



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Identificación de receptores putativos para DENV-2 en
intestino medio de *Aedes aegypti* utilizando dos diferentes
sistemas de expresión”**

TESIS

Que presenta

M EN C. KARLA ZAVALA MALDONADO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directora de la Tesis:

María de Lourdes Muñoz Moreno

Ciudad de México

Enero, 2023

Tabla de contenidos

Agradecimientos	0
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Epidemiología	3
⇒ Sureste Asiático	4
⇒ Sur y centro de las Islas del Pacífico, Japón y Australia	5
⇒ África	5
⇒ América	6
⇒ México.....	8
1.2 La enfermedad Dengue	9
⇒ Fase febril.....	9
⇒ Fase crítica	10
1.3 Virus Dengue	10
⇒ Proteínas virales	11
⇒ Ciclo viral.....	15
1.4 Vectores	17
⇒ Infección en el intestino medio	19
⇒ Barreras de infección	21
⇒ Receptores	22
Justificación	24
Hipótesis	24
Objetivo general	25
Objetivos particulares	25
2. Materiales y métodos	26
2.1 Virus, bacterias y células	26
2.2 Extracción de RNA viral, RT-qPCR y purificación de cDNA	26
2.3 Plásmidos y ligación	28
2.4 Transformación y PCR de colonia	29
2.5 Extracción de plásmidos y secuenciación	30
2.6 Restricciones de Restricción	32
2.7 Transfección	33
2.8 Mutagénesis sitio dirigida	34
2.9 Fluorescencias y obtención de proteínas de C6/36 y E.coli BL21	36

2.10 Western Blot.....	37
3. Resultados.....	38
3.1 Amplificación de cDNA y ligación en pJET1.2Blunt.....	38
3.2 Transformaciones, secuenciaciones y restricciones con NotI y EcoRV.....	39
3.3 Transfección de C6/36 con Ac5-STABLE2-Neo-E y mutagénesis.	44
3.4 Caracterización de pET15B-E.....	50
3.5 Caracterización de Ac5-STABLE2-Neo-ProteinE.....	53
3.6 Caracterización de pET15B-DIII	55
3.7 Caracterización de Ac5-DIII.....	56
3.8 Confirmación de la enolasa como receptor del virus dengue.	58
4. Discusión	60
5. Conclusión	64
6. Perspectivas	64
7. Referencias.....	65

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo de 2017- 2021 para la realización de este proyecto con número de registro de becario: 593233. Número de apoyo: 487633.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno, en el laboratorio No 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

El trabajo estuvo bajo la asesoría de: el Dr. Javier Hernández Sánchez, Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe, Dr. Normand García Hernández, del Departamento de Genética, el Dr. José Eduardo Pérez Salazar del Departamento de Biología Celular todos ellos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, y el Dr. Normand García Hernández, del Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica, UMAE Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional S-XXI, IMSS..

Agradecimientos

Gracias a la Doctora María de Lourdes Muñoz Moreno por aceptarme en su grupo de investigación en el Laboratorio1 del Departamento de Genética y Biología Molecular y por siempre brindarme sus enseñanzas, apoyo y consejos.

Gracias a todo el equipo del Laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular, incluyendo a todos los auxiliares que estuvieron presentes durante mi estancia en el laboratorio, siempre ayudando cuando lo necesitaba y a todos mis compañeros por todo su apoyo siempre que lo necesité y especialmente al Dr. César Brito por enseñarme siempre todo lo que necesité para el desarrollo del proyecto. Muchas gracias al técnico Hebert Cadena por toda la ayuda que siempre nos brinda a todos para que nuestro trabajo salga siempre todo lo mejor que se pueda.

Gracias a mis asesores los Doctores Luis Kameyama, Javier Hernández, Normand García y José Eduardo Pérez por todo su tiempo, consejos y ayuda. También al Dr. Álvaro Díaz Badillo que también fungió como asesor en la mayor parte de este proyecto.

Gracias a mi familia, a mis papás y mis hermanos, por siempre ser un apoyo constante en todo lo que he querido hacer y siempre creer en mí. Agradezco a mis tíos que siempre han estado al pendiente de mí. A mis sobrinos que han sido también un apoyo constante.

Gracias a mi novio Paco, que siempre me ha apoyado y que siempre me ayudo con todas mis evaluaciones e incluso en la realización de esta tesis.

Resumen

El dengue es una de las enfermedades virales transmitidas por artrópodos más importantes en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que de 50–100 millones de infecciones ocurren anualmente, aunque estimaciones recientes indican que el número total de infecciones ocurridas cada año es cercano a los 390 millones. Recientemente la OMS clasificó al dengue como dengue y dengue grave. Varios estudios se han hecho para encontrar al o a los receptores del DENV. Sin embargo, aún no se ha logrado establecer un receptor específico. Algunos de los ensayos que se han hecho con este fin, han utilizado a la proteína E y/o al DIII recombinantes expresados en bacterias. Estas mismas proteínas recombinantes también se han usado en otros estudios para el desarrollo de candidatos de vacunas. Se ha observado que mutaciones en los sitios de glicosilación de la proteína E, tienen efectos en la capacidad del virus de infectar otras células. Por esta razón podría ser factible que se encontraran resultados diferentes en el reconocimiento a sus receptores específicos comparado con los ya obtenidos con las proteínas expresadas en bacteria ya que estas no producen modificaciones post traduccionales a diferencia de las células de mosquito. Debido a esto decidimos expresar la proteína E y el DIII en células C6/36 y comparar posteriormente los resultados obtenidos con este sistema de expresión con los resultados obtenidos previamente con proteínas recombinantes producidas en bacteria. Asimismo, confirmamos a la proteína enolasa como un receptor al DENV.

Abstract

Dengue is one of the most important arthropod-borne viral diseases in the world. The World Health Organization (WHO) estimates that 50–100 million infections occur annually, although recent estimates indicate that the total number of infections occurring each year is close to 390 million. The WHO recently classified dengue as dengue and severe dengue. Several studies have been done to find the DENV receptor(s). However, a specific receptor has not yet been established. Some of the tests that have been carried out for this purpose have used recombinant protein E and/or DIII expressed in bacteria. These same recombinant proteins have also been used in other studies to identify vaccine candidates. Mutations in the glycosylation of the E protein have been shown to have effects on the ability of the virus to infect other cells. For this reason, it could be possible to identify other protein receptors compare with those obtained with the proteins expressed in bacteria, since bacteria do not produce post-translational modifications, unlike mosquito cells. Due to this, we decided to express protein E and DIII in C6/36 cells and subsequently compare the results obtained with this expression system in C6/36 cells with the results previously obtained with recombinant proteins produced in bacteria. In addition, we confirmed the identification of enolase as a receptor for DENV.

1. Introducción

El dengue es una enfermedad sistémica viral que se ha establecido de manera global en dos ciclos de transmisión, el endémico y epidémico. La infección por el virus Dengue en humanos, es a menudo, inaparente pero puede llevar a un amplio rango de manifestaciones clínicas que van desde fiebre moderada a un potencialmente fatal síndrome de shock por dengue (Gubler *et al.*, 2014).

