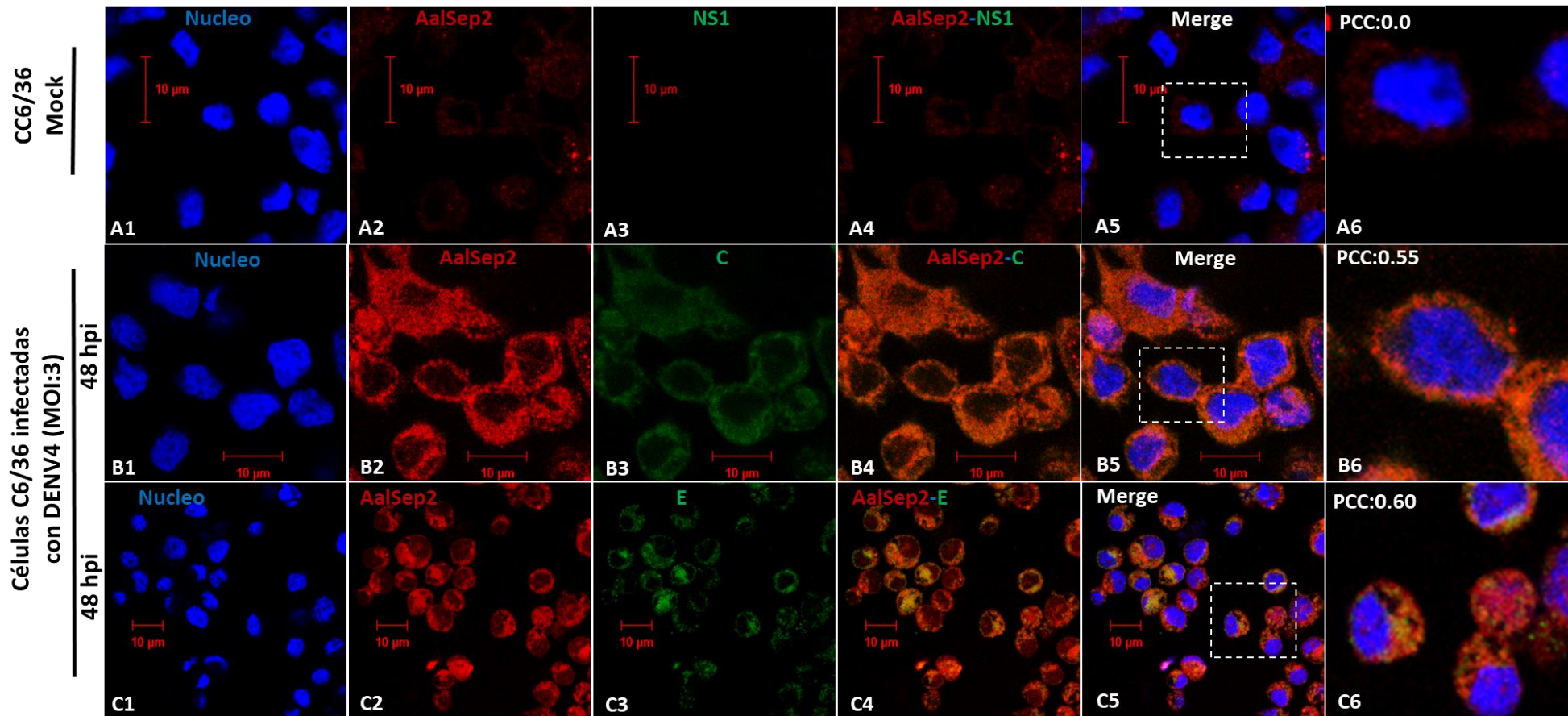


Figura 20. AalSep2 colocaliza con las proteínas C y E de DENV. Células C6/36 infectadas por 48 hpi con DENV4 (MOI:3), fueron fijadas, teñidas con anticuerpos ligados a fluorocromos diferentes para AalSep2 (Rojo), NS1, C y E (Verde) y analizadas por microscopía confocal. Células Mock fueron teñidas para NS1 como control. Para evaluar la colocalización entre AalSep2 y proteínas virales, se registraron las imágenes y la intensidad de cada color en al menos 25 células independientes fue utilizada para el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (PCC). Valores de $PCC \geq 0.5$ se consideran indicativas de colocalización. Las áreas punteadas indican áreas aumentadas para mostrar detalle.

12.8 Colocalización de la Septina AaeSep2 y AalSep2 con las proteínas NS3 y NS5 de DENV

Dado que se ha observado que NS3 y NS5 interaccionan entre ellas (Kapoor et al., 1995) y que en nuestras observaciones preliminares se sugiere la interacción de septinas con estas proteínas virales, se estudió la colocalización de AaeSep2 con NS3 (**Figura 21, panel C4**), y con NS5 en las células Aag2 (**Figura 21, panel D4**). Resultados similares fueron observados con la septina AalSep2 y las proteínas NS3 y NS5, en células C6/36 (**Figura 22, paneles C4 y D4**). Los valores de PCC ≥ 0.5 para las colocalizaciones analizadas fueron: AaeSep2-NS3 (0.60), AaeSep2-NS5 (0.62), y AalSep2-NS3 (0.56) y AalSep2-NS5 (0.52). En ambos casos los valores de PCC ≥ 0.5 fueron consistentes con colocalizaciones verdaderas (**Figuras 21 y 22, paneles C5 y D5**), sugiriendo una posible interacción entre la septina AaeSep2 y AalSep2 con las proteínas NS3 y NS5 de DENV.

En contraste, no se observó colocalización con la proteína NS1 (**Figuras 21 y 22, paneles B4 y B5**) y como era esperado, en las células Aag2 y C6/36 Mock sólo se detectó la señal basal de las proteínas AaeSep2 y AalSep2 (**Figuras 21 y 22, paneles A1-A5**).

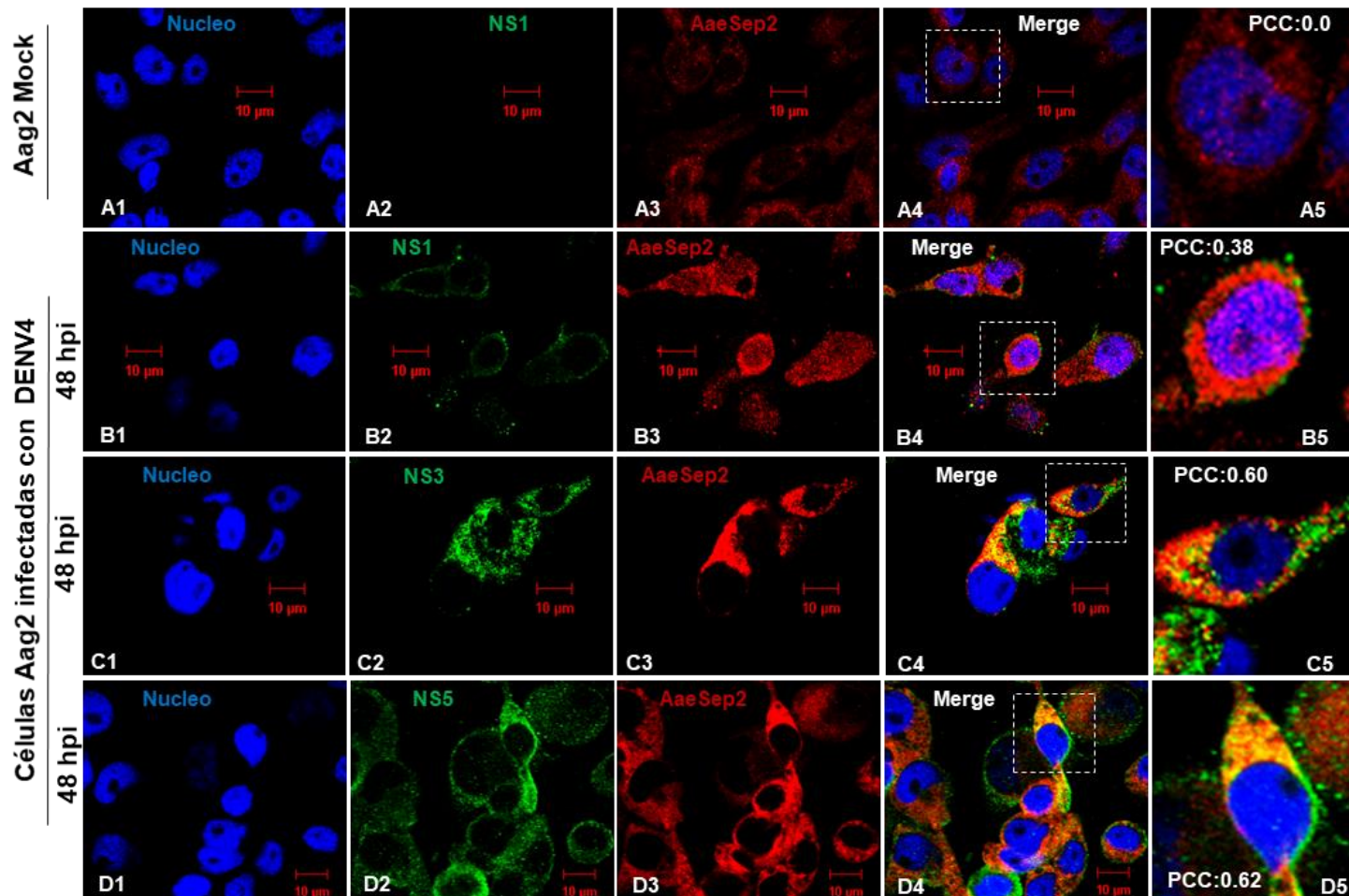


Figura 21. AaeSep2 colocaliza con NS3 y NS5 de DENV. Células Aag2 infectadas con DENV4 (MOI:3) fueron fijadas a las 48 hpi, teñidas con anticuerpos marcados con fluorocromos para AaeSep2 (Rojo), NS1, NS3 y NS5 (Verde), se observaron por microscopia confocal, y las imágenes fueron registradas para analizar la colocalización entre AaeSep2 con NS3 y NS5, a partir del cálculo del coeficiente de correlación de Pearson en al menos 25 células independientes ($PCC \geq 0.5$). Las áreas punteadas muestran detalles de las células. Células Mock fueron teñidas para NS1, la cual no mostró colocalización y fueron utilizada como control del curso de la infección.

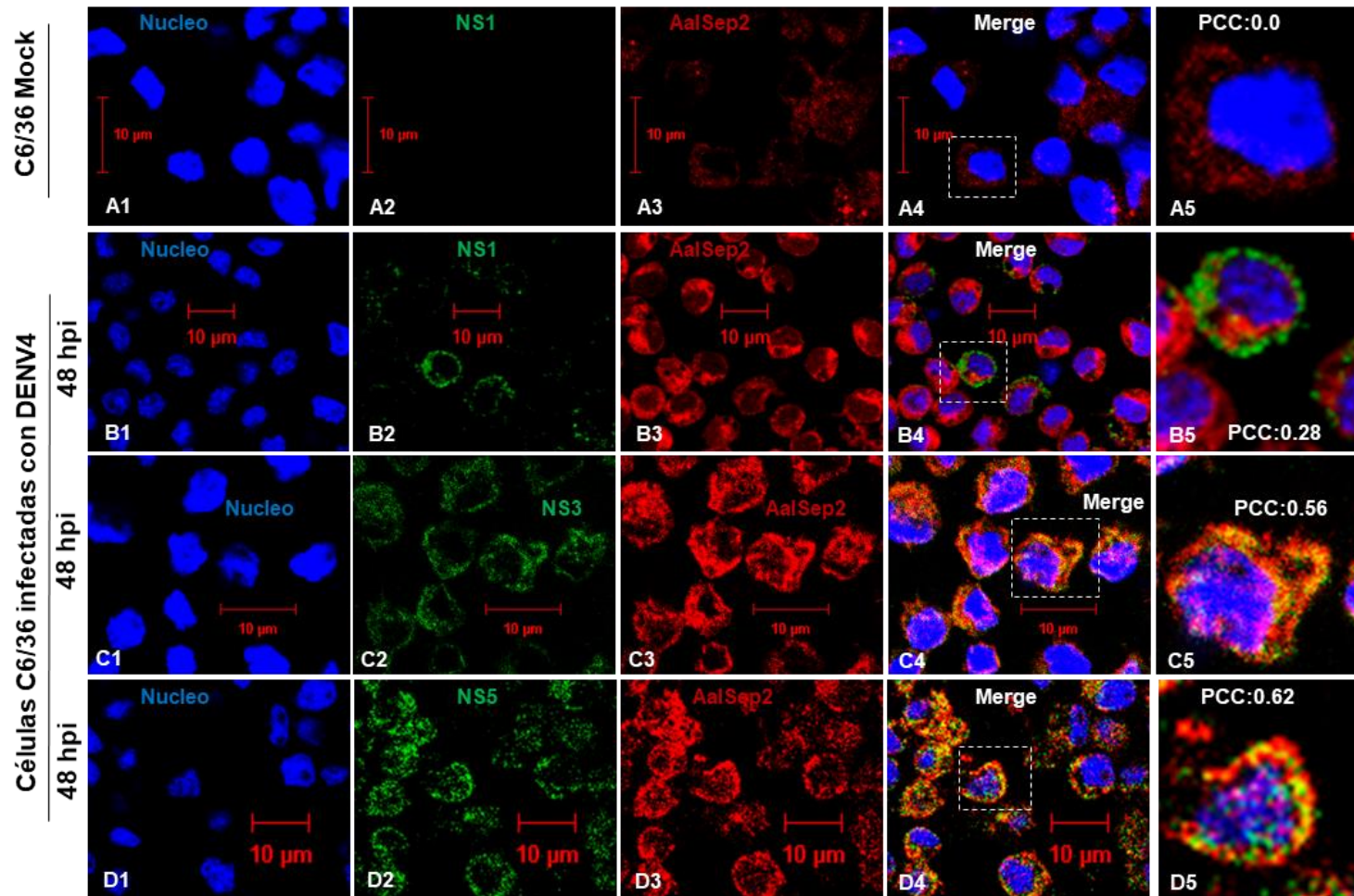


Figura 22. AalSep2 colocaliza con NS3 y NS5 de DENV. Células C6/36 infectadas con DENV4 (MOI:3) fueron fijadas a las 48 hpi, teñidas con anticuerpos marcados con fluorocromos para AalSep2 (Rojo), NS1, NS3 y NS5 (Verde), se observaron por microscopia confocal, y las imágenes fueron registradas para analizar la colocalización entre AalSep2 con NS3 y NS5, a partir del cálculo del coeficiente de correlación de Pearson en al menos 25 células independientes ($PCC \geq 0.5$). Las áreas punteadas muestran detalles de células que ejemplifican la colocalización. Células Mock fueron teñidas para NS1 como control del curso de la infección.

12.9 Interacción directa de la septina AalSep2 con proteínas de DENV

Las observaciones de colocalización entre las septinas AalSep2 y AaeSep2 con las proteínas estructurales C y E y las no estructurales NS3 y NS5 de DENV fueron confirmadas por ensayos de ligación por proximidad (Proximity Ligation Assay, PLA) método que permite detectar interacciones proteína-proteína usando anticuerpos específicos, sin dañar la arquitectura celular y la señal fluorescente que se genera puede ser cuantificada.

En células C6/36 infectadas con DENV4 a una MOI:3 a 48 hpi se observó la señal positiva en forma de puntos rojos que indican la interacción directa entre AalSep2 con las proteínas no estructurales NS3 y NS5 (**Figura 23, paneles C y D**). En contraste, no se observó señal con la proteína NS1 (**Figura 23, panel E**). Con respecto a las proteínas estructurales de DENV4, AalSep2 generó señal positiva con la proteína E (**Figura 23, panel F**), y no con la proteína C del virus. Para los experimentos de PLA se usaron como controles células Mock incubadas con anticuerpos primarios contra AalSep2 y NS3, (**Figura 23, panel A**), y el control técnico con células C6/36 infectadas con DENV4 incubadas únicamente con el anticuerpo primario anti-NS3 (**Figura 23, panel B**).

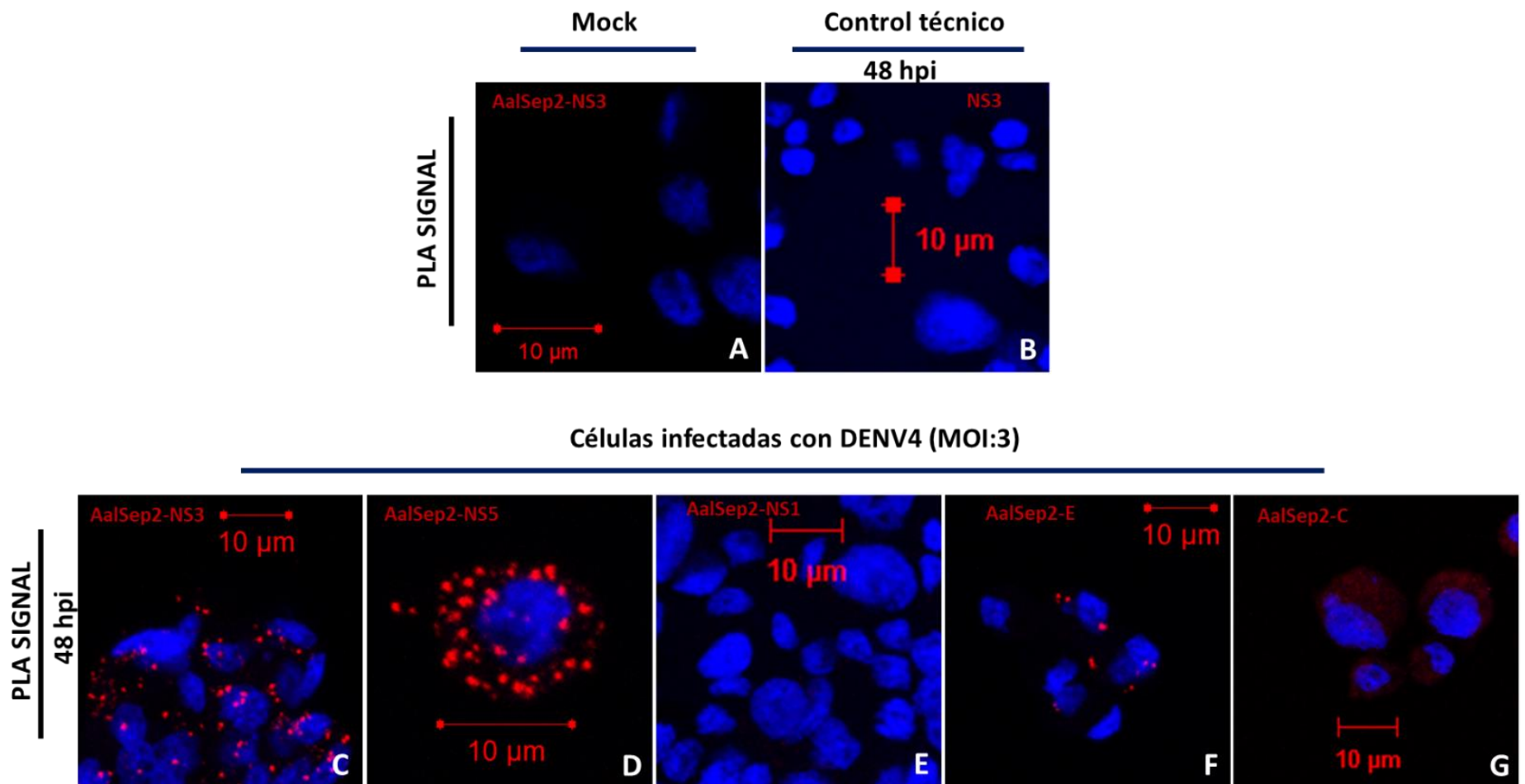


Figura 23. Septina AalSep2 interacciona con las proteínas E, NS3 y NS5 de DENV4. Ensayos de ligación por proximidad (PLA-Duolink) entre AalSep2 y proteínas virales en células C6/36 infectadas con DENV4 (MOI:3). Las señales PLA (puntos rojos), corresponden al reconocimiento de las interacciones AalSep2-E, AalSep2-NS3 y AalSep2-NS5. El núcleo fue teñido con DAPI (Azul). Como controles se utilizaron células Mock incubadas con los anticuerpos anti-HsSept6 y anti-NS3 y células infectadas incubadas solo con el anticuerpo anti-NS3.

12.10 Co-Inmunoprecipitación de NS3 y NS5 con anti-HsSept6

Para verificar la interacción física entre la septina AalSep2 con proteínas virales, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación con proteínas totales de células C6/36 Mock e infectadas con DENV durante 48 h, utilizando el anticuerpo anti-HsSept6 (Unido a una resina de acoplamiento) que reconoce a la septina AalSep2, en células C6/36 de mosquito. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos (anti-HsSept6, anti-NS3 y anti-NS5), para identificar la presencia de AalSep2, NS3 y NS5 (**Figura 24**). En concordancia con los resultados de PLA, en los ensayos de co-inmunoprecipitación se detectaron a las proteínas NS3 y NS5 (**Figura 24**), pero no se detectó a la proteína C, aunque curiosamente tampoco se identificó a la proteína E del virus (Datos no mostrados), la cual por ensayos de PLA nos dio una señal de interacción positiva. Como era esperado, en el eluido de proteínas obtenido de células Mock solo se identificó a la septina AalSep2 (**Figura 24**). Estos resultados confirmaron que la septina AalSep2 interacciona de forma directa con las proteínas NS3 y NS5 de DENV. Estos resultados también mostraron que la concentración de septina AalSep2 inmunoprecipitada en células infectadas, fue mayor que la presente en células Mock.

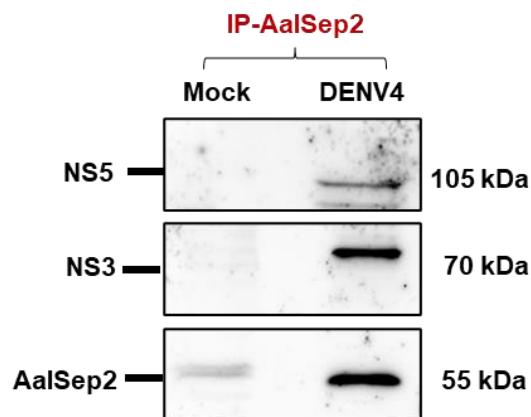


Figura 24. Inmunoprecipitación de NS3 y NS5 de DENV4 con septina AalSep2 . En ensayos de Co-inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-HsSept6 y extractos proteicos totales de células C6/36 infectadas, se identificó la septina AalSep2 inmunoprecipitada con la proteína NS3 y NS5 de dengue. co-inmunoprecipitación con extractos proteicos totales de células no infectadas fue utilizado como control.

12.11 Localización de septina AalSep2 en complejos replicativos de células C6/36 infectadas con DENV4

Se ha reportado que durante la infección de células de mosquito con DENV, hay alteraciones de la membrana, donde se forman los complejos de replicación del virus (Junjhon et al., 2014). Por este antecedente y dado que observamos interacción entre la septina AalSep2 con las proteínas NS3 y NS5, las cuales forman parte de complejos de replicación (RC) de DENV, se analizó la posible presencia de AalSep2 en los RC mediante inmunomicroscopía electrónica, utilizando el anticuerpo anti-HsSept6 y un segundo anticuerpo acoplado a partículas de oro (**Figura 25**). En las células C6/36 infectadas se observaron paquetes vesiculares (VPs) con vesículas de membrana que se conoce son inducidas por DENV4 y en ellas se localizó la marca con partículas de oro coloidal que indicaron la presencia de la septina AalSep2, tanto en el interior como en la periferia de vesículas de membrana (**Figura 25, paneles A, B y C**). Estas vesículas no se observaron en las células mock y el número de partículas de oro correspondientes a la septina AalSep2 basal, fue menor en comparación al observado en células infectadas (**Figura 25, panel D**). Además, en las células mock, AalSep2 se observó en el citoplasma y en estructuras vacuolares de doble membrana, probablemente autofagosomas (**Figura 25, panel E y F**), las cuales no fueron vistas en células infectadas. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que, en células de mosquito, esta proteína está en los complejos replicativos de DENV4.

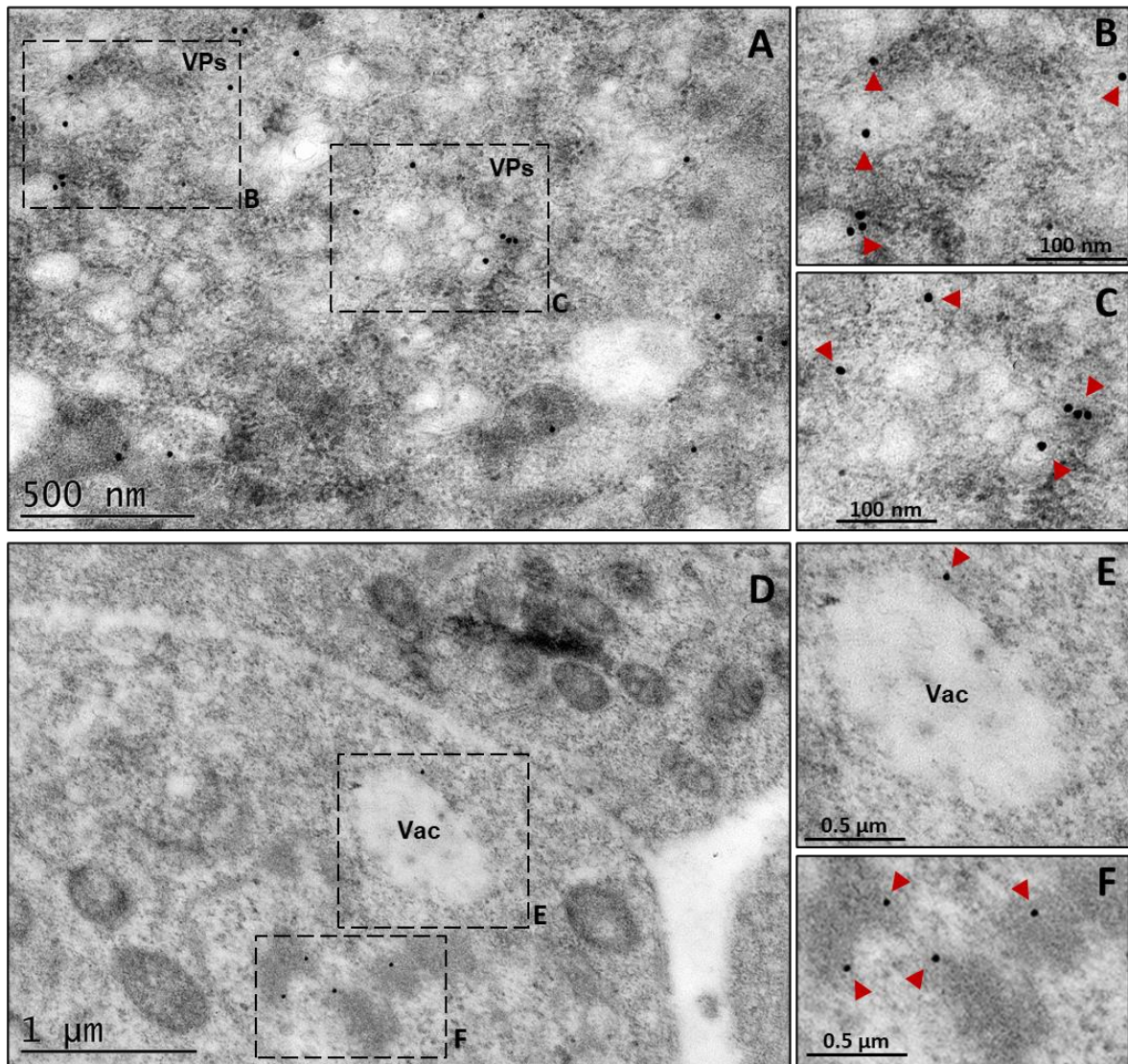


Figura 25. AalSep2 está localizada en complejos replicativos de células C6/36 infectadas con DENV4. Células C6/36 infectadas con DENV4 (MOI=3) por 48 horas, fueron fijadas y marcadas para AalSep2 utilizando el anticuerpo anti-HsSept6 que reconoce a septina AalSep2 de mosquito, y un anticuerpo anti- IgG anti-conejo conjugado a partículas de oro de 15 nm. **(A)** En células C6/36 infectadas con DENV4 se observaron paquetes vesiculares (VPs), formados por vesículas de membrana donde se encuentran los complejos replicativos (RC), y en ellos se detectó la marca de oro coloidal de la septina Aalsep2. **(B y C)** Proyecciones aumentadas de la figura A, para mostrar la presencia de septina AalSep2. **(D)** Células mock con apariencia normal y nivel basal de AalSep2. **(E y F)**. Proyecciones aumentadas, de la figura D con la localización basal de AalSep2 en el citoplasma. Las cabezas de flecha indican la localización de la septina AalSep2.