Dentro de todos los arbovirus, los virus dengue (DENV) son los patógenos humanos con mayor importancia en la actualidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que de 50–100 millones de infecciones ocurren anualmente, aunque estimaciones recientes indican que el número total de infecciones ocurridas cada año es cercana a los 390 millones (Bhatt *et al.*, 2013). Se ha estimado también que 3.6 billones de personas, más de la mitad de la población mundial, vive en áreas que están en riesgo de infección por Dengue (Brady *et al.*, 2012). La incidencia del dengue ha incrementado 30 veces en décadas recientes (Guzman *et al.*, 2016; Pollett *et al.*, 2018).

El virus dengue es transmitido a los humanos predominantemente a través de los mosquitos altamente competentes *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Kraemer *et al.*, 2015; Leta *et al.*, 2018).

1.1 Epidemiología

El origen y evolución de los virus Dengue ha sido un tema de discusión a través de los años. En estudios recientes basados en datos de secuenciación del virus Dengue y otros flavivirus se ha sugerido un origen africano del flavivirus progenitor que se ramificó dando origen a tres géneros *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus* (Gubler *et al.*, 2014).

Los primeros virus Dengue fueron aislados hasta 1943, durante la segunda guerra mundial. Hotta y Kimura fueron los primeros en aislar el virus en 1943 por inoculación intracraneal de suero de paciente con enfermedad grave en ratones (Kimura, 1952). Sabin y colaboradores también aislaron estos virus de manera similar de soldados estadounidenses en India, Nueva Guinea y Hawai en 1944 (Sabin & Schlesinger, 1945).

La primera descripción clínica y epidemiológica de una enfermedad similar a dengue se encuentra en la Enciclopedia China de síntomas de enfermedad y remedios, publicada durante la dinastía Jin. Esta enfermedad fue llamada “envenenamiento por agua” y se pensó que de alguna manera se conectaba con insectos voladores asociados con el agua. Se caracterizaba por salpullido, fiebre, dolor de ojos, artralgias, mialgias y manifestaciones hemorrágicas que incluían hemorragia faríngea, gingival, intestinal y vaginal (Gubler *et al.*, 2014).

La mayoría de las epidemias de enfermedades similares a dengue descritas en la literatura antes de 1945 ocurrieron antes de que los laboratorios pudieran confirmar la infección por dengue y el serotipo del virus por lo que solo puede especularse que se trataron de dengue o algún virus similar a dengue (Gubler *et al.*, 2014).

El origen de la palabra Dengue es Swahili, en ambas epidemias en 1823 y 1870 de enfermedades similares a dengue en Zanzíbar y la costa este Africana, la enfermedad se llamó “Ki-Dinga pepo”, que después derivó en *dinga* o *denga*, término utilizado para distinguir la enfermedad en ambas epidemias. A partir de ahí se popularizó en América, con la llegada de los esclavos en 1828 durante una epidemia en Cuba (Gubler *et al.*, 2014); durante el brote de 1943, en Nagasaki, que se aisló el primer virus dengue por inoculación en ratones bebés con sangre humana heparinizada (Kimura, 1952).

⇒ Sureste Asiático

La actual pandemia global de dengue empezó en Asia y el pacífico durante la segunda Guerra mundial, cuando tanto el virus como el vector, fueron ampliamente expandidos a través de las regiones. En los años posteriores a la guerra, el sureste asiático experimento una expansión económica que continua hasta la fecha, la cual resulto en un crecimiento urbano sin precedentes, que también continúa en el presente, además de promover el movimiento de la gente (y con ella, el virus) entre ciudades y países de la región. Aquellos países que no tenían transmisión hiperendémica (co-circulación de diferentes serotipos del virus) comenzaron rápidamente a tenerla. Los 4 serotipos del virus fueron mantenidos en un ciclo humano-vector-humano en la mayoría de los centros urbanos del sureste asiático. El incremento de la urbanización y el comercio trajo consigo un aumento de la frecuencia y la

magnitud de las epidemias de dengue, con epidemias mayores que ocurrieron cada 3-5 años (Gubler et al., 2014; Halstead, 1988).

⇒ Sur y centro de las Islas del Pacífico, Japón y Australia

Las actividades relacionadas a la segunda Guerra mundial también resultaron en la expansión geográfica y en la densidad aumentada de *Ae. aegypti* en las islas del pacífico. En 1964, un pequeño brote de fiebre dengue causada por DENV-3 ocurrió en Tahití. El virus fue introducido desde América (Kimura, 1952).

En 1971, epidemias simultáneas de fiebre dengue, causadas por DENV-2 ocurrieron en Fiji y Tahití. El virus también fue introducido desde América y se trató de un virus del genotipo americano de DENV-2. Las epidemias de DENV-2 ocurrieron subsecuentemente en otras islas en el sur, centro y oeste del Pacífico. La importancia de estas epidemias radica en que se obtuvo por primera vez evidencia de que los virus dengue cambian en potencial epidémico conforme se mueven a través de las poblaciones y de que el nivel de viremia puede ser un marcador cuantificable para cepas de virus epidémicos y su virulencia (Bennett et al., 2003; Gubler et al., 2014).

Los primeros reportes de fiebre dengue en Australia fueron a finales de los 1800s y desde 1880 a 1955, múltiples epidemias ocurrieron en el norte de Queensland. Después de una ausencia de 26 años, el dengue reapareció en el norte de Queensland en 1981/1982 con DENV1 como el causante del brote en diversas ciudades. Más recientemente, se presentó en 1990 un brote mixto de DENV1 y DENV2. No es claro si estos virus son los mismos que estaban presentes en el norte de Queensland en 1980 o si se trató de nuevas introducciones (Gubler et al., 2014).

⇒ África

Durante el siglo XX, el dengue fue raramente reportado en África. Previo a los 1980s, la última epidemia reportada fue en Durban, Sudáfrica, en 1927/28. Se reportó también la transmisión

endémica de DENV1 y DENV2 pero no hubo reportes de brotes mayores (Carey, 1971). Sin embargo, los reportes de epidemias de fiebre dengue han incrementado dramáticamente desde 1980. Los brotes han ocurrido en el Este y el Oeste de África. La epidemia de 2009, de DENV3 en las islas Cabo Verde, con más de 17 000 casos, fue la primera reportada en esas islas (Calisher et al., 1981; Kanesa-thasan et al., 1994).

Varios estudios han demostrado que la transmisión del dengue se extiende ampliamente por África, con 34 países reportando casos de dengue, sin embargo la vigilancia de casos de dengue sigue siendo pobre y varios casos de dengue son mal diagnosticados como casos de malaria (Amarasinghe et al., 2011; Franco et al., 2010; Vasilakis et al., 2011).

En resumen, la actual pandemia de dengue se originó en el sureste asiático después de la Segunda guerra mundial. Durante los años posteriores a la guerra, cuando la fiebre hemorrágica por dengue se describió por primera vez, la enfermedad severa era esporádica y localizada en pocos países del sureste asiático. En los 1970s, la enfermedad comenzó a expandirse, primero entre los países asiáticos y luego a las islas del Pacífico y a regiones tropicales de América. Al mismo tiempo, la mayoría de los países tropicales endémicos para dengue permitieron el deterioro de su infraestructura para el control de los mosquitos.

El dengue se convirtió en una de las emergencias de salud pública más importantes en países tropicales en los siguientes años del siglo XX (Gubler et al., 2014).

⇒ América

En los países del Caribe ocurrieron epidemias de dengue antes y durante la segunda guerra mundial. De 1946 a 1963 no hubo reportes de epidemias, a pesar de la evidencia de que al menos un serotipo (DENV2) era endémico en la región. Además, pasaron otros 15 años antes de la re-emergencia del dengue como un problema mayor de salud. Esta quiescencia se debió a diferentes factores, el más importante fue el programa de erradicación de *Ae. aegypti*, llevado a cabo por la Organización Panamericana de Salud (OPS) en 1940, 1950 y 1960 para prevenir epidemias urbanas de fiebre amarilla, sin embargo el programa se detuvo en 1970, ya que las epidemias urbanas de dengue y fiebre amarilla ya no eran un problema de salud pública (Gubler et al., 2014).

Antes de 1977, solo los virus DENV2 (genotipo americano II) y DENV3 (genotipo IV) eran conocidos por estar presentes en América. Ambos fueron introducidos por el sur del pacífico en 1964 y 1971 respectivamente; DENV1 fue introducido desde Asia, causando epidemias en Jamaica y Cuba en 1977 y Puerto Rico y Venezuela en 1978. En los siguientes 4 años, se expandió a las Islas del Caribe, México, Texas, Centroamérica y el norte de América del sur causando epidemias menores de fiebre dengue clásica; DENV4 fue introducido al este de las Islas del Caribe y se expandió rápidamente a otros países ocasionando epidemias en Suriname (1982), México (1984), Puerto Rico (1986), El Salvador (1987) que fueron asociadas con casos esporádicos de fiebre de dengue hemorrágico y síndrome de shock por dengue (*Gubler et al., 2014*).

En 1981, la primera epidemia mayor de fiebre hemorrágica por dengue ocurrió en Cuba, causada por DENV2. A este virus se le asoció más frecuentemente con casos fatales. Este virus estaba más relacionado al DENV2 Nueva Guinea C, aislado 40 años antes, que al genotipo americano de DENV2, que había estado circulando en la región previamente a la epidemia (*Gubler et al., 2014*).

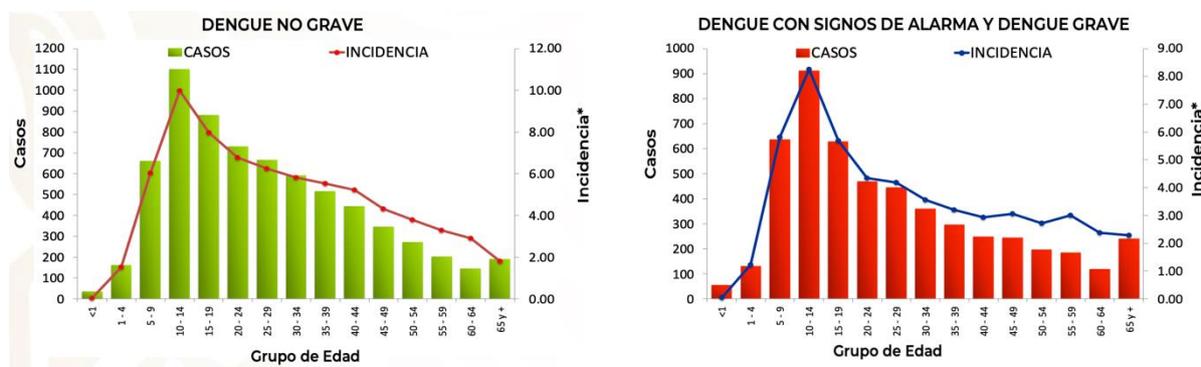
La re-invasión de América central y del sur por *Ae. aegypti* en los 1970s y 1980s, combinada con el aumento de la urbanización y movimiento de gente y con ella los virus dengue y los mosquitos vectores que se esparcen vía el comercio, resultaron en la evolución de la mayoría de los países no endémicos (sin virus presente) o hipoendémicos (un virus presente) a la hiper endemicidad (múltiples serotipos del virus presente). Esto resulto en una frecuencia aumentada de la actividad epidémica y en la emergencia de la fiebre dengue hemorrágico como un problema de salud pública mayor (*Reiter, 1998*).

⇒ México

A partir de su reintroducción en México en 1978, después de haber sido erradicado durante 12 años, el dengue se convirtió en un problema de salud pública. A partir de 1980 y hasta 2011 se generaron tres periodos de la enfermedad, cada uno de aproximadamente 10 años, en los cuales se observó, por lo menos, un brote importante por cada década. Se observó un cambio epidemiológico en México, que es consistente con el aumento en la incidencia de la enfermedad en la población juvenil e infantil reportada en algunos países de América Latina durante los últimos años. El incremento del dengue en la población juvenil e infantil es particularmente alarmante debido a la evolución fulminante asociada con la aparición de complicaciones tempranas. Los datos encontrados en este estudio reflejan la necesidad de una vigilancia estrecha y un análisis multisistémico que permita identificar los factores de riesgo que están generando este viraje de la población afectada en México. Entre los factores de riesgo se han propuesto factores ambientales, como la variabilidad climática, la circulación de los serotipos, la genética de las poblaciones virales y las características genéticas de la población (Torres-Galicia et al., 2014).

Esta tendencia de que las poblaciones infantil y juvenil sean las más afectadas se siguen manteniendo hasta los últimos reportes que se tiene del año 2022 (Fig 1A) y para ese mismo periodo de tiempo se detectó que el estado con mayor incidencia de dengue en México es el estado de Sonora, con 70.07 casos de dengue por cada 100 000 habitantes. Le sigue el estado de Tabasco en segundo lugar (Fig 1B).

A)



(Continúa la figura 1 en la siguiente página)

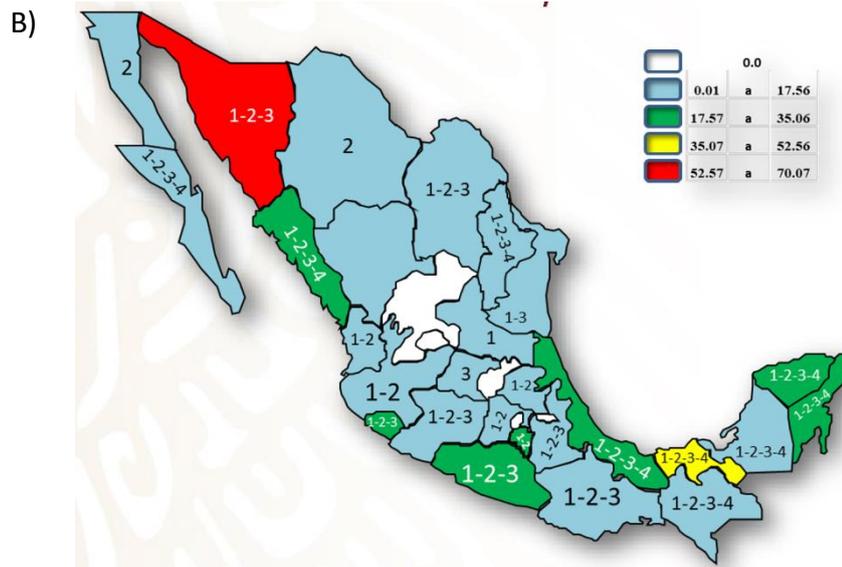


Figura 1. A) Casos e incidencia de casos confirmados de dengue por grupo de edad y género en México (2022). B) Mapa de México que muestra los estados con mayor incidencia de dengue en el periodo de diciembre del año 2022 (https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/785568/Pano_dengue_49_2022.pdf).