12.12 Silenciamiento de la septina AalSep2 y AaeSep2 en células de mosquito

Para analizar la función de las Septinas de las células de mosquito durante la infección con DENV, se procedió a silenciar las septina AalSep2 de C6/36 y AaeSep2, de Aag2. El silenciamiento se realizó utilizando el kit de transfección HiPerFect y DsiRNA-AalSep2 y DsiRNA-AaeSep2 específicos (**Tabla 4**). Como control se usó un DsiRNA-NT (No Targeting). A las 48 h después de la transfección, mediante ensayos de Western blot y análisis densitométrico, se observó una caída significativa (25-30%) en la expresión de la septina AalSep2 en células C6/36 (**Figura 26, A y B**) y AaeSep2 en células Aag2 (**Figura 26, C y D**), esto con respecto a las células tratadas con el DsiRNA-NT (**Figura 26**), el cual fue utilizado como control.

La viabilidad de las células tratadas con los DsiRNA-NT o DsiRNA-AalSep2, fue evaluada mediante el ensayo MTS de proliferación celular no radiactivo utilizando el Kit Cell Titer 96 AQueous, y no se presentaron cambios significativos entre los diferentes tratamientos (**Figura 27**).

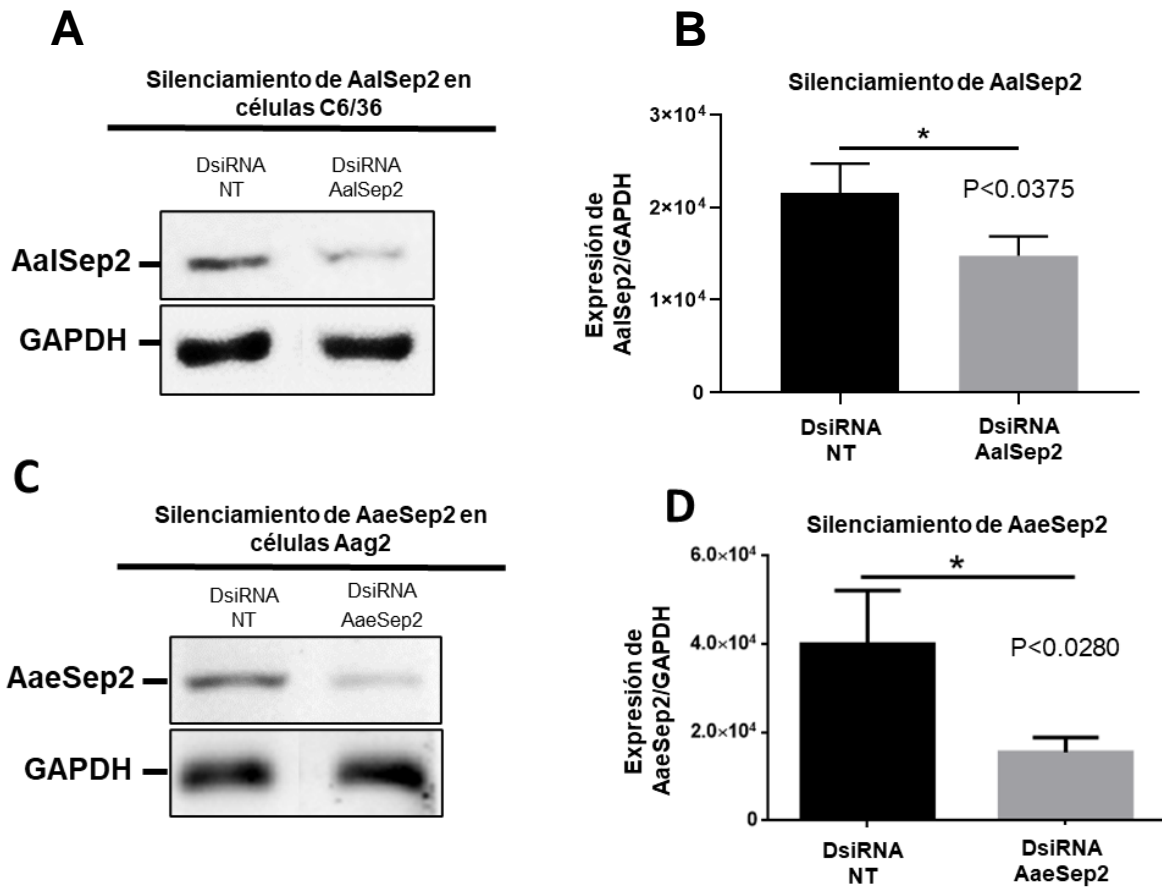


Figura 26. Silenciamiento de Septina 2 en células de mosquito. Células de mosquito fueron transfectadas con DsiRNAs dirigidos contra la septina AalSep2 o AaeSep2 o con un DsiRNA no específico (DsiRNA-NT), utilizado como control negativo. El silenciamiento de AalSep2 en células C6/36 (**A y B**) o AaeSep2 en células Aag2 (**C y D**), fue evaluado mediante ensayos de Western blot y la expresión de la proteína fue medida y normalizada con GAPDH después de 48 h de transfección. Los datos graficados son el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar de las medias (SEM). Las diferencias significativas, fueron calculadas usando la prueba t-Student (con un Intervalo de confianza del 95% y una $P < 0.05$) y representadas con asteriscos ($P \leq 0.05$).

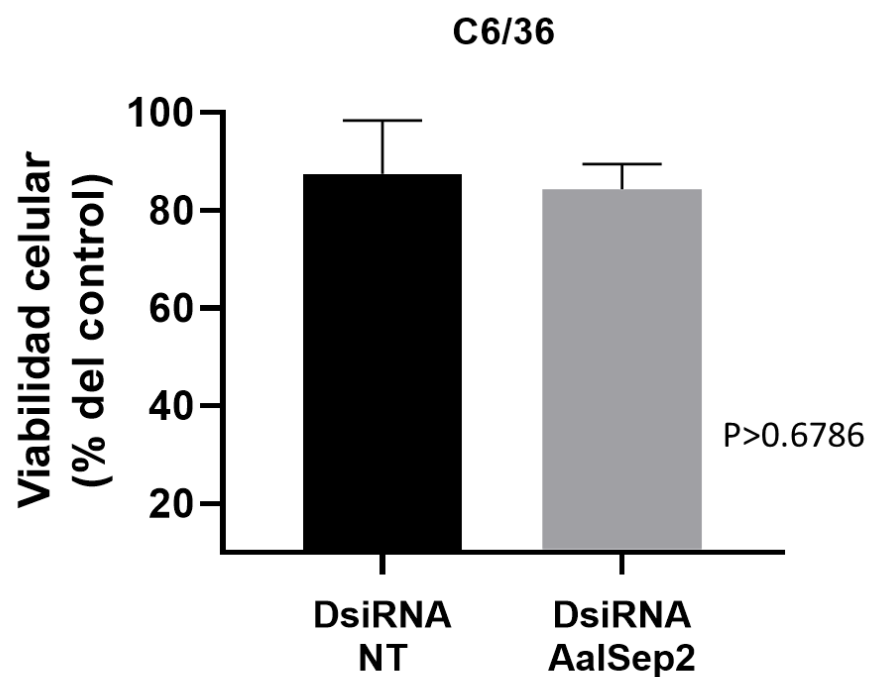


Figura 27. Viabilidad de células C6/36 infectadas con DENV4 y tratadas con DsiRNAs. Células C6/36 (2×10^4 células por pozo) se cultivaron en placas de 96 pocillos y tratadas con DsiRNA-NT o DsiRNA-AalSep2 y después de 48 h se midió la viabilidad celular con el kit Cell Titer 96 AQueous. (MTS assay) y se expresó como un porcentaje respecto al control. El número de células viables en cada muestra se determinó por triplicado y los datos fueron evaluados utilizando la prueba estadística t-Student (con un Intervalo de confianza del 95% y una $P < 0.05$).

12.13 Análisis del silenciamiento de septina 2 (AalSep2 y AaeSep2) de mosquito por Inmunofluorescencia.

Además de los ensayos de Western blot, el silenciamiento de las Septinas AalSep2 y AaeSep2, también se verificó por microscopía confocal. Tanto en las células C6/36 tratadas con DsiRNA-AalSep2 (**Figura 28, panel A**), como en las células Aag2 tratadas con DsiRNA-AaeSep2 (**Figura 28, panel C**), se observó una caída significativa (30-35% en C6/36 y 30-40% en Aag2) en la señal fluorescente en comparación a la señal observada en las células tratadas con el DsiRNA-NT, el cual fue utilizado control (**Figura 28, panel B y D**).

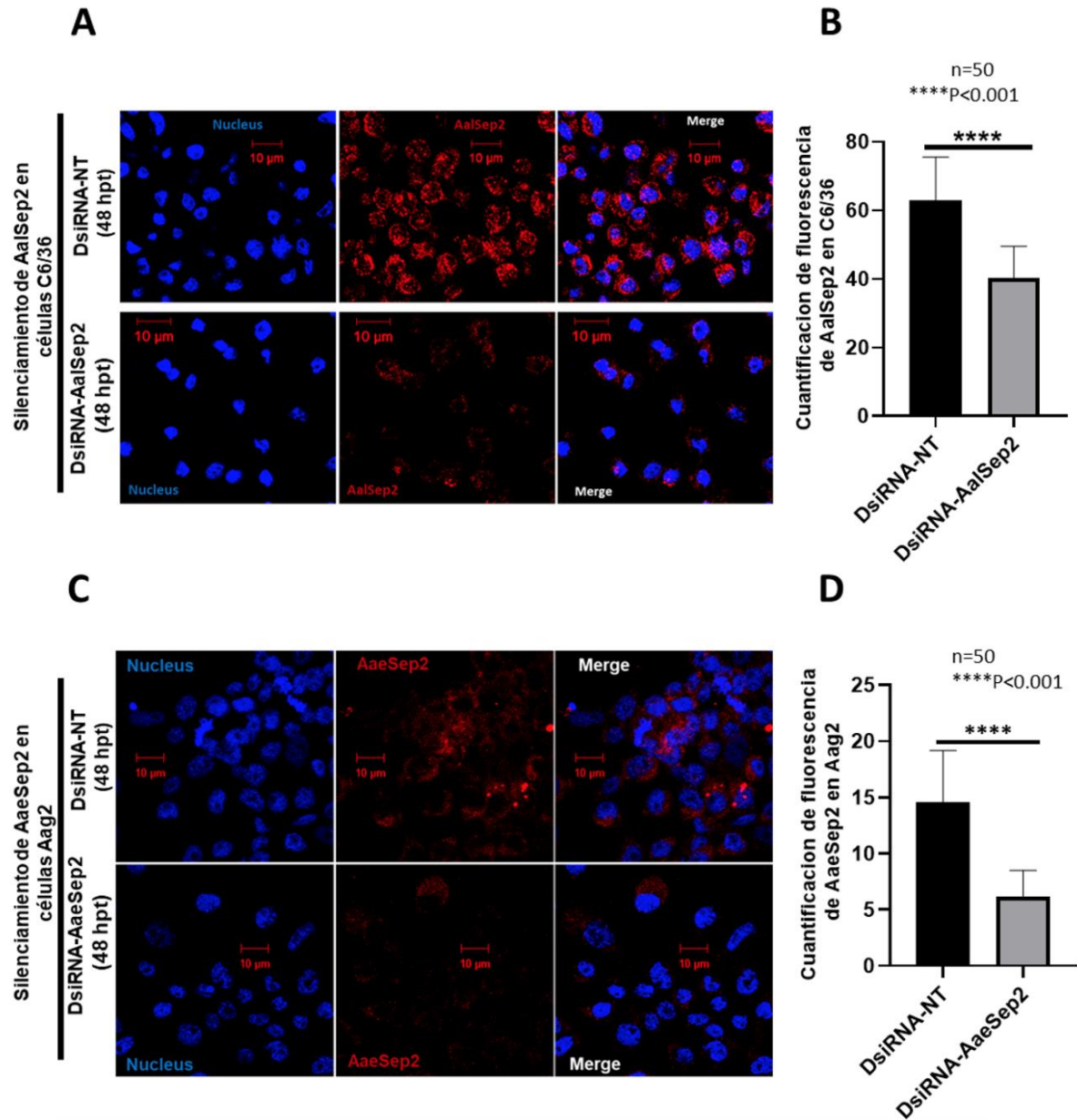


Figura 28. Silenciamiento de Septina 2 en células de mosquito. Células de mosquito fueron transfectadas con DsiRNAs dirigidos contra la septina AalSep2 o AaeSep2 o con un DsiRNA control (DsiRNA-NT). Después de 48 h de transfección (hpt), las células fueron fijadas y marcadas para AalSep2 o AaeSep2 (Rojo) y con DAPI, para la tinción del núcleo (Azul). El silenciamiento de AalSep2 en células C6/36 (**A y B**) o AaeSep2 en células Aag2 (**C y D**), fue observado por inmunofluorescencia que se cuantificó a partir de las imágenes utilizando el software Zen Blue edition versión 2.6. 2.6. Los datos graficados, son el promedio del análisis de 50 células individuales y la significancia de las diferencias se evaluó usando la prueba t-Student (con un Intervalo de confianza del 95% y una $P < 0.05$). Las diferencias significativas se indican con asteriscos ($P \leq 0.05$). (**** $P < 0.001$)

12.14 Efecto del silenciamiento de la septina 2 de mosquito en el ciclo replicativo de DENV4

Después de haber estandarizado el silenciamiento de la septina AalSep2 en células C6/36 y AaeSep2 en Aag2, analizamos su efecto sobre la infección con DENV4. En primer lugar, se analizó la producción de partículas virales, para lo cual los sobrenadantes de células C6/36 y Aag2 silenciadas e infectadas con DENV4 durante 48 h, fueron utilizados en ensayos de formación de focos en células BHK-21, y se observó una caída significativa del título viral (**Figura 29, paneles A y B**), en comparación con el título viral obtenido de células C6/36 y Aag2 tratadas con el silenciador control (DsiRNA-NT).

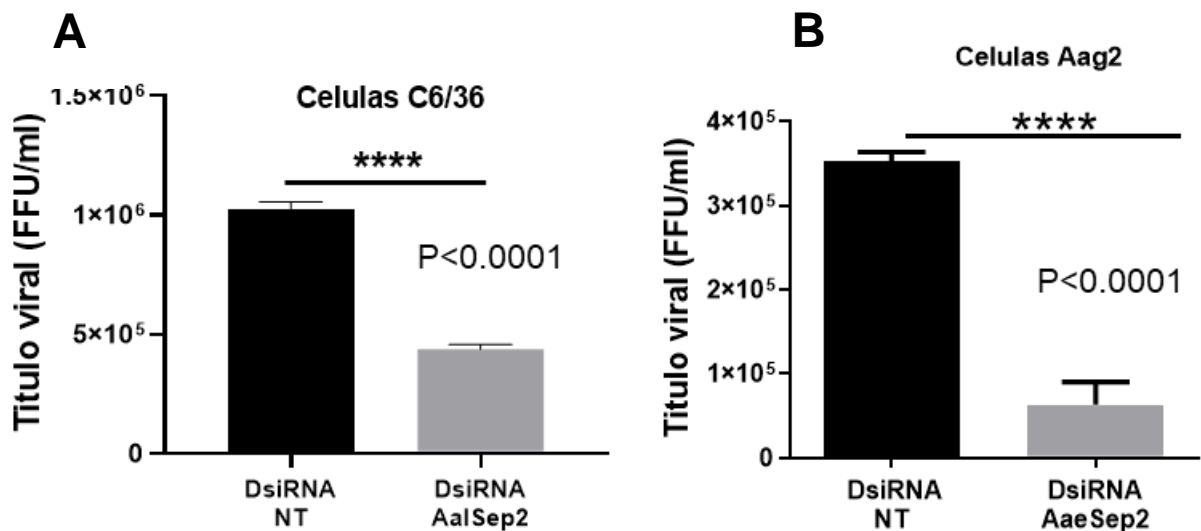


Figura 29. Título viral de células C6/36 y Aag2 silenciadas. **A)** Sobrenadantes de células C6/36 silenciadas con DsiRNA-AalSep2 e infectadas con DENV4 (MOI:3), se usaron para medir el título viral mediante ensayos de formación de focos. **B)** Sobrenadantes de células Aag2 silenciadas con DsiRNA-AaeSep2 e infectadas con DENV-4 (MOI:3), se usaron para medir el título viral. En ambos casos los resultados se expresan como unidades formadoras de focos (FFU, Focus Forming Units) por ml. Tanto en células C6/36 como Aag2, se observó una caída significativa del título viral ($P<0.0001$), con respecto al título de células tratadas con un silenciador control (DsiRNA-NT). Los datos fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes y la significancia en las diferencias se evaluó utilizando la prueba t-Student (con un Intervalo de confianza del 95% y una $P<0.05$) y los valores positivos indicados con asteriscos ($P\leq 0.05$).

Para evaluar la síntesis de genomas de DENV durante el silenciamiento de la septina AalSep2, se extrajo el RNA total de las células C6/36 silenciadas e infectadas con DENV4 y se realizaron ensayos de qRT-PCR. El número de copias virales de DENV no presentó cambios significativos en relación con el número de copias presentada por células C6/36 infectadas y tratadas con un silenciador negativo o control (DsiRNA-NT) (**Figura 30**). Estos resultados sugieren que septina AalSep2 no tiene ninguna relación con el mecanismo de replicación del virus y por ello su silenciamiento no afecta la síntesis del nuevo genoma viral; sin embargo, el silenciamiento de AalSep2 presentó un efecto negativo en el número de partículas virales, indicando que la participación de la septina podría estar relacionado con la síntesis o ensamble de nuevos viriones de DENV4.

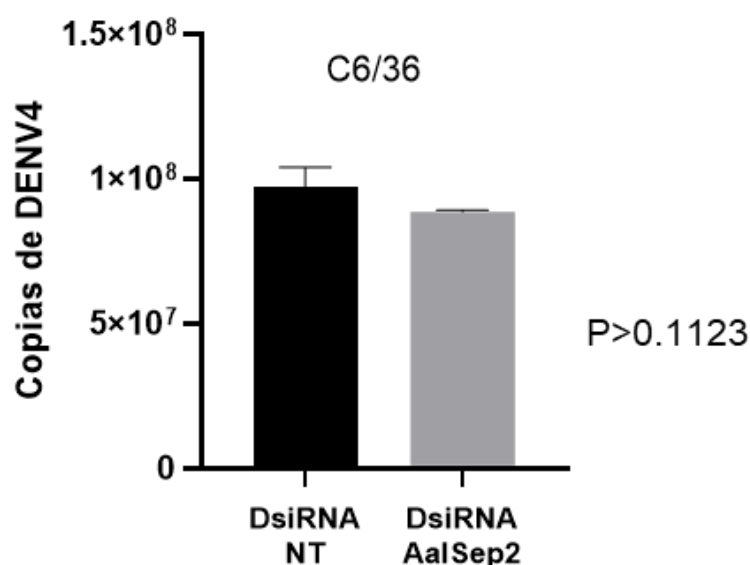


Figura 30. Número de copias virales de DENV4 en células silenciadas en Aalsep2. RNA total de células C6/36 silenciadas en AalSep2 e infectadas con DENV4 (MOI=3), fue utilizado para cuantificar por qRT-PCR el número de copias virales. El número de copias virales no presentó diferencias significativas entre las células silenciadas en AalSep2 y las tratadas con un silenciador negativo (DsiRNA-NT). Los datos fueron obtenidos a partir de tres experimentos independientes y la significancia en la diferencia en el número de copias se evaluó utilizando la prueba t-Student (con un Intervalo de confianza del 95% y una $P < 0.05$).

13. Discusión

Las septinas constituyen una familia de proteínas del citoesqueleto altamente conservadas, las cuales han sido identificadas desde levaduras hasta humanos (Akhmetova et al., 2018; Cao et al., 2007; Pan et al., 2007; Hartwell, 1971) y participan en múltiples procesos celulares, tales como división celular, establecimiento del huso mitótico, segregación cromosomal (Beise and Trimble, 2011; Desterke and Gassama-Diagne, 2019; Estey et al., 2010; Haarer and Pringle, 1987; Hartwell, 1971), polaridad celular, tráfico vesicular y remodelamiento de membranas (Beites et al., 2001; Finger et al., 2003; Kim et al., 2010; Shinoda et al., 2010; Collins et al., 2020). Además, sus funciones como proteínas andamio le permite a las septinas el reclutamiento de otras proteínas para la formación de complejos con actividades funcionales y estructurales, los cuales, además, son ubicados en sitios subcelulares específicos (Mostowy y Cossart, 2012; Kinoshita, 2006).

En mamíferos, la septina 6 está involucrada en procesos fisiológicos celulares, tales como: tráfico vesicular, desarrollo y crecimiento celular (Kesisova et al., 2021; Moon et al., 2013; Li et al., 2019, Li et al., 2009b; Dolat et al., 2014); además, se ha reportado que en células de mamífero (Huh7) infectadas con HCV, la septina 6 interacciona con proteínas virales y se convierte en un importante factor del hospedero para la replicación viral (Kim et al., 2007).

El estudio de las septinas en organismos invertebrados es limitado, con la excepción del modelo de *D. melanogaster*, donde se han identificado cinco septinas (Sep1, Sep2, Sep4, Sep5 y Pnut/Sep7), las cuales son esenciales para la ovogénesis (O'Neill et al., 2013; O'Neill y Clark, 2016) y desarrollo embrionario (Fares et al., 1995; Akhmetova et al., 2018). Por otra parte, gracias a los análisis "ómicos", en el mosquito *An. gambiae*, por análisis bioinformáticos se han predicho cuatro septinas hipotéticas (AgaHyp1-4) (Pan et al., 2007), mientras que en *Ae. albopictus*, se ha descrito que la septina Sep7/Pnut, presenta una expresión diferencial durante el desarrollo del mosquito (Avicor et al., 2016).

En el presente trabajo de investigación, utilizando secuencias de aminoácidos de septinas de *H. sapiens* y *D. melanogaster* como molde, fue posible la identificación de cuatro secuencias de proteínas tipo septina para *Ae. aegypti* y otras cuatro para *Ae. albopictus*. Todas las septinas de mosquito identificadas contienen los dominios centrales de unión a GTP altamente conservados (Sirajuddin et al., 2009), una región polibásica (PB1: del inglés Polybasic región 1) de unión a lípidos, ubicado en el extremo N-terminal (Bertin et al., 2010; Casamayor and Snyder, 2003; Zhang et al., 1999), un elemento único de septina (SUE: del inglés septin unique element), una secuencia característica de esta familia de proteínas (Akhmetova et al., 2018; Versele and Thorner, 2005) y una región o dominio “coiled-coil”, el cual está constituido por grupos repetidos de 7 aminoácidos con un patrón característico, ubicado en el extremo N-terminal de la proteína (Simm et al., 2021; Meseroll et al., 2013; Versele and Thorner, 2004; Casamayor and Snyder, 2003). Además, también se identificó una segunda región rica en aminoácidos básicos (polibásica, PB2), la cual es similar a la observada en septinas de *H. sapiens* y *D. melanogaster* (Omrane et al., 2019). Los dominios y motivos identificados en cada una de las secuencias reportadas para mosquitos del género *Aedes*, indicaron que estas proteínas son septinas verdaderas (Cao et al., 2007; Mostowy and Cossart, 2012; Pan et al., 2007; Weirich et al., 2008; Omrane et al., 2019). Finalmente, los análisis filogenéticos de las septinas identificadas en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, indicaron que estas proteínas están distribuidas en cuatro clados filogenéticos y que presentan una estrecha relación con las septinas de *D. melanogaster*. Los datos antes mencionados, permiten afirmar que las secuencias identificadas y reportadas en este trabajo, son ortólogos de proteínas septina en mosquitos del género *Aedes*.

Mediante ensayos de RT-PCR en este trabajo se mostró que los mensajeros de las septinas de mosquito identificadas *in silico*, son expresados de manera constitutiva y relativamente abundante en células C6/36 y Aag2 derivadas de mosquito. Mientras que, por ensayos de WB en ambas líneas celulares, se identificaron ortólogos de la septina HsSept6, los cuales son correspondientes a

la septina AalSep2 (AALF008077) y AaeSep2 (AAEL004668), respectivamente. Sin embargo, se encontraron discrepancias entre el peso molecular predicho teóricamente para estos ortólogos (48 y 49.1 kDa respectivamente) y el resultado experimental observado por WB que sugiere un peso de 55 kDa para ambas septinas; AalSep2 y AaeSep2. Este resultado sugiere que estas septinas sufren modificaciones post-traduccionales, lo cual está en acuerdo a otros organismos donde se han reportado eventos de modificación post-transduccional en las septinas en ciertas fases del ciclo celular o durante el ensamble o desensamble de estructuras complejas (Anillos de septina o filamentos de septina) (Dobbelaere et al., 2003; Hernández-Rodríguez y Momany, 2012; Oh and Bi, 2011).

En un reporte previo, nuestro grupo de trabajo encontró que bajo condiciones de estrés nutricional las células C6/36 cambian la expresión y/o localización de una molécula similar a una proteína tipo septina, la cual está estrechamente relacionada a la septina HsSept6 (González-Calixto et al., 2015). Se desconoce con exactitud que función podrían tener las septinas durante el estrés celular; sin embargo, se ha reportado que, durante el estrés nutricional u oxidativo, la septina 9 de mamífero (HsSept9) incrementa su presencia en las membranas de los lisosomas y a partir de su dominio de unión a GTP recluta a la proteína motora dineína y ésta a su vez interacciona con la dinactina (proteína de múltiples subunidades), la cual ayuda al tráfico retrogrado de lisosomas a la periferia nuclear de la célula, esto con la finalidad de agruparlos y fusionarlos con autofagosomas para formar autofagolisosomas que ayudan a la degradación de componentes celulares para generar nutrientes a la célula o eliminar radicales libres de oxígeno generados durante el estrés oxidativo (Kesisova et al., 2021). Dado que las infecciones virales también son condiciones de estrés, el resultado del cambio de expresión y/o localización de una molécula tipo septina en células C6/36 durante el estrés, sugiere que las septinas de mosquito podrían tener alguna función también durante procesos de infecciones virales. En concordancia con esta suposición, en el presente trabajo se observó un incremento significativo en la expresión de las septinas AalSep2 o AaeSep2 en células de mosquito

infectadas con DENV; efecto similar a lo reportado para la septina 9 de humano, la cual incrementa su expresión en células Huh7 cuando son infectadas con el HCV (Akil et al., 2016).

Por ensayos de microscopía confocal, PLA e inmunoprecipitación fue posible determinar que la septina AalSep2 además de aumentar sus niveles de expresión durante la infección con DENV, también forma parte de los complejos de replicación viral. Los resultados mostraron clara interacción entre AalSep2 con las proteínas NS3 y NS5, dos componentes del complejo de replicación viral, el cual es esencial para la generación de nuevos genomas virales (Kapoor et al., 1995; Li et al., 2014; de Oliveira et al., 2014; Silva et al., 2019). NS3 es una enzima multifuncional que actúa como proteasa para el procesamiento de la poliproteína viral y como una RNA trifosfatasa que coloca el *cap* en el RNA viral nascente y, además, presenta una actividad de helicasa, la cual es necesaria para el proceso de replicación viral (de Oliveira et al., 2014). Por su parte, la proteína NS5 es la polimerasa viral y es una enzima bifuncional con actividad metiltransferasa en su extremo N-terminal y actividad de polimerasa dependiente de RNA en su extremo C-terminal (de Oliveira et al., 2014). Sin embargo, a pesar de la clara interacción entre AalSep2 con NS3 y NS5, no se observó interacción alguna entre esta septina y la proteína NS1, otro componente importante de los complejos de replicación, ya que actúa como proteína de andamiaje para la organización del complejo replicativo del virus. Ya que las proteínas NS3 y NS5 esta ubicadas del lado citoplasmático de los complejos de replicación y NS1 en el lumen del retículo endoplásmico (ER) (Chen et al., 2018), estos resultados tomados en conjunto indican que la septina AalSep2 está ubicada del lado citoplásmico del complejo de replicación. La ubicación citoplásmica de la AalSep2 también fue respaldada por los datos de la inmunomicroscopía electrónica de transmisión, los cuales mostraron la presencia de la septina AalSep2 dentro de los paquetes vesiculares (VPs) donde se localizan los complejos replicativos (RC) virales. La interacción de AalSep2 con el complejo replicativo de DENV, es una característica similar a lo observado con su ortólogo,

la septina HsSept6, la cual en células Huh7 infectadas con HCV, interacciona con la proteína viral NS5b y ayuda a la replicación del virus (Kim et al., 2007). Además de la localización de la septina AalSep2, los datos antes mencionados sugieren que esta proteína posiblemente funcione como una molécula de anclaje, la cual se une a la membrana del retículo endoplásmico (interaccionando con fosfoinosítidos del RE a través de su región polibásica) y recluta a las proteínas NS3 y NS5 del virus para ayudar a formar y probablemente estabilizar los complejos replicativos de DENV; sin embargo, se necesita realizar un estudio más a fondo para poder corroborar esta posible función.