Como se observa en la figura 1B, en México se encuentran circulando los cuatro serotipos de dengue por todo el territorio nacional.

1.2 La enfermedad Dengue

El dengue es una enfermedad sistémica con un amplio rango de manifestaciones clínicas que van desde ser asintomático a presentar malestares leves o presentar manifestaciones clínicas severas. La enfermedad se clasifica en tres fases: Febril, crítica y de recuperación (WHO, 2009).

⇒ Fase febril

En esta fase se desarrollan fiebres muy altas que duran entre 2 a 7 días y que están acompañadas de enrojecimiento de la cara, salpullido, dolor de cuerpo, mialgia, artralgia, dolor de cabeza, dolor retro orbital y en algunos casos anorexia, vómito, dolor de garganta y conjuntivitis (WHO, 2009).

⇒ Fase crítica

Ocurre cuando la fiebre va haciéndose menor, puede ocurrir desde el día 3 hasta el 7. Se asocia con una propensión aumentada de fuga capilar y hemorragia. En este punto, los pacientes que no presenten fuga capilar comienzan a mejorar, mientras que aquellos que si la presentan pueden empeorar y la enfermedad se convierte en una amenaza para la vida (WHO, 2009).

Cuando se presenta un shock prolongado, puede haber impedimento orgánico, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada. Todo esto finalmente lleva a una hemorragia severa. Algunos síntomas que también se pueden presentar, aunque son atípicos, son encefalitis, miocarditis, hepatitis, pancreatitis, retinitis y síndrome respiratorio agudo. En esta fase hay dos posibles resultados, el paciente muere o pasa a la fase de recuperación, si sobrevive las primeras 24-48 h de fase crítica (WHO, 2009).

1.3 Virus Dengue

El virus dengue (DENV), causante de la enfermedad Dengue, es un virus transmitido por mosquitos, que pertenece a la familia Flaviviridae, dentro del género *flavivirus*. Hay cuatro serotipos de Dengue (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4) que están relacionados antigénicamente y que además a su vez se clasifican en genotipos y subtipos (Guzman & Harris, 2015).

Se trata de una partícula esférica, con una envoltura, que tiene un tamaño aproximado de 50-60 nm y un genoma de aproximadamente 11 kb el cual es una cadena sencilla de RNA (+) con un único marco de lectura abierta que codifica para una poliproteína larga que es subsecuentemente escindida por una combinación de proteasas del huésped y virales para generar tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) Fig 3. (Chambers et al., 1990; Guzman et al., 2016).

Este genoma consta de dos regiones no traducida, una estructura similar a un cap del mRNA celular en su extremo 5' y está desprovisto de una cola poliadenilada en su extremo 3'

(Lindenbach & Rice, 2007). Estas regiones no traducidas 5' y 3' tienen un papel importante en la replicación viral, traducción de proteínas y ensamblaje de viriones (Alvarez et al., 2005; Filomatori et al., 2006).

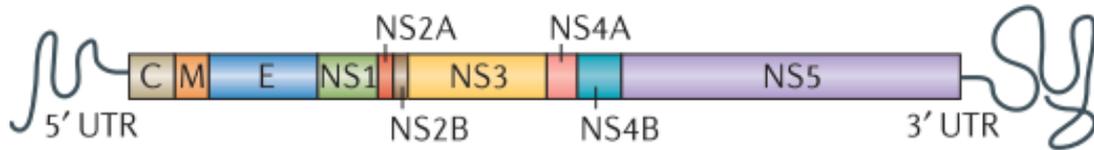


Figura 2. Poliproteína codificada por el genoma de DENV. La poliproteína es escindida por proteasas virales y del huésped. Se muestran las 3 proteínas estructurales y las 7 proteínas no estructurales (NS), así como las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR). (Guzman et al., 2016)

⇒ Proteínas virales

Proteínas estructurales

Proteína C (C)

La proteína C es una proteína con un tamaño aproximado de 12 kDa, dimérica y básica con una distribución de cargas asimétricas que sugieren que un lado de la proteína, que tiene un alto número de residuos cargados positivamente, interactúa con el RNA viral, mientras que, por el lado contrario, interactúa con la membrana viral (Ma et al., 2004). C es esencial para el ensamblaje del virus, ya que asegura la encapsidación del genoma viral (Ferlenghi et al., 2001).

Proteína de membrana (prM/M)

La proteína de membrana de DENV tiene un papel importante en el arreglo y maduración de la partícula viral. Posee siete hebras β antiparalelas estabilizadas por tres puentes disulfuro y en total hay 180 copias de proteína M formando la envoltura glicoproteica del virión maduro (Perera & Kuhn, 2008).

La proteína M funciona como una proteína transmembranal debajo del caparazón de la proteína E de la partícula viral madura. El péptido pr se queda unido a la proteína E, cubriendo el loop de fusión en esta proteína, hasta que la partícula viral es liberada fuera de la célula. El corte proteolítico del péptido pr del péptido M se lleva a cabo por la furina, una proteasa del hospedero, durante la maduración de la partícula viral (Y. Zhang et al., 2004).

Proteína de envoltura (E)

La proteína E se encuentra presente en la superficie viral y tiene un papel esencial en la unión del virus a la célula huésped. En solución se encuentra en forma de dímero y cada monómero de proteína E consiste en tres diferentes dominios (Modis et al., 2003; Rey, 2003; Y. Zhang et al., 2004).

El dominio I (DI) es el dominio central, el dominio II (DII) es una estructura elongada similar a dedos que contiene un loop en una de sus puntas con una bolsa hidrofóbica, la cual se abre y se cierra por un cambio conformacional en la interfase entre el dominio I y dominio II. El dominio III (DIII) es el dominio de unión al receptor (Rey, 2003). Los anticuerpos que reconocen un tipo de DENV pueden ser inefectivos contra otras cepas de DENV debido a la variación estructural de la proteína E (Leitmeyer et al., 1999).

Proteínas no estructurales

NS1

La proteína no estructural 1 (NS1) es una glicoproteína conservada, con un tamaño aproximado de 48 kDa. Se ha reportado que tiene implicaciones en la replicación de DENV. Se presenta como un monómero, la dimerización ocurre en el lumen del retículo endoplásmico después de algunas modificaciones post traduccionales. Es secretada al espacio extracelular como una molécula hexamérica lipoproteica (Fan et al., 2013; Muller & Young, 2013). Los hexámeros de NS1 tienen un centro rico en lípidos y se mantienen juntos mediante interacciones hidrofóbicas débiles (Flamand et al., 1999).

NS1 puede encontrarse en el ambiente extracelular, juntándose hasta 50 µg/mL en el suero de algunos pacientes con DENV. La NS1 circulante también ha sido identificada como un importante marcador de diagnóstico para la infección con DENV. Esta proteína también tiene interacción con varios componentes de la respuesta inmune del huésped, tanto innata como adaptativa (Alcon et al., 2002; Libraty et al., 2002).

NS2A

La proteína NS2A tiene un tamaño aproximado de 22 kDa. Consiste en cinco segmentos transmembranales que cubren la bicapada lipídica de la membrana del retículo endoplásmico. Tiene una función importante en el complejo de replicación y en el ensamblaje del virión (Leung et al., 2008; Xie et al., 2015).

NS2B

Es una proteína integral de membrana con un tamaño aproximado de 14 kDa que contiene tres dominios; dos segmentos transmembranales localizados en los extremos N y C terminales y una región central de 47 aminoácidos que actúa como un cofactor proteico esencial de la proteasa NS3 (Luo et al., 2015). Es capaz de regular la actividad de NS3 estabilizando el correcto plegamiento de la proteína y también participando directamente en la escisión del sustrato (Erbel et al., 2006)

NS3

NS3 es la segunda proteína viral más grande después de NS5, tiene un tamaño aproximado de 69 kDa y tiene un papel esencial en el ciclo viral. Tiene un dominio similar a quimotripsina en su extremo N terminal, que corta la poliproteína precursora para liberar proteínas NS individuales y un extremo C terminal NTPasa dependiente de helicasa de RNA. Está involucrada en la replicación del genoma y la síntesis de RNA viral (Luo et al., 2010).

Sus dominios funcionales están conectados por un linker de aproximadamente 10 aminoácidos. No es claro porque un polipéptido tiene dos dominios con actividades aparentemente no relacionadas. Hay estudios que sugieren que ambos dominios enzimáticos están acoplados funcionalmente y que la actividad helicasa está potenciada por la presencia del dominio con la actividad de proteasa (Luo et al., 2010). Los virus que tienen una helicasa NS3 no funcional no pueden replicarse apropiadamente, indicando que la actividad helicasa/RTPasa de NS3 es esencial en la replicación del virus (Matusan et al., 2001).

NS4A y NS4B

Son proteínas integrales de membrana que tienen varias funciones en la replicación de DENV y en las interacciones con el huésped. Tanto NS4A como NS4B son elementos cruciales del complejo de replicación asociado a la membrana del retículo endoplásmico. Mediante la comunicación con NS4A, la vimentina celular regula la formación del complejo de replicación de DENV (Teo & Chu, 2014).

La estructura de NS4A contiene 127 aminoácidos y dos dominios transmembranales (TMDs). El primer TMD, de 48 aminoácidos, está involucrado en la formación de la hélice anfipática que media la oligomerización (J. Zou et al., 2015a). La proteína NS4B tiene 248 aminoácidos distribuidos en tres TMDs. En el virus West Nile (WNV) se ha observado que NS4A regula la actividad ATPasa de la helicasa NS3, mientras que en DENV se ha visto que NS4B interactúa con el dominio de helicasa de NS3 y la disocia de la hebra de RNA (Shiryaev et al., 2009; Stern et al., 2013).

Una región de NS4A, de los aminoácidos 40 a 76, interactúa con una región de NS4B, de los aminoácidos 84 a 146. Estos aminoácidos tienen una correlación entre la replicación viral y la interacción NS4A-NS4B, lo que demuestra la importancia biológica de esta interacción. Mutaciones en esta región de aminoácidos inhibe la interacción de NS4A con NS4B, inhibiendo la replicación (Naik & Wu, 2015; J. Zou et al., 2015b).

NS5

NS5 es la proteína más grande, de 900 aminoácidos y es la más conservada dentro del género flavivirus. En su estructura contiene dos diferentes dominios en cada uno de sus extremos. El dominio I se encuentra en la región N terminal de la proteína y se trata de una metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina (SAM) (Egloff et al., 2002). El dominio MTasa de NS5 pone un cap al RNA de DENV, este paso se requiere para la estabilidad y traducción de la poliproteína por la célula hospedera (Ferron et al., 2012).

El dominio II se encuentra en la región C terminal y se le conoce como el dominio RdRp, el cual sintetiza el antígeno y el genoma hijo. Se trata del dominio más importante de NS5 y está constituido por tres subdominios que están conservados en todos los RdRp virales. Tiene una señal de localización nuclear esencial para su interacción con otras proteínas virales y del huésped (Egloff et al., 2002; T. L. Yap et al., 2007; G. Zou et al., 2011).

⇒ Ciclo viral

El primer paso para la replicación del virus es cuando este se une a receptores en la superficie celular de la célula hospedera, después el virus es internalizado por endocitosis. Actualmente se han identificado varias moléculas de adhesión y receptores para DENV en células de mamífero incluyendo glucosaminoglicanos, proteínas de choque térmico, lectinas tipo C y receptores de manosa (Clyde et al., 2006).

Después de la internalización, el bajo pH del endosoma desencadena un cambio conformacional en la proteína E que media la fusión de las membranas viral y celular. La nucleocápside se libera al citoplasma donde es desensamblada y el genoma viral se libera para empezar con la traducción (Mukhopadhyay et al., 2005).

La hebra positiva de RNA sirve como mRNA para la traducción de una poliproteína y después sirve como molde para la síntesis de RNA. La poliproteína es dirigida al retículo endoplásmico y es cortada en estructuras individuales y proteínas NS por proteasas de la célula hospedera

y la proteína viral NS3 (Acosta et al., 2014). Las proteínas no estructurales en conjunto con proteínas del huésped inducen invaginaciones en la membrana hacia el lumen del retículo endoplásmico (Welsch et al., 2009).

El RNA nuevo recién sintetizado es empaquetado por la proteína C para formar la nucleocápside. Las proteínas prM y E forman heterodímeros orientados al lumen del retículo endoplásmico, después se asocian en trímeros y las interacciones entre ellas inducen curvaturas en la superficie, lo que genera la formación de los nuevos viriones y su liberación del retículo endoplásmico para que puedan pasar después por la red del trans-Golgi. El péptido pr de la proteína prM cubre el péptido de fusión de la proteína E (Acosta et al., 2014; Y. Zhang et al., 2003).

Una vez que las partículas son transportadas a la red del trans Golgi, el bajo pH (6.0) expone un sitio de corte en prM para la proteasa furina (Y. Zhang et al., 2003). Después del corte, el péptido pr permanece unido a la proteína E cubriendo el péptido de fusión y previniendo su activación en el ambiente ácido del trans Golgi. La interacción del péptido pr con la proteína E es dependiente de pH, conforme este aumenta a neutro, el péptido pr se disocia del virión, haciéndolo competente para la infección (Yu et al., 2008) Fig.4.

Los viriones maduros tienen una superficie lisa y un diámetro promedio de 50 nm. Al ser liberados de la célula estos tienen la capacidad de infectar a otras células (Kuhn et al., 2002). Mediante una reconstrucción cryo-EM, se observó que hay una coraza formada por los ectodominios de las proteínas M y la región de tallo de la proteína E. Debajo de esta coraza se encuentra la membrana lipídica rodeando la nucleocápside. Las proteínas E y M no tienen interacción con la cápside (W. Zhang et al., 2003).