Con respecto a la interacción de la septina AalSep2 con la proteína E y C del virus, los ensayos PLA mostraron una interacción con la proteína E, pero no con C. Sin embargo, los ensayos de inmunoprecipitación no detectaron a la proteína E, lo cual sugiere la posibilidad de que la interacción entre AalSep2 con la proteína E puede ser demasiado lábil o poco estable y por ello no fue detectada, esto considerando que PLA es una técnica que detecta la interacción entre dos moléculas con alta sensibilidad y especificidad (Alam M. 2018). Por otra parte, existe la posibilidad de que la expresión de proteína E a las 48 hpi (Tiempo en el cual se realizó la inmunoprecipitación) se encuentre en muy baja concentración y por ello su interacción con AalSep2 no fue detectada. En células C6/36 infectadas con DENV, se ha sugerido que la mayor cantidad de genoma viral se encuentra desde las 10 hasta las 48, mientras que el mayor número de viriones se sugiere ocurre después de las 48 horas de infección (Kimura et al., 1985). Considerando que la mayor concentración de proteína E ocurre durante el ensamble de los nuevos viriones en etapas tardías del ciclo replicativo de DENV (Barnard et al., 2021; Klein et al., 2013), se podría sugerir que el tiempo de infección en el cual se llevaron a cabo los ensayos de inmunoprecipitación, no había la suficiente proteína E para la detección de su interacción con la septina AalSep2. Esta hipótesis también podría explicar porque el PLA entre AalSep2 con NS3 y NS5 presenta más señales fluorescentes en comparación con la señal

obtenida con E. por lo tanto, se sugiere que la interacción de Aalsep2 con E , puede estar determinado por la temporalidad de la infección de DENV.

Como ya se ha mencionado, en células infectadas, la septina AalSep2 también interacciona con la proteína E, pero no con la proteína C. Si bien este resultado parece contradecir la ubicación citoplasmática de AalSep2 dentro de los complejos de replicación, ya que E y NS1 se encuentran inicialmente dentro del lumen del RE, se puede sugerir que AalSep2 interacciona con viriones inmaduros de DENV al inicio del proceso de morfogénesis. Considerando que las proteínas E y prM (complejo E-prM) son proteínas transmembrana ancladas a RE (Barnard et al., 2021) y las septinas se puede unir a la membrana del RE mediante fosfoinsitidos (Song et al., 2016; Raiborg et al., 2016), se sugiere que la interacción entre AalSep2 con E posiblemente ocurre a través de una región citoplasmática expuesta por la proteína viral (región que nosotros desconocemos) y esta interacción, posiblemente ayude a estabilizar la formación de unidades de ensamble del nuevo virión (trímeros de heterodímeros de prM-E; los cuales dirigen el proceso de brote del nuevo virion) (Barnard et al., 2021). Por otro lado, dado que las septinas son proteínas andamio, AalSep2 también podría ayudar al reclutamiento de las proteínas del complejo ESCRT a la membrana del RE, una maquinaria que se ha sugerido probablemente ayude a la escisión de membrana para liberar dentro del lumen del RE al virión inmaduro recién ensamblado (Tabata et al., 2016). En la actualidad se desconoce si AalSep2 o AaeSep2 se unen como monómeros, heterotrímeros o heterohexámeros a las proteínas virales E, NS3 y NS5, así como las posibles funciones que pudiera tener AalSep2 durante los procesos de replicación viral (Kraemer et al., 2015; Huijbregts et al., 2009; Omrane et al., 2019).

La participación de la septina 2 de mosquito (AalSep2 y AaeSep2) en el ciclo replicativo de DENV en células de mosquito fue demostrada utilizando DsiRNAs específicos para silenciar la expresión de la proteína, tanto en células C6/36 como en Aag2, lo cual causó una reducción significativa de la progenie viral. Sin embargo, e inesperadamente, observamos que la disminución en la progenie

viral no se debe a una reducción en la replicación del RNA viral, ya que los niveles de RNA genómico no fueron afectados por el silenciamiento de AalSep2. Estos resultados sugieren que la reducción en la progenie viral no se debe a la disminución de la replicación viral, sino a algún paso posterior del ciclo replicativo del virus, como podría ser la morfogénesis de viriones. Como se ha mencionado, AalSep2 posiblemente ayude a la formación de unidades de ensamble viral (prM-E) a partir de su interacción con la proteína E y al mismo tiempo, posiblemente participe en el reclutamiento de otras proteínas del hospedero (Complejo ESCRT) que ayuden a la formación de nuevos viriones. Considerando lo antes mencionado, se sugiere que el silenciamiento de AalSep2 posiblemente afecte el inicio de la morfogénesis de nuevos viriones; sin embargo, en este trabajo no contamos con los datos suficientes para poder determinar esta posible función. Por otro lado, Los resultados obtenidos en este estudio con DENV, son similares a los reportados por Akil et al., (2016) en células Huh7 infectadas con HCV, en donde se observó que el silenciamiento de la septina 9 afecta la morfogénesis viral, pero no la síntesis de genomas virales (Akil et al., 2016). Otra situación similar ha sido descrita para la GTPasa atlastina 3 (ATL3) (proteína residente del retículo endoplásmico) durante la replicación de flavivirus (Rajah et al., 2020; Monel et al., 2019). Se ha reportado que, en líneas celulares de mosquito (C6/36 y Aag2), ATL3 interacciona con las proteínas NS3, NS5, NS1, C y E de DENV y que el silenciamiento de ATL3 resulta en una reducción de títulos virales, sin presentar una reducción en los niveles de RNA viral, sugiriendo que la proteína ATL3 juega un papel en la maduración y transporte de viriones, pero no en la replicación del genoma (Rajah et al., 2020; Neufeldt et al., 2019). En el presente trabajo la asociación de la septina AalSep2 y AaeSep2 con la proteína E podría explicar, al menos parcialmente la observación de que el silenciamiento de la septina AalSep2 y AaeSep2 afecte la morfogénesis de viriones y con ello el título viral. Alternativamente, estos resultados también podrían explicarse si tanto las proteínas NS3 y NS5 participaran en la morfogénesis del virión; lo cual es una idea atractiva, pero para la cual no existe evidencia experimental hasta la fecha. Posiblemente, la septina 2 de mosquito es requerida para el ensamble de nuevas

partículas virales y su silenciamiento provoca un efecto negativo en la producción de la progenie viral. Además, considerando la participación de las septinas en la exocitosis (Tokhtaeva et al., 2015), un proceso utilizado para la secreción de viriones maduros de DENV (Roy y Bhattacharjee., 2021), también se propone la posibilidad de que el silenciamiento de la septina 2 de mosquito afecte dicho proceso y con ello la secreción de viriones maduros de DENV, provocando acumulación de viriones en la célula, pero no una reducción en la síntesis del genoma viral.

En varios estudios se ha señalado la participación de las septinas durante la replicación viral; ya sea como un factor de susceptibilidad del huésped, como se ha observado en HCV (Kim et al., 2007; Akil et al., 2016) o como un factor de resistencia, como se ha observado en células HeLa infectadas con el virus vaccinia, en donde se ha observado que las septinas forman jaulas que evitan la liberación y propagación del virus (Pfanzer et al., 2018). En este trabajo, presentamos evidencia de que AalSep2 y AaeSep2 participan en la replicación de DENV y dada la estructura y funciones de las septinas, una posibilidad es que las septinas funcionen como moléculas de anclaje o andamiaje para proteínas del huésped junto con las proteínas NS3, NS5 y E en las membranas del RE, para estabilizar tanto a los complejos de replicación como a los viriones inmaduros. Alternativamente, la presencia de la septina AalSep2 en los complejos replicativos de DENV, podría estar relacionada con la capacidad de las septinas para reconocer micro-curvaturas de membrana, asociadas a hélices anfipáticas, las cuales se localizan en los dominios “coiled-coil” de las septinas (Cannon et al., 2019) y están incrustadas en la membrana de orgánulos intracelulares (Lobato-Marquez y Mostowy., 2016; Bridges et al., 2016; McMurray., 2019; Woods y Gladfelter., 2021). De acuerdo con los datos obtenidos durante el presente trabajo de investigación, queda claro que la identificación de factores de susceptibilidad del huésped relacionados con el DENV y otros flavivirus en células de mosquito es de importancia para el diseño

de estrategias que ayuden al control de esta importante enfermedad de salud pública.

14. Resumen de resultados

- Se identificaron secuencias de proteínas tipo septina, en mosquitos del género *Aedes* que son homólogas a la septina 1, 2, 4 y 7/Pnut de *D. melanogaster*
- Las septinas identificadas en *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*, fueron denominadas como: AalSep1, AalSep2, AalSep4 y AalSep7/Pnut y como: AaeSep1, AaeSep2, AaeSep4 y AaeSep7/Pnut, respectivamente
- Celulas derivadas de *Ae. albopictus* expresan los genes correspondientes a la septina *aalsep1*, *aalsep2*, *aalsep4* y *aalsep7*, mientras que células derivadas de *Ae. aegypti*, solo expresan la septina *aaesep1*, *aaesep2* y *aaesep7*.
- Las proteínas correspondientes a la septina AalSep2 y AaeSep2, son ortólogos de septina 6 de *H. sapiens* y son expresada en células de mosquito (C6/36 y Aag2), con un peso molecular de 55kDa.
- Las Septinas AalSep2 y AaeSep2, incrementan su expresión en células infectadas con DENV y colocalizan con las proteínas virales C, E, NS3 y NS5, en células de mosquito (C6/36 y Aag2).
- En células C6/36 infectadas con DENV, la septina AalSep2 interacciona con las proteínas virales; E, NS3 y NS5 y está localizada en los complejos replicativos inducidos por el virus.
- El silenciamiento de septina AalSep2 en células C6/36 infectadas con DENV, afecta la progenie viral, pero no la replicación del material genético del virus.

15. Conclusiones

Los mosquitos del género *Aedes* poseen en su genoma genes para las proteínas septinas, los cuales son activos y se expresan de manera constitutiva en líneas celulares derivadas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Dichos genes codifican para proteínas que presentan dominios conservados característicos de proteínas de la familia de las septinas y muestran relación filogenética con septinas de *D. melanogaster* y son ortólogos de septinas de humanos.

La septina AalSep2 se encuentra en los complejos de replicación de DENV e interactúa con las proteínas NS3, NS5 y E. Estas interacciones parecen favorecer la replicación del virus y las convierte en factores de susceptibilidad del mosquito para DENV.

16. Perspectivas

Confirmar la interacción de la septina AaeSep2 de *Ae. aegypti* con las proteínas virales E, NS3 y NS5 de DENV.

Evaluar el posible papel de la septina AalSep2 y AaeSep2, en la liberación de partículas virales a partir de células de mosquito (C6/36 y Aag2) infectadas con DENV.

Identificar el interactoma de la septina AalSep2 y AaeSep2, en células de mosquito (C6/36 y Aag2) no infectadas e infectadas con DENV.

Evaluar la expresión de los mensajeros y proteínas, correspondientes a la septina 1, 4 y 7 de mosquito, en células C6/36 y Aag2 infectadas con DENV.

17. Bibliografías

Abbey, M., Gaestel, M., & Menon, M. B. (2019). Septins: Active GTPases or just GTP-binding proteins?. *Cytoskeleton* (Hoboken, N.J.), 76(1), 55–62. <https://doi.org/10.1002/cm.21451>

Acosta, E. G., Castilla, V., & Damonte, E. B. (2008). Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of general virology*, 89(Pt 2), 474–484. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83357-0>

Acosta, E. G., Castilla, V., & Damonte, E. B. (2011). Infectious dengue-1 virus entry into mosquito C6/36 cells. *Virus research*, 160(1-2), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.06.008>

Adam, J. C., Pringle, J. R., & Peifer, M. (2000). Evidence for functional differentiation among *Drosophila* septins in cytokinesis and cellularization. *Molecular biology of the cell*, 11(9), 3123–3135. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.9.3123>

Akhmetova, K., Balasov, M., Svitin, A., Chesnokova, E., Renfrow, M., & Chesnokov, I. (2018). Phosphorylation of Pnut in the Early Stages of *Drosophila* Embryo Development Affects Association of the Septin Complex with the Membrane and Is Important for Viability. *G3* (Bethesda, Md.), 8(1), 27–38. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300186>

Akil, A., Peng, J., Omrane, M., Gondeau, C., Desterke, C., Marin, M., Tronchère, H., Taveneau, C., Sar, S., Briolotti, P., Benjelloun, S., Benjouad, A., Maurel, P., Thiers, V., Bressanelli, S., Samuel, D., Bréchet, C., & Gassama-Diagne, A. (2016). Septin 9 induces lipid droplets growth by a phosphatidylinositol-5-phosphate and microtubule-dependent mechanism hijacked by HCV. *Nature communications*, 7, 12203. <https://doi.org/10.1038/ncomms12203>

Aktepe, T. E., Liebscher, S., Prier, J. E., Simmons, C. P., & Mackenzie, J. M. (2017). The Host Protein Reticulon 3.1A Is Utilized by Flaviviruses to Facilitate

Membrane Remodelling. *Cell reports*, 21(6), 1639–1654.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.055>

Anasir, M. I., Ramanathan, B., & Poh, C. L. (2020). Structure-Based Design of Antivirals against Envelope Glycoprotein of Dengue Virus. *Viruses*, 12(4), 367.

<https://doi.org/10.3390/v12040367>

Anwar, A., Leong, K. M., Ng, M. L., Chu, J., & Garcia-Blanco, M. A. (2009). The polypyrimidine tract-binding protein is required for efficient dengue virus propagation and associates with the viral replication machinery. *The Journal of biological chemistry*, 284(25), 17021–17029.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.006239>

Auweter, S. D., & Allain, F. H. (2008). Structure-function relationships of the polypyrimidine tract binding protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(4), 516–527. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7378-2>

Avicor, S. W., Wajidi, M. F., Jaal, Z., & Yahaya, Z. S. (2016). Molecular cloning, sequence analysis and developmental stage expression of a putative septin gene fragment from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Acta biochimica Polonica*, 63(2), 243–246. https://doi.org/10.18388/abp.2014_909

Bäck, A. T., & Lundkvist, A. (2013). Dengue viruses-an overview. *Infection ecology & epidemiology*, 3, 10.3402/iee.v3i0.19839.