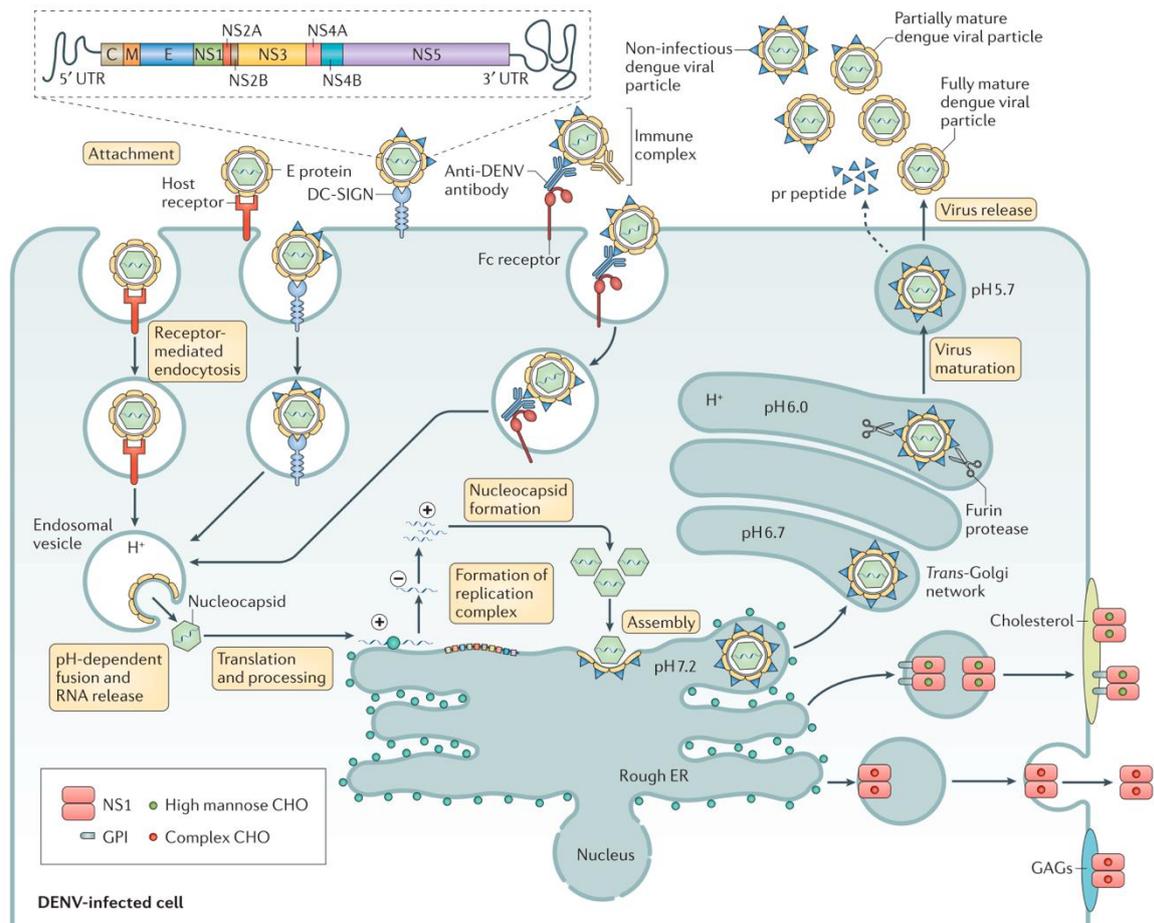


Figura 3. Ciclo viral del DENV. El virus se une al receptor para ser internalizado por endocitosis, al acidificarse el pH, el péptido de fusión en el DII de la proteína E queda expuesto dando paso a la fusión de membranas y liberación de la nucleocápside al citoplasma en donde esta se desensambla y el RNA viral es traducido en el retículo endoplásmico en donde se lleva a cabo también el procesamiento de la poliproteína. Una vez formadas las proteínas NS, se forma el complejo de replicación para generar muchas copias del genoma viral, el cual se empaqueta con la proteína C en una nueva nucleocápside que es posteriormente rodeada con la envoltura formada con prM y E. El virión inmaduro comienza su paso por la red del trans Golgi en donde el péptido pr es escindido y finalmente se libera el virión maduro.

1.4 Vectores

Los virus dengue son mantenidos en un ciclo endémico-epidémico que involucra a humanos y mosquitos en centros urbanos tropicales muy concurridos. Estos virus se han adaptado a los humanos y a su principal vector *Ae. aegypti*, el cuál emergió tiempo atrás de ciclos selváticos

que involucraban primates no humanos en regiones de África y de Asia (Gubler et al., 2014)

Fig. 4.

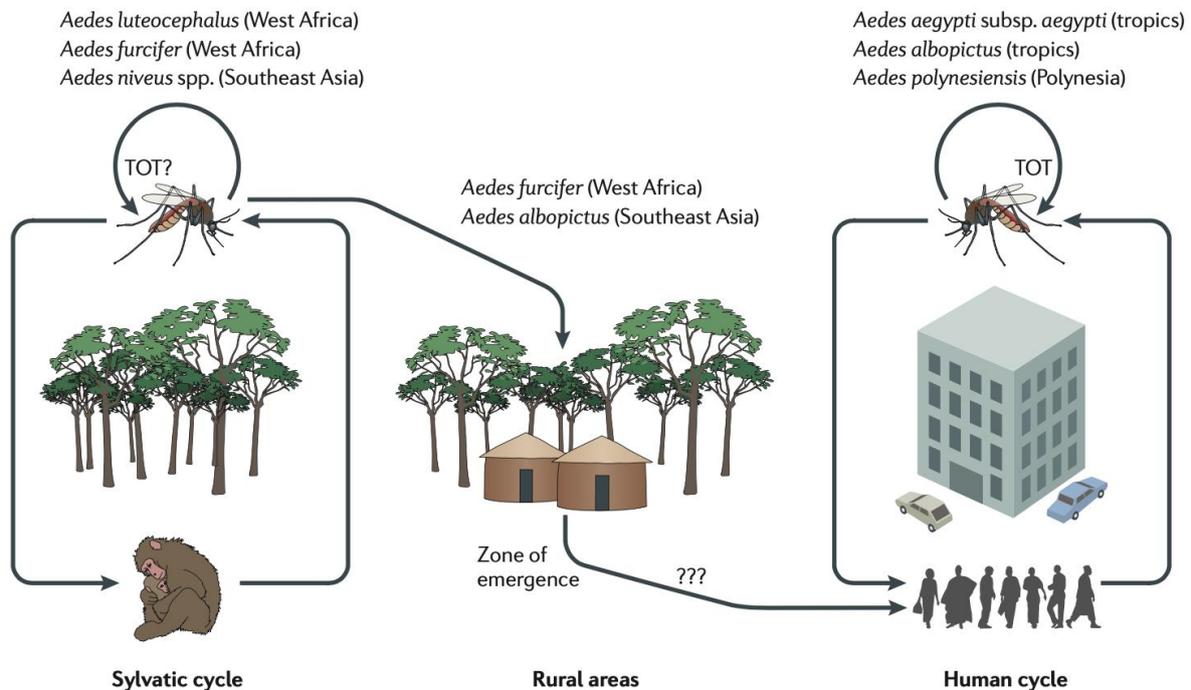


Figura 4. Los ciclos de transmisión de DENV. Los orígenes selváticos de DENV y la zona de emergencia, en donde los ciclos selváticos contactan con poblaciones humanas en áreas rurales de África occidental y el sureste asiático. Se ha observado a nivel experimental que los virus dengue pueden persistir en poblaciones de mosquitos cuando los mosquitos infectados pasan el virus a sus huevos. (Transmisión transovárica = TOT) (Vasilakis et al., 2011).