<https://doi.org/10.3402/iee.v3i0.19839>

Barnard, T. R., Abram, Q. H., Lin, Q. F., Wang, A. B., & Sagan, S. M. (2021). Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly. *Trends in biochemical sciences*, 46(5), 378–390. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.12.007>

Barnard, T. R., Abram, Q. H., Lin, Q. F., Wang, A. B., & Sagan, S. M. (2021). Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly. *Trends in biochemical sciences*, 46(5), 378–390. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.12.007>

Barrows, N. J., Anglero-Rodriguez, Y., Kim, B., Jamison, S. F., Le Sommer, C., McGee, C. E., Pearson, J. L., Dimopoulos, G., Ascano, M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2019). Dual roles for the ER membrane protein complex in flavivirus infection: viral entry and protein biogenesis. *Scientific reports*, 9(1), 9711. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45910-9>

Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K. C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S. C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical reviews*, 118(8), 4448–4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>

Bartenschlager, R., & Miller, S. (2008). Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future microbiology*, 3(2), 155–165. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.2.155>

Beard, P. M., Griffiths, S. J., Gonzalez, O., Haga, I. R., Pechenick Jowers, T., Reynolds, D. K., Wildenhain, J., Tekotte, H., Auer, M., Tyers, M., Ghazal, P., Zimmer, R., & Haas, J. (2014). A loss of function analysis of host factors influencing Vaccinia virus replication by RNA interference. *PloS one*, 9(6), e98431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098431>

Beerntsen, B. T., James, A. A., & Christensen, B. M. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 64(1), 115–137. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.115-137.2000>

Beise, N., & Trimble, W. (2011). Septins at a glance. *Journal of cell science*, 124(Pt 24), 4141–4146. <https://doi.org/10.1242/jcs.087007>

Beites, C. L., Peng, X. R., & Trimble, W. S. (2001). Expression and analysis of properties of septin CDCrel-1 in exocytosis. *Methods in enzymology*, 329, 499–510. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(01\)29111-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(01)29111-3)

Bertin, A., McMurray, M. A., Thai, L., Garcia, G., 3rd, Votin, V., Grob, P., Allyn, T., Thorner, J., & Nogales, E. (2010). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *Journal of molecular biology*, 404(4), 711–731. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.10.002>

Beth K. Schweitzer, Nora M. Chapman, Peter C. Iwen. (2009). Overview of the *Flaviviridae* With an Emphasis on the Japanese Encephalitis Group Viruses, *Laboratory Medicine*, Volume 40(8):493–499, <https://doi.org/10.1309/LM5YWS85NJPCWESW>

Bhatt, P., Sabeena, S. P., Varma, M., & Arunkumar, G. (2021). Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Current microbiology*, 78(1), 17–32. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w>

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., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>

Blair, C. D., & Olson, K. E. (2014). Mosquito immune responses to arbovirus infections. *Current opinion in insect science*, 3, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.005>

Blair, C. D., & Olson, K. E. (2015). The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses*, 7(2), 820–843. <https://doi.org/10.3390/v7020820>

Bridges, A. A., Jentsch, M. S., Oakes, P. W., Occhipinti, P., & Gladfelter, A. S. (2016). Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. *The Journal of cell biology*, 213(1), 23–32. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512029>

Cannon, K. S., Woods, B. L., Crutchley, J. M., & Gladfelter, A. S. (2019). An amphipathic helix enables septins to sense micrometer-scale membrane curvature. *The Journal of cell biology*, 218(4), 1128–1137. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807211>

Cao, L., Ding, X., Yu, W., Yang, X., Shen, S., & Yu, L. (2007). Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *FEBS letters*, 581(28), 5526–5532. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.10.032>

Caraballo, G. I., Rosales, R., Viettri, M., Castillo, J. M., Cruz, R., Ding, S., Greenberg, H. B., & Ludert, J. E. (2022). The Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Interacts with the Putative Epigenetic Regulator DIDO1 to Promote Flavivirus Replication in Mosquito Cells. *Journal of virology*, 96(12), e0070422. <https://doi.org/10.1128/jvi.00704-22>

Carro, S. D., & Cherry, S. (2020). Beyond the Surface: Endocytosis of Mosquito-Borne Flaviviruses. *Viruses*, 13(1), 13. <https://doi.org/10.3390/v13010013>

Casamayor, A., & Snyder, M. (2003). Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Molecular and cellular biology*, 23(8), 2762–2777. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.8.2762-2777.2003>

Chen, H. R., Lai, Y. C., & Yeh, T. M. (2018). Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of biomedical science*, 25(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0462-0>

Cheng, G., Liu, Y., Wang, P., & Xiao, X. (2016). Mosquito Defense Strategies against Viral Infection. *Trends in parasitology*, 32(3), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.009>.

Chong, H. Y., Leow, C. Y., Abdul Majeed, A. B., & Leow, C. H. (2019). Flavivirus infection-A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus research*, 274, 197770. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197770>

Clyde, K., Kyle, J. L., & Harris, E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*, 80(23), 11418–11431. <https://doi.org/10.1128/JVI.01257-06>

Collins, K. B., Kang, H., Matsche, J., Klomp, J. E., Rehman, J., Malik, A. B., & Karginov, A. V. (2020). Septin2 mediates podosome maturation and endothelial cell invasion associated with angiogenesis. *The Journal of cell biology*, 219(2), e201903023. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903023>

Culshaw, A., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. R. (2017). The immunopathology of dengue and Zika virus infections. *Current opinion in immunology*, 48, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.001>

de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., & Schnepf, H. E. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual review of genetics*, 37, 409–433. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143042>

Desterke, C., & Gassama-Diagne, A. (2019). Protein-protein interaction analysis highlights the role of septins in membrane enclosed lumen and mRNA processing. *Advances in biological regulation*, 73, 100635. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100635>

Dobbelaere, J., Gentry, M. S., Hallberg, R. L., & Barral, Y. (2003). Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle. *Developmental cell*, 4(3), 345–357. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00061-3](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00061-3)

Dolat, L., & Spiliotis, E. T. (2016). Septins promote macropinosome maturation and traffic to the lysosome by facilitating membrane fusion. *The Journal of cell biology*, 214(5), 517–527. <https://doi.org/10.1083/jcb.201603030>

Dolat, L., Hu, Q., & Spiliotis, E. T. (2014). Septin functions in organ system physiology and pathology. *Biological chemistry*, 395(2), 123–141. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0233>

Estey, M. P., Di Ciano-Oliveira, C., Froese, C. D., Bejide, M. T., & Trimble, W. S. (2010). Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody

abscission. *The Journal of cell biology*, 191(4), 741–749.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201006031>

Fares, H., Peifer, M., & Pringle, J. R. (1995). Localization and possible functions of *Drosophila* septins. *Molecular biology of the cell*, 6(12), 1843–1859.
<https://doi.org/10.1091/mbc.6.12.1843>

Field, C. M., al-Awar, O., Rosenblatt, J., Wong, M. L., Alberts, B., & Mitchison, T. J. (1996). A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *The Journal of cell biology*, 133(3), 605–616.
<https://doi.org/10.1083/jcb.133.3.605>

Finger, F. P., Kopish, K. R., & White, J. G. (2003). A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. *Developmental biology*, 261(1), 220–234.
[https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00296-3](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00296-3)

García-Montalvo, B. M., Medina, F., & del Angel, R. M. (2004). La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus research*, 102(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.01.024>

Garrido-Cardenas, J. A., Cebrián-Carmona, J., González-Cerón, L., Manzano-Aguigliaro, F., & Mesa-Valle, C. (2019). Analysis of Global Research on Malaria and *Plasmodium vivax*. *International journal of environmental research and public health*, 16(11), 1928. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111928>

Gomila, R. C., Martin, G. W., & Gehrke, L. (2011). NF90 binds the dengue virus RNA 3' terminus and is a positive regulator of dengue virus replication. *PloS one*, 6(2), e16687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016687>

González-Calixto, C., Cázares-Raga, F. E., Cortés-Martínez, L., Del Angel, R. M., Medina-Ramírez, F., Mosso, C., Ocádiz-Ruiz, R., Valenzuela, J. G., Rodríguez, M. H., & Hernández-Hernández, F. (2015). AeaRACK1 expression and localization in response to stress in C6/36 HT mosquito cells. *Journal of proteomics*, 119, 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.11.019>

Gould E.A.C.J. Growth, titulation and purification of alphaviruses and flaviviruses, In Mahy BWJ (ed), Virology: a practical approach. IRL Press, Oxford, United Kingdom.1991:43–78.

Gould EACJ. 1991. Growth, titulation and purification of alphaviruses and flaviviruses, p 43–78. In Mahy BWJ (ed), Virology: a practical approach. IRL Press, Oxford, United Kingdom.

Guruharsha, K. G., Rual, J. F., Zhai, B., Mintseris, J., Vaidya, P., Vaidya, N., Beekman, C., Wong, C., Rhee, D. Y., Cenaj, O., McKillip, E., Shah, S., Stapleton, M., Wan, K. H., Yu, C., Parsa, B., Carlson, J. W., Chen, X., Kapadia, B., VijayRaghavan, K., ... Artavanis-Tsakonas, S. (2011). A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 147(3), 690–703.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.047>

Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16055.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>

Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H. S., Martínez, E., Nathan, M. B., Pelegriño, J. L., Simmons, C., Yoksan, S., & Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology*, 8(12 Suppl), S7–S16.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>

Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H. S., Martínez, E., Nathan, M. B., Pelegriño, J. L., Simmons, C., Yoksan, S., & Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology*, 8(12 Suppl), S7–S16.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>

Guzman, M., Gubler, D., Izquierdo, A. et al. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16055 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>

Haarer, B. K., & Pringle, J. R. (1987). Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Molecular and cellular biology*, 7(10), 3678–3687. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.10.3678-3687.1987>

Hafirassou, M. L., Meertens, L., Umaña-Diaz, C., Labeau, A., Dejarnac, O., Bonnet-Madin, L., Kümmerer, B. M., Delaugerre, C., Roingard, P., Vidalain, P. O., & Amara, A. (2017). A Global Interactome Map of the Dengue Virus NS1 Identifies Virus Restriction and Dependency Host Factors. *Cell reports*, 21(13), 3900–3913. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.094>

Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A Minireview. *Viruses*, 12(8), 829. <https://doi.org/10.3390/v12080829>

Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res*. 1971;69(2):265-76. doi: 10.1016/0014-4827(71)90223-0.

Hasan, S., Jamdar, S. F., Alalowi, M., & Al Ageel Al Beaiji, S. M. (2016). Dengue virus: A global human threat: Review of literature. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.175416>

Henzi, T., Lannes, N., & Filgueira, L. (2021). Septins in Infections: Focus on Viruses. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(3), 278. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030278>

Hernández-Rodríguez, Y., & Momany, M. (2012). Posttranslational modifications and assembly of septin heteropolymers and higher-order structures. *Current opinion in microbiology*, 15(6), 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.09.007>

Hillyer J. F. (2010). Mosquito immunity. *Advances in experimental medicine and biology*, 708, 218–238. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_12

<https://www.mmv.org/newsroom/publications/world-malaria-reports>

Huang, Y. W., Yan, M., Collins, R. F., Diccio, J. E., Grinstein, S., & Trimble, W. S. (2008). Mammalian septins are required for phagosome formation. *Molecular biology of the cell*, 19(4), 1717–1726. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-07-0641>

Huijbregts, R. P., Svitin, A., Stinnett, M. W., Renfrow, M. B., & Chesnokov, I. (2009). Drosophila Orc6 facilitates GTPase activity and filament formation of the septin complex. *Molecular biology of the cell*, 20(1), 270–281. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-07-0754>

Ivanov, A. I., Le, H. T., Naydenov, N. G., & Rieder, F. (2021). Novel Functions of the Septin Cytoskeleton: Shaping Up Tissue Inflammation and Fibrosis. *The American journal of pathology*, 191(1), 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.09.007>

Jansen, S., Smlatic, E., Copmans, D., Debaveye, S., Tangy, F., Vidalain, P. O., Neyts, J., & Dallmeier, K. (2021). Identification of host factors binding to dengue and Zika virus subgenomic RNA by efficient yeast three-hybrid screens of the human ORFeome. *RNA biology*, 18(5), 732–744. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1868754>

Junjhon, J., Pennington, J. G., Edwards, T. J., Perera, R., Lanman, J., & Kuhn, R. J. (2014). Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *Journal of virology*, 88(9), 4687–4697. <https://doi.org/10.1128/JVI.00118-14>

Kading, R. C., Brault, A. C., & Beckham, J. D. (2020). Global Perspectives on Arbovirus Outbreaks: A 2020 Snapshot. *Tropical medicine and infectious disease*, 5(3), 142. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5030142>

Kading, R. C., Brault, A. C., & Beckham, J. D. (2020). Global Perspectives on Arbovirus Outbreaks: A 2020 Snapshot. *Tropical medicine and infectious disease*, 5(3), 142. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5030142>

Kapoor, M., Zhang, L., Mohan, P. M., & Padmanabhan, R. (1995). Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). *Gene*, 162(2), 175–180. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00332-z](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00332-z)

Kapoor, M., Zhang, L., Ramachandra, M., Kusakawa, J., Ebner, K. E., & Padmanabhan, R. (1995). Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *The Journal of biological chemistry*, 270(32), 19100–19106. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.19100>

Kapoor, M., Zhang, L., Ramachandra, M., Kusakawa, J., Ebner, K. E., & Padmanabhan, R. (1995). Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *The Journal of biological chemistry*, 270(32), 19100–19106. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.19100>

Kesisova, I. A., Robinson, B. P., & Spiliotis, E. T. (2021). A septin GTPase scaffold of dynein-dynactin motors triggers retrograde lysosome transport. *The Journal of cell biology*, 220(2), e202005219. <https://doi.org/10.1083/jcb.202005219>

Kim, C. S., Seol, S. K., Song, O. K., Park, J. H., & Jang, S. K. (2007). An RNA-binding protein, hnRNP A1, and a scaffold protein, septin 6, facilitate hepatitis C virus replication. *Journal of virology*, 81(8), 3852–3865. <https://doi.org/10.1128/JVI.01311-06>

Kim, S. K., Shindo, A., Park, T. J., Oh, E. C., Ghosh, S., Gray, R. S., Lewis, R. A., Johnson, C. A., Attie-Bittach, T., Katsanis, N., & Wallingford, J. B. (2010). Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5997), 1337–1340. <https://doi.org/10.1126/science.1191184>

Kimura, T., Tanimura, E., Yamamoto, N., Ito, T., & Ohyama, A. (1985). The quantitative kinetic study of dengue viral antigen by flow cytometry. I. An in vitro

study. *Virus research*, 2(4), 375–389. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(85\)90032-2](https://doi.org/10.1016/0168-1702(85)90032-2)

Kinoshita M. (2006). Diversity of septin scaffolds. *Current opinion in cell biology*, 18(1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.12.005>

Klein, D. E., Choi, J. L., & Harrison, S. C. (2013). Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. *Journal of virology*, 87(4), 2287–2293. <https://doi.org/10.1128/JVI.02957-12>

Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R., Teng, H. J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., Wint, G. R., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, 4, e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>

Krishnan, M. N., Ng, A., Sukumaran, B., Gilfoy, F. D., Uchil, P. D., Sultana, H., Brass, A. L., Adametz, R., Tsui, M., Qian, F., Montgomery, R. R., Lev, S., Mason, P. W., Koski, R. A., Elledge, S. J., Xavier, R. J., Agaisse, H., & Fikrig, E. (2008). RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature*, 455(7210), 242–245. <https://doi.org/10.1038/nature07207>

Krokowski, S., & Mostowy, S. (2016). Investigation of septins using infection by bacterial pathogens. *Methods in cell biology*, 136, 117–134. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.03.018>

Lee, W. S., Webster, J. A., Madzokere, E. T., Stephenson, E. B., & Herrero, L. J. (2019). Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasites & vectors*, 12(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3433-8>

Lescar, J., Soh, S., Lee, L. T., Vasudevan, S. G., Kang, C., & Lim, S. P. (2018). The Dengue Virus Replication Complex: From RNA Replication to Protein-Protein

Interactions to Evasion of Innate Immunity. *Advances in experimental medicine and biology*, 1062, 115–129. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_9

Li, B., Basang, Z., Hu, L., Liu, L., & Jiang, N. (2019). Septin6 regulates cell growth and casein synthesis in dairy cow mammary epithelial cells via mTORC1 pathway. *The Journal of dairy research*, 86(2), 181–187. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000268>

Li, H., Saucedo-Cuevas, L., Yuan, L., Ross, D., Johansen, A., Sands, D., Stanley, V., Guemez-Gamboa, A., Gregor, A., Evans, T., Chen, S., Tan, L., Molina, H., Sheets, N., Shiryaev, S. A., Terskikh, A. V., Gladfelter, A. S., Shresta, S., Xu, Z., & Gleeson, J. G. (2019). Zika Virus Protease Cleavage of Host Protein Septin-2 Mediates Mitotic Defects in Neural Progenitors. *Neuron*, 101(6), 1089–1098.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.010>

Lin, C. H., Shen, Y. R., Wang, H. Y., Chiang, C. W., Wang, C. Y., & Kuo, P. L. (2019). Regulation of septin phosphorylation: SEPT12 phosphorylation in sperm septin assembly. *Cytoskeleton* (Hoboken, N.J.), 76(1), 137–142. <https://doi.org/10.1002/cm.21491>

Lin, D. L., Cherepanova, N. A., Bozzacco, L., MacDonald, M. R., Gilmore, R., & Tai, A. W. (2017). Dengue Virus Hijacks a Noncanonical Oxidoreductase Function of a Cellular Oligosaccharyltransferase Complex. *mBio*, 8(4), e00939-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00939-17>

Lin, D. L., Inoue, T., Chen, Y. J., Chang, A., Tsai, B., & Tai, A. W. (2019). The ER Membrane Protein Complex Promotes Biogenesis of Dengue and Zika Virus Non-structural Multi-pass Transmembrane Proteins to Support Infection. *Cell reports*, 27(6), 1666–1674.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.051>

Lobato-Márquez, D., & Mostowy, S. (2016). Septins recognize micron-scale membrane curvature. *The Journal of cell biology*, 213(1), 5–6. <https://doi.org/10.1083/jcb.201603063>

- Luo, Y., Na, Z., & Slavoff, S. A. (2018). P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry*, 57(17), 2424–2431. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01162>
- Maimaitiyiming, M., Kobayashi, Y., Kumanogoh, H., Nakamura, S., Morita, M., & Maekawa, S. (2013). Identification of dynamin as a septin-binding protein. *Neuroscience letters*, 534, 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.12.002>
- Mairiang, D., Zhang, H., Sodja, A., Murali, T., Suriyaphol, P., Malasit, P., Limjindaporn, T., & Finley, R. L., Jr (2013). Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito. *PloS one*, 8(1), e53535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053535>
- Mavrakis M. (2016). Visualizing septins in early *Drosophila* embryos. *Methods in cell biology*, 136, 183–198. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.03.026>
- Mavrakis, M., Azou-Gros, Y., Tsai, F. C., Alvarado, J., Bertin, A., Iv, F., Kress, A., Brasselet, S., Koenderink, G. H., & Lecuit, T. (2014). Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles. *Nature cell biology*, 16(4), 322–334. <https://doi.org/10.1038/ncb2921>
- Mavrakis, M., Tsai, F. C., & Koenderink, G. H. (2016). Purification of recombinant human and *Drosophila* septin hexamers for TIRF assays of actin-septin filament assembly. *Methods in cell biology*, 136, 199–220. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.03.020>
- Mazon Moya, M. J., Colucci-Guyon, E., & Mostowy, S. (2014). Use of *Shigella flexneri* to study autophagy-cytoskeleton interactions. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (91), e51601. <https://doi.org/10.3791/51601>
- McBride C. S. (2016). Genes and Odors Underlying the Recent Evolution of Mosquito Preference for Humans. *Current biology : CB*, 26(1), R41–R46. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.032>

McMurray M. A. (2019). The long and short of membrane curvature sensing by septins. *The Journal of cell biology*, 218(4), 1083–1085. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903045>

Mercado-Curiel, R. F., Black, W. C., 4th, & Muñoz, M. (2008). A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC microbiology*, 8, 118. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-118>

Mercado-Curiel, R. F., Esquinca-Avilés, H. A., Tovar, R., Díaz-Badillo, A., Camacho-Nuez, M., & Muñoz, M. (2006). The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC microbiology*, 6, 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-85>

Meseroll, R. A., Occhipinti, P., & Gladfelter, A. S. (2013). Septin phosphorylation and coiled-coil domains function in cell and septin ring morphology in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Eukaryotic cell*, 12(2), 182–193. <https://doi.org/10.1128/EC.00251-12>

Mitchell, L., Lau, A., Lambert, J. P., Zhou, H., Fong, Y., Couture, J. F., Figeys, D., & Baetz, K. (2011). Regulation of septin dynamics by the *Saccharomyces cerevisiae* lysine acetyltransferase NuA4. *PloS one*, 6(10), e25336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025336>

Monel, B., Rajah, M. M., Hafirassou, M. L., Sid Ahmed, S., Burlaud-Gaillard, J., Zhu, P. P., Nevers, Q., Buchrieser, J., Porrot, F., Meunier, C., Amraoui, S., Chazal, M., Salles, A., Jouvenet, N., Roingeard, P., Blackstone, C., Amara, A., & Schwartz, O. (2019). Atlastin Endoplasmic Reticulum-Shaping Proteins Facilitate Zika Virus Replication. *Journal of virology*, 93(23), e01047-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01047-19>

Moon, I. S., Lee, H., & Walikonis, R. S. (2013). Septin 6 localizes to microtubules in neuronal dendrites. *Cytotechnology*, 65(2), 179–186. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9477-7>

- Mosso, C., Galván-Mendoza, I. J., Ludert, J. E., & del Angel, R. M. (2008). Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology*, 378(1), 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.05.012>
- Mostowy, S., & Cossart, P. (2009). Cytoskeleton rearrangements during *Listeria* infection: clathrin and septins as new players in the game. *Cell motility and the cytoskeleton*, 66(10), 816–823. <https://doi.org/10.1002/cm.20353>
- Mostowy, S., & Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(3), 183–194. <https://doi.org/10.1038/nrm3284>
- Mostowy, S., & Shenoy, A. R. (2015). The cytoskeleton in cell-autonomous immunity: structural determinants of host defence. *Nature reviews. Immunology*, 15(9), 559–573. <https://doi.org/10.1038/nri3877>
- Mostowy, S., Bonazzi, M., Hamon, M. A., Tham, T. N., Mallet, A., Lelek, M., Gouin, E., Demangel, C., Brosch, R., Zimmer, C., Sartori, A., Kinoshita, M., Lecuit, M., & Cossart, P. (2010). Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell host & microbe*, 8(5), 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.009>
- Mostowy, S., Danckaert, A., Tham, T. N., Machu, C., Guadagnini, S., Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. (2009). Septin 11 restricts InIB-mediated invasion by *Listeria*. *The Journal of biological chemistry*, 284(17), 11613–11621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900231200>
- Mostowy, S., Janel, S., Forestier, C., Roudit, C., Kasas, S., Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P., & Lafont, F. (2011). A role for septins in the interaction between the *Listeria monocytogenes* INVASION PROTEIN InIB and the Met receptor. *Biophysical journal*, 100(8), 1949–1959. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.040>
- Mostowy, S., Nam Tham, T., Danckaert, A., Guadagnini, S., Boisson-Dupuis, S., Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. (2009). Septins regulate bacterial entry into host cells. *PloS one*, 4(1), e4196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004196>

Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M. A., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., & Cossart, P. (2011). p62 and NDP52 proteins target intracytosolic Shigella and Listeria to different autophagy pathways. *The Journal of biological chemistry*, 286(30), 26987–26995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223610>

Muller, D. A., Depelsenaire, A. C., & Young, P. R. (2017). Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *The Journal of infectious diseases*, 215(suppl_2), S89–S95. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw649>

Naik, N. G., & Wu, H. N. (2015). Mutation of Putative N-Glycosylation Sites on Dengue Virus NS4B Decreases RNA Replication. *Journal of virology*, 89(13), 6746–6760. <https://doi.org/10.1128/JVI.00423-15>

Neubauer, K., & Zieger, B. (2017). The Mammalian Septin Interactome. *Frontiers in cell and developmental biology*, 5, 3. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00003>

Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature reviews. Microbiology*, 16(3), 125–142. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>

Neufeldt, C. J., Cortese, M., Scaturro, P., Cerikan, B., Wideman, J. G., Tabata, K., Moraes, T., Oleksiuk, O., Pichlmair, A., & Bartenschlager, R. (2019). ER-shaping atlastin proteins act as central hubs to promote flavivirus replication and virion assembly. *Nature microbiology*, 4(12), 2416–2429. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0586-3>

Nicholls, C., Sevvana, M., & Kuhn, R. J. (2020). Structure-guided paradigm shifts in flavivirus assembly and maturation mechanisms. *Advances in virus research*, 108, 33–83. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.08.003>

Nölke, T., Schwan, C., Lehmann, F., Østevold, K., Pertz, O., & Aktories, K. (2016). Septins guide microtubule protrusions induced by actin-depolymerizing toxins like Clostridium difficile transferase (CDT). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(28), 7870–7875. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522717113>

- Oh, Y., & Bi, E. (2011). Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends in cell biology*, 21(3), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.11.006>
- Ohba, M., Mizuki, E., & Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer research*, 29(1), 427–433.
- Oliveira A.S., Silva M.L., Oliveira A.F.C.S., Silva C.C., Teixeira R.r.,Paula S.O. NS3 and NS5 proteins: important targets for anti-dengue drug design. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2014:25(10):1759-1769. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140057>
- Olson, K. E., & Blair, C. D. (2015). Arbovirus-mosquito interactions: RNAi pathway. *Current opinion in virology*, 15, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.001>
- Omrane, M., Camara, A. S., Taveneau, C., Benzoubir, N., Tubiana, T., Yu, J., Guérois, R., Samuel, D., Goud, B., Poüs, C., Bressanelli, S., Garratt, R. C., Thiam, A. R., & Gassama-Diagne, A. (2020). Septin 9 has Two Polybasic Domains Critical to Septin Filament Assembly and Golgi Integrity. *iScience*, 23(5), 101042. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101042>
- O'Neill, R. S., & Clark, D. V. (2013). The *Drosophila melanogaster* septin gene *Sep2* has a redundant function with the retrogene *Sep5* in imaginal cell proliferation but is essential for oogenesis. *Genome*, 56(12), 753–758. <https://doi.org/10.1139/gen-2013-0210>
- O'Neill, R. S., & Clark, D. V. (2013). The *Drosophila melanogaster* septin gene *Sep2* has a redundant function with the retrogene *Sep5* in imaginal cell proliferation but is essential for oogenesis. *Genome*, 56(12), 753–758. <https://doi.org/10.1139/gen-2013-0210>
- O'Neill, R. S., & Clark, D. V. (2016). Partial Functional Diversification of *Drosophila melanogaster* Septin Genes *Sep2* and *Sep5*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 6(7), 1947–1957. <https://doi.org/10.1534/g3.116.028886>

- O'Neill, R. S., & Clark, D. V. (2016). Partial Functional Diversification of *Drosophila melanogaster* Septin Genes Sep2 and Sep5. *G3* (Bethesda, Md.), 6(7), 1947–1957. <https://doi.org/10.1534/g3.116.028886>
- Padrick, S. B., Doolittle, L. K., Brautigam, C. A., King, D. S., & Rosen, M. K. (2011). Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), E472–E479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100236108>
- Pan, F., Malmberg, R. L., & Momany, M. (2007). Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC evolutionary biology*, 7, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-103>
- Paranjape, S. M., & Harris, E. (2007). Y box-binding protein-1 binds to the dengue virus 3'-untranslated region and mediates antiviral effects. *The Journal of biological chemistry*, 282(42), 30497–30508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705755200>
- Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*, 11(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>
- Pfanzelter, J., Mostowy, S., & Way, M. (2018). Septins suppress the release of vaccinia virus from infected cells. *The Journal of cell biology*, 217(8), 2911–2929. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708091>
- Pham, T., DiCiccio, J. E., & Trimble, W. S. (2014). Cytoskeleton: septins do the horizontal tango. *Current biology : CB*, 24(8), R324–R327. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.047>
- Phan, Q. T., Eng, D. K., Mostowy, S., Park, H., Cossart, P., & Filler, S. G. (2013). Role of endothelial cell septin 7 in the endocytosis of *Candida albicans*. *mBio*, 4(6), e00542-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00542-13>

Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature microbiology*, 5(6), 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>

Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 11–17. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>.