Ae. aegypti fue introducido en América durante el comercio de esclavos en los años 1600s y se esparció en todo el mundo conforme la industria naviera se fue expandiendo. Este mosquito es capaz de vivir en asociación con los humanos alimentándose de ellos, viviendo en sus casas y depositando sus huevos en contenedores hechos por los humanos. Las hembras mosquito en promedio viven una semana pero algunas pueden vivir hasta por dos semanas (Southwood et al., 1972). Debido a la globalización el mosquito se ha expandido aún más en el mundo.

Es el mosquito hembra el que se infecta al alimentarse de sangre de algún individuo humano que se encuentra en la fase aguda febril o en la fase virémica de la enfermedad. Durante el

periodo de incubación, el virus infecta primero las células del intestino medio y después se replica en diversos tejidos del mosquito, finalmente infecta las glándulas salivales, generalmente 8-10 días después. Este proceso puede verse afectado por la temperatura del medio ambiente, la cepa viral y la competencia del mosquito. Una vez que las glándulas salivales se infectan, el mosquito es infectivo y puede transmitir el virus a otra persona cuando se alimente de ella. Los mosquitos infectados permanecen infectados por el resto de su vida e infectan a cada persona de la que se alimenten (Gubler et al., 2014).

La competencia vectorial para un arbovirus es afectada por factores genéticos intrínsecos y mecanismos que controlan la habilidad de un mosquito vector para adquirir, mantener y transmitir un arbovirus. Los factores genéticos relacionados con la competencia vectorial son las vías relacionadas con la inmunidad innata y las barreras de tejido en los mosquitos que necesitan ser sorteadas por los arbovirus. Estas barreras son la barrera de infección del intestino medio (MIB), la barrera de escape del intestino medio (MEB), la barrera de infección de las glándulas salivales (SGIB) y la barrera de escape de las glándulas salivales (SGEB). La competencia vectorial puede variar ampliamente entre especies de mosquitos y poblaciones o cepas. Solo algunas especies específicas de arbovirus o cepas pueden superar con éxito estos factores genéticos, lo que sugiere que los arbovirus y sus mosquitos vectores están co-evolucionando constantemente (Franz et al., 2015).

Los pasos clave para una infección por arbovirus en un mosquito son: Iniciación de la infección del intestino medio; diseminación de la infección dentro del epitelio intestinal; diseminación del intestino medio a tejidos secundarios; amplificaciones secundarias del virus en tejidos fuera del intestino medio; infección de las glándulas salivales y liberación del virus a los ductos salivales para la transmisión horizontal a un huésped vertebrado (Hardy et al., 1983).

⇒ Infección en el intestino medio

El canal alimentario de los mosquitos se puede dividir en tres regiones: el intestino anterior, que va de la boca al intestino medio; el intestino medio y el intestino posterior, que va hasta el ano (Franz et al., 2015).

El intestino medio de los mosquitos consiste en una capa sencilla de células epiteliales rodeadas por una matriz extracelular denominada lámina basal. La lámina basal proteinéica arrugada y estriada rodea el epitelio del intestino medio y lo separa de las células musculares circulares y longitudinales y de la tráquea, que envuelven el intestino medio (Okuda et al., 2002).

En el intestino medio, una región anterior puede distinguirse de una amplia región posterior. En la porción anterior del intestino medio, involucrada en la absorción de azúcares, las células tienen microvellosidades prominentes, un retículo endoplásmico liso y un laberinto basal bien desarrollado, una red reticulada del espacio intercelular localizado en la porción basal de las células epiteliales del intestino medio. Esta última está formada por pliegues de la membrana plasmática basal (Hecker, 1977; Romoser et al., 2004).

En la porción posterior del intestino medio se lleva a cabo la absorción de los componentes de la sangre. En esta porción las células tienen un retículo endoplásmico rugoso prominente y un elevado número de mitocondrias (Hecker, 1977). La adquisición de sangre en la comida cambia drásticamente la estructura epitelial del intestino medio, los núcleos se condensan mientras que las mitocondrias se alargan (Houk, 1977).

Después de adquirir al virus al alimentarse con la sangre infectada, los virus entran al lumen del intestino medio, los viriones en proximidad a la línea de células epiteliales necesitan entrar a ellas a través de las microvellosidades antes de que la sangre sea rodeada por la matriz periotrófica, un saco de quitina secretado por el epitelio del intestino medio al lumen del intestino durante la digestión de la sangre. Esto tiene una duración de aproximadamente entre 4 a 8 horas después de alimentarse y se tiene el grosor y la textura a las 12 horas en *Ae. aegypti* (Kato et al., 2002; Okuda et al., 2002; Perrone & Spielman, 1988).

Los patrones de infección de las células epiteliales del intestino medio varían de acuerdo con las combinaciones mosquito-virus. Un ejemplo es que cuando hay infección por DENV2, el virus no es detectado en la porción anterior del intestino medio de *Ae. albopictus*, mientras que otros virus infectan todo el intestino medio de sus vectores (M. Zhang et al., 2010).

Durante el inicio de la infección en el epitelio del intestino medio, solo un pequeño número de células parece ser receptiva a la infección por el virus. Muchas infecciones ocurren en una de cinco células de intestino medio. Estudios actuales sugieren que los viriones necesitan pasar a través de la lámina basal del epitelio del intestino medio para entrar al hemocele (Franz et al., 2015).

Los arbovirus requieren de medios para amplificarse después de que escapan de las células del epitelio del intestino medio para poder infectar las glándulas salivales eficientemente (Hardy et al., 1983) y de un vehículo que asegure su diseminación del intestino medio a las glándulas salivales. Después de la diseminación del intestino medio, los arbovirus se diseminan a tejidos secundarios como hemocitos, tejido nervioso y, algunos virus, en el tejido muscular (Parikh et al., 2009).

Se ha observado que la infección de los hemocitos puede ser un paso de amplificación importante para los arbovirus fuera del intestino medio antes de infectar las glándulas salivales. Una vez que el virus infecta las glándulas salivales del mosquito, se transmite junto con la saliva (Franz et al., 2015).

⇒ Barreras de infección

Las barreras de infección de los mosquitos son: la barrera de infección del intestino medio (MIB), barrera de escape del intestino medio (MEB), barrera de infección de las glándulas salivales (SGIB) y barrera de escape de las glándulas salivales (SGEB) y afectan la competencia vectorial de un mosquito para un virus determinado. Estas barreras pueden ser dosis dependientes o independientes. Las que son dosis dependientes pueden verse afectadas por la respuesta antiviral innata como la vía del RNA de interferencia (RNAi). El RNAi limita la replicación del virus, por lo que inhabilitar la vía RNAi permite que los virus superen la infección del intestino medio dosis dependiente y la barrera de escape. Las barreras dosis dependientes pueden involucrar incompatibilidades entre el virión y las estructuras de superficie de los tejidos, previniendo la unión del virus (Franz et al., 2015).

Los arbovirus encuentran cuellos de botella en sus vectores naturales durante la infección, diseminación y transmisión. Estos cuellos de botella ocurren a nivel del intestino medio y de las glándulas salivales (Forrester et al., 2012). En este trabajo únicamente se mencionarán las barreras que corresponden al intestino medio.

Barrera de infección del intestino medio (MIB)

Este tipo de barrera puede resultar de dos eventos diferentes, uno es que el virus sea incapaz de invadir las células epiteliales del intestino medio y otro es que el virus sea capaz de invadir, pero incapaz de replicarse o diseminarse a otras células. Hay varias hipótesis que se han propuesto para explicar estos fenómenos (Franz et al., 2015; Hardy et al., 1983):

1. Desviación de la sangre y el virus al divertículo ventral
2. Filtración del virus por la matriz periotrófica
3. Inactivación de viriones por enzimas digestivas del intestino medio
4. Interacciones de carga entre el virus y células del intestino medio que impiden la unión
5. Ausencia de receptores apropiados en la superficie apical de las células epiteliales

Únicamente la hipótesis 5 ha sido demostrada en diversos estudios.

⇒ Receptores

La susceptibilidad de un tejido huésped a un virus es dependiente de la abundancia y distribución de receptores celulares. El primer contacto que se da entre una célula y el virus es no específico ya que existen factores de unión en la superficie celular que se encargan de concentrar al virus en la superficie celular, facilitando la unión a su receptor particular (Grove & Marsh, 2011).

Para el virus dengue, aún no se tiene detectado un único receptor específico. En diversos trabajos (Tabla 1) se han propuesto varios candidatos como proteínas de 40 y 45 kDa (Mendoza et al., 2002; Reyes-Del Valle & Del Angel, 2004; Salas-Benito & del Angel, 1997), la

prohibitina (Kuadkitkan et al., 2010a), proteínas de 67 y 80 kDa (De Lourdes Muñoz et al., 1998a; Mercado-Curiel et al., 2006, 2008; Muñoz et al., 2013). Recientemente se identificó y caracterizó a la proteína de 67 kDa como enolasa, probándose que interactúa con DENV en la superficie celular, mediante ensayos de co-localización (Brito-Carreón et al., 2022).

Todos estos trabajos dejan en claro que el DENV no usa un único receptor para poder entrar en las células si no que se une a diversas moléculas, lo que además concuerda con el hecho de que el virus sea capaz de infectar varios tipos celulares y de diferentes organismos. Además de que sugiere que el virus ha evolucionado para no tener un único receptor específico si no varios inespecíficos (Cruz-Oliveira et al., 2015).

Tabla 1. Receptores putativos para DENV en células o tejidos de mosquitos. Tomado y modificado de (Cruz-Oliveira et al., 2015).

Molécula	Tipo	Células/tejido	Serotipo	Referencia
Prohibitina	Proteína	C6/36 CCL-125	DENV2	Kuadkitkan <i>et al.</i> (2010)
40 y 45 kDa	Glicoproteína	C6/36 Diversos tejidos de mosquito	DENV4	Salas-Benito y del Angel (1997) Yazi Mendoza <i>et al.</i> (2002) Reyes-del Valle y del Angel (2004)
67 (enolasa) y 80 kDa	Proteína	C6/36 Intestino medio de <i>Aedes aegypti</i>	DENV1, 2, 3 y 4	Muñoz et al. (1998) Mercado-Curiel <i>et al.</i> (2006) Mercado-Curiel <i>et al.</i> (2008) Muñoz <i>et al.</i> (2013) Brito-Carreón <i>et al.</i> (2022)
77, 58, 54 y 37 kDa	Desconocido	Glándulas salivales de <i>Aedes aegypti</i>	DENV1, 2, 3 y 4	Cao-Lormeau (2009)

Justificación

Actualmente no hay medidas que puedan prevenir la infección en humanos por DENV. Una forma indirecta de evitar esas infecciones es evitando la infección directamente en el mosquito vector. Dado que el punto más importante en la infección de los mosquitos es la infección del intestino medio, es de vital importancia conocer los receptores para el virus que se encuentran presentes en esta zona del mosquito.

Además, es necesario descartar que existan modificaciones post-traduccionales en la proteína E de DENV y en su DIII, ya que diversos estudios que se han hecho en el pasado y que se están haciendo en el presente utilizan estas proteínas expresadas en bacteria y podrían existir diferencias con las proteínas que se producen de manera natural dentro de las células de mosquito.

Hipótesis

La expresión de proteínas que puedan estar actuando como receptores para DENV-2 debe ser diferente entre las cepas de mosquito con diferente susceptibilidad a la infección.

La unión de la proteína E y del DIII con algunas proteínas del intestino medio de mosquito puede variar debido a las modificaciones post-traduccionales del sistema de expresión utilizado.

Objetivo general

Identificar receptores putativos para DENV2 en el intestino medio de *Ae. aegypti* con diferente susceptibilidad a la infección por DENV2 expresando a la proteína E y el DIII en bacterias y en células C6/36

Objetivos particulares

1. Obtener las construcciones para expresar la proteína E y el DIII de DENV2 en *E. coli* BL21 y en C6/36.
2. Expresar y purificar la proteína E y DIII en células C6/36 y *E. coli* BL21.
3. Hacer columnas de Sefarosa 4B con:
 - Proteína E (1 expresada en bacteria y 1 expresada en C6/36)
 - DIII (1 expresado en bacteria y 1 expresado en C6/36)
4. Analizar las fracciones de elución por espectrometría de masas y seleccionar candidatas.
5. Análisis *in silico* de candidatas seleccionadas para comprobar su localización en la membrana celular y comparar resultados.

2. Materiales y métodos

2.1 Virus, bacterias y células

Se trabajó con el virus DENV-2 4.4.11, el cuál fue obtenido de muestras clínicas tomadas del estado de Veracruz.

Las células C6/36 fueron mantenidas en condiciones estándar como las descritas previamente (Kuno et al., 1991). Resumidamente, se utilizó el medio MEM suplementado con 100 u de penicilina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales 100 mM, L-glutamina 2 mM, estreptomicina 100 µg/ml y suero fetal bovino 10%. Todos los reactivos utilizados fueron marca Gibco. El cultivo celular se mantuvo a 28 °C sin CO₂.

Las cepas de *E. coli* DH5 y BL21 se obtuvieron del laboratorio del Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV Zacatenco y para su cultivo y mantenimiento se utilizaron placas con medio LB con y sin ampicilina y se incubaron a 37 °C.

Las células competentes se prepararon de cultivos de una noche de *E.coli* DH5α o BL21 en placas con medio LB de los que se picó una colonia y se inocularon tubos con 5 ml de medio LB líquido, los cuales se dejaron incubando toda la noche a 37 °C con agitación constante.

Al día siguiente se hicieron diluciones 1:100 con medio SOC y se crecieron las bacterias hasta O.D = 0.5, los