Raiborg, C., Wenzel, E. M., Pedersen, N. M., & Stenmark, H. (2016). Phosphoinositides in membrane contact sites. *Biochemical Society transactions*, 44(2), 425–430. <https://doi.org/10.1042/BST20150190>

Rajah, M. M., Monel, B., & Schwartz, O. (2020). The entanglement between flaviviruses and ER-shaping proteins. *PLoS pathogens*, 16(4), e1008389. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008389>

Randall, G., Panis, M., Cooper, J. D., Tellinghuisen, T. L., Sukhodolets, K. E., Pfeffer, S., Landthaler, M., Landgraf, P., Kan, S., Lindenbach, B. D., Chien, M., Weir, D. B., Russo, J. J., Ju, J., Brownstein, M. J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., Tuschl, T., & Rice, C. M. (2007). Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), 12884–12889. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704894104>

Ribet, D., Boscaini, S., Cauvin, C., Siguier, M., Mostowy, S., Echard, A., & Cossart, P. (2017). SUMOylation of human septins is critical for septin filament bundling and cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 216(12), 4041–4052. <https://doi.org/10.1083/jcb.201703096>

Robertin, S., & Mostowy, S. (2020). The history of septin biology and bacterial infection. *Cellular microbiology*, 22(4), e13173. <https://doi.org/10.1111/cmi.13173>

Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 67(16), 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>

Rogers, D. M., Kent, M. S., & Rempe, S. B. (2015). Molecular basis of endosomal-membrane association for the dengue virus envelope protein. *Biochimica et biophysica acta*, 1848(4), 1041–1052.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.12.018>

Rothan, H. A., & Kumar, M. (2019). Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Proteins in Flavivirus Replication and Assembly Complexes. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(3), 148. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030148>

Roy, S. K., & Bhattacharjee, S. (2021). Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Canadian journal of microbiology*, 67(10), 687–702.

<https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572>

Salas-Benito, J., Reyes-Del Valle, J., Salas-Benito, M., Ceballos-Olvera, I., Mosso, C., & del Angel, R. M. (2007). Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(2), 283–290.

Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E., & Beaty, B. J. (2007). Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC microbiology*, 7, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-9>

Salles, T. S., da Encarnação Sá-Guimarães, T., de Alvarenga, E., Guimarães-Ribeiro, V., de Meneses, M., de Castro-Salles, P. F., Dos Santos, C. R., do Amaral Melo, A. C., Soares, M. R., Ferreira, D. F., & Moreira, M. F. (2018). History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasites & vectors*, 11(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2830-8>

Samsa, M. M., Mondotte, J. A., Iglesias, N. G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A. T., Bozza, P. T., & Gamarnik, A. V. (2009). Dengue virus

capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS pathogens*, 5(10), e1000632. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000632>

Savidis, G., McDougall, W. M., Meraner, P., Perreira, J. M., Portmann, J. M., Trincucci, G., John, S. P., Aker, A. M., Renzette, N., Robbins, D. R., Guo, Z., Green, S., Kowalik, T. F., & Brass, A. L. (2016). Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell reports*, 16(1), 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.028>

Scholz, R., Imami, K., Scott, N. E., Trimble, W. S., Foster, L. J., & Finlay, B. B. (2015). Novel Host Proteins and Signaling Pathways in Enteropathogenic *E. coli* Pathogenesis Identified by Global Phosphoproteome Analysis. *Molecular & cellular proteomics* : MCP, 14(7), 1927–1945. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046847>

Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., & Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature reviews. Immunology*, 15(12), 745–759. <https://doi.org/10.1038/nri3916>

Sessions, O. M., Barrows, N. J., Souza-Neto, J. A., Robinson, T. J., Hershey, C. L., Rodgers, M. A., Ramirez, J. L., Dimopoulos, G., Yang, P. L., Pearson, J. L., & Garcia-Blanco, M. A. (2009). Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature*, 458(7241), 1047–1050. <https://doi.org/10.1038/nature07967>

Shih, H. P., Hales, K. G., Pringle, J. R., & Peifer, M. (2002). Identification of septin-interacting proteins and characterization of the Smt3/SUMO-conjugation system in *Drosophila*. *Journal of cell science*, 115(Pt 6), 1259–1271. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.6.1259>

Shinoda, T., Ito, H., Sudo, K., Iwamoto, I., Morishita, R., & Nagata, K. (2010). Septin 14 is involved in cortical neuronal migration via interaction with Septin 4. *Molecular biology of the cell*, 21(8), 1324–1334. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-10-0869>

Shurtleff, M. J., Itzhak, D. N., Hussmann, J. A., Schirle Oakdale, N. T., Costa, E. A., Jonikas, M., Weibezahn, J., Popova, K. D., Jan, C. H., Sinitcyn, P., Vembar, S. S., Hernandez, H., Cox, J., Burlingame, A. L., Brodsky, J. L., Frost, A., Borner, G. H., & Weissman, J. S. (2018). The ER membrane protein complex interacts cotranslationally to enable biogenesis of multipass membrane proteins. *eLife*, 7, e37018. <https://doi.org/10.7554/eLife.37018>

Silva, E. M., Conde, J. N., Allonso, D., Ventura, G. T., Coelho, D. R., Carneiro, P. H., Silva, M. L., Paes, M. V., Rabelo, K., Weissmuller, G., Bisch, P. M., & Mohana-Borges, R. (2019). Dengue virus nonstructural 3 protein interacts directly with human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and reduces its glycolytic activity. *Scientific reports*, 9(1), 2651. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39157-7>

Silva, E. M., Conde, J. N., Allonso, D., Ventura, G. T., Coelho, D. R., Carneiro, P. H., Silva, M. L., Paes, M. V., Rabelo, K., Weissmuller, G., Bisch, P. M., & Mohana-Borges, R. (2019). Dengue virus nonstructural 3 protein interacts directly with human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and reduces its glycolytic activity. *Scientific reports*, 9(1), 2651. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39157-7>

Silverman-Gavrila, R. V., & Silverman-Gavrila, L. B. (2008). Septins: new microtubule interacting partners. *TheScientificWorldJournal*, 8, 611–620. <https://doi.org/10.1100/tsw.2008.87>

Sim, S., Jupatanakul, N., & Dimopoulos, G. (2014). Mosquito immunity against arboviruses. *Viruses*, 6(11), 4479–4504. <https://doi.org/10.3390/v6114479>

Simm, D., Hatje, K., Waack, S., & Kollmar, M. (2021). Critical assessment of coiled-coil predictions based on protein structure data. *Scientific reports*, 11(1), 12439. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91886-w>

Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Zent, E., & Wittinghofer, A. (2009). GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(39), 16592–16597. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902858106>

Sirianni, A., Krokowski, S., Lobato-Márquez, D., Buranyi, S., Pfanzerter, J., Galea, D., Willis, A., Culley, S., Henriques, R., Larrouy-Maumus, G., Hollinshead, M., Sancho-Shimizu, V., Way, M., & Mostowy, S. (2016). Mitochondria mediate septin cage assembly to promote autophagy of Shigella. *EMBO reports*, 17(7), 1029–1043. <https://doi.org/10.15252/embr.201541832>

Smit, J. M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., & Wilschut, J. (2011). Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*, 3(2), 160–171. <https://doi.org/10.3390/v3020160>

Smith, K. M., Nanda, K., Spears, C. J., Ribeiro, M., Vancini, R., Piper, A., Thomas, G. S., Thomas, M. E., Brown, D. T., & Hernandez, R. (2011). Structural mutants of dengue virus 2 transmembrane domains exhibit host-range phenotype. *Virology journal*, 8, 289. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-289>

Soberón, M., López-Díaz, J. A., & Bravo, A. (2013). Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*, 41, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.023>

Song, K., Russo, G., & Krauss, M. (2016). Septins As Modulators of Endo-Lysosomal Membrane Traffic. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 124. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00124>

Song, P. X., Peng, J., Omrane, M., Cai, T. T., Samuel, D., & Gassama-Diagne, A. (2022). Septin 9 and phosphoinositides regulate lysosome localization and their association with lipid droplets. *iScience*, 25(5), 104288. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104288>

Spellman, R., & Smith, C. W. (2006). Novel modes of splicing repression by PTB. *Trends in biochemical sciences*, 31(2), 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.12.003>

Spiliotis, E. T., & Kesisova, I. A. (2021). Spatial regulation of microtubule-dependent transport by septin GTPases. *Trends in cell biology*, 31(12), 979–993.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.06.004>

Spriggs, K. A., Bushell, M., Mitchell, S. A., & Willis, A. E. (2005). Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-transacting factors. *Cell death and differentiation*, 12(6), 585–591.

<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401642>

Tabata, K., Arimoto, M., Arakawa, M., Nara, A., Saito, K., Omori, H., Arai, A., Ishikawa, T., Konishi, E., Suzuki, R., Matsuura, Y., & Morita, E. (2016). Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell reports*, 16(9), 2339–2347.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.068>

Teo, C. S., & Chu, J. J. (2014). Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. *Journal of virology*, 88(4), 1897–1913. <https://doi.org/10.1128/JVI.01249-13>

Thomas, S. J., & Yoon, I. K. (2019). A review of Dengvaxia®: development to deployment. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 15(10), 2295–2314.

<https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1658503>

Tokhtaeva, E., Capri, J., Marcus, E. A., Whitelegge, J. P., Khuzakhmetova, V., Bukharaeva, E., Deiss-Yehiely, N., Dada, L. A., Sachs, G., Fernandez-Salas, E., & Vagin, O. (2015). Septin dynamics are essential for exocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 290(9), 5280–5297.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.616201>

Tooley, A. J., Gilden, J., Jacobelli, J., Beemiller, P., Trimble, W. S., Kinoshita, M., & Krummel, M. F. (2009). Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. *Nature cell biology*, 11(1), 17–26. <https://doi.org/10.1038/ncb1808>

- Torraca, V., & Mostowy, S. (2016). Septins and Bacterial Infection. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 127. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00127>
- Tsakas, S., & Marmaras, V.J. (2010). Insect immunity and its signalling: an overview. *ISJ-Invertebrate Survival Journal*, 7, 228-238.
- Valadares, N. F., d' Muniz Pereira, H., Ulian Araujo, A. P., & Garratt, R. C. (2017). Septin structure and filament assembly. *Biophysical reviews*, 9(5), 481–500. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0320-4>
- van den Elsen, K., Quek, J. P., & Luo, D. (2021). Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses*, 13(6), 956. <https://doi.org/10.3390/v13060956>
- van Frankenhuyzen K. (2013). Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of invertebrate pathology*, 114(1), 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.05.010>
- Vega, I. E., & Hsu, S. C. (2003). The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. *Neuroreport*, 14(1), 31–37. <https://doi.org/10.1097/00001756-200301200-00006>
- Veiga, E., & Cossart, P. (2006). The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends in cell biology*, 16(10), 499–504. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.08.005>
- Versele, M., & Thorner, J. (2004). Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *The Journal of cell biology*, 164(5), 701–715. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312070>
- Versele, M., & Thorner, J. (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends in cell biology*, 15(8), 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.06.007>

Viktorovskaya, O. V., Greco, T. M., Cristea, I. M., & Thompson, S. R. (2016). Identification of RNA Binding Proteins Associated with Dengue Virus RNA in Infected Cells Reveals Temporally Distinct Host Factor Requirements. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(8), e0004921. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004921>

Volceanov, L., Herbst, K., Biniossek, M., Schilling, O., Haller, D., Nölke, T., Subbarayal, P., Rudel, T., Zieger, B., & Häcker, G. (2014). Septins arrange F-actin-containing fibers on the *Chlamydia trachomatis* inclusion and are required for normal release of the inclusion by extrusion. *mBio*, 5(5), e01802–e1814. <https://doi.org/10.1128/mBio.01802-14>

Walker, T., Jeffries, C.L., Mansfield, K.L. et al. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasites Vectors* 7, 382 (2014). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-382>

Wang, H. Y., Lin, C. H., Shen, Y. R., Chen, T. Y., Wang, C. Y., & Kuo, P. L. (2021). Protein Kinase A-Mediated Septin7 Phosphorylation Disrupts Septin Filaments and Ciliogenesis. *Cells*, 10(2), 361. <https://doi.org/10.3390/cells10020361>

Wang, W. H., Urbina, A. N., Chang, M. R., Assavalapsakul, W., Lu, P. L., Chen, Y. H., & Wang, S. F. (2020). Dengue hemorrhagic fever - A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 53(6), 963–978. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.007>

Wang, Y., & Zhang, P. (2017). Recent advances in the identification of the host factors involved in dengue virus replication. *Virologica Sinica*, 32(1), 23–31. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3902-6>

Wang, Y., Chen, X., Xie, J., Zhou, S., Huang, Y., Li, Y. P., Li, X., Liu, C., He, J., & Zhang, P. (2019). RNA Helicase A Is an Important Host Factor Involved in Dengue

Virus Replication. *Journal of virology*, 93(4), e01306-18.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01306-18>

Ward, A. M., Bidet, K., Yinglin, A., Ler, S. G., Hogue, K., Blackstock, W., Gunaratne, J., & Garcia-Blanco, M. A. (2011). Quantitative mass spectrometry of DENV-2 RNA-interacting proteins reveals that the DEAD-box RNA helicase DDX6 binds the DB1 and DB2 3' UTR structures. *RNA biology*, 8(6), 1173–1186.
<https://doi.org/10.4161/rna.8.6.17836>

Ward, A. M., Calvert, M. E., Read, L. R., Kang, S., Levitt, B. E., Dimopoulos, G., Bradrick, S. S., Gunaratne, J., & Garcia-Blanco, M. A. (2016). The Golgi associated ERI3 is a Flavivirus host factor. *Scientific reports*, 6, 34379.
<https://doi.org/10.1038/srep34379>

Warena, A. J., Kauffman, S., Sherrill, T. P., Becker, J. M., & Konopka, J. B. (2003). *Candida albicans* septin mutants are defective for invasive growth and virulence. *Infection and immunity*, 71(7), 4045–4051.
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.4045-4051.2003>

Weirich, C. S., Erzberger, J. P., & Barral, Y. (2008). The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(6), 478–489.
<https://doi.org/10.1038/nrm2407>

Yi, Z., Yuan, Z., Rice, C. M., & MacDonald, M. R. (2012). Flavivirus replication complex assembly revealed by DNAJC14 functional mapping. *Journal of virology*, 86(21), 11815–11832. <https://doi.org/10.1128/JVI.01022-12>

Yocupicio-Monroy, M., Padmanabhan, R., Medina, F., & del Angel, R. M. (2007). Mosquito La protein binds to the 3' untranslated region of the positive and negative polarity dengue virus RNAs and relocates to the cytoplasm of infected cells. *Virology*, 357(1), 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.042>

Yu, X., Liu, T., Sun, Z., Guan, P., Zhu, J., Wang, S., Li, S., Deng, Q., Wang, L., Zheng, A., & Li, P. (2012). Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29

and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Current microbiology*, 64(4), 326–331. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0070-7>

Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P. S., Grinstein, S., & Trimble, W. S. (1999). Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Current biology : CB*, 9(24), 1458–1467. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)80115-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)80115-3)

Zhang, R., Miner, J. J., Gorman, M. J., Rausch, K., Ramage, H., White, J. P., Zuiani, A., Zhang, P., Fernandez, E., Zhang, Q., Dowd, K. A., Pierson, T. C., Cherry, S., & Diamond, M. S. (2016). A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses. *Nature*, 535(7610), 164–168. <https://doi.org/10.1038/nature18625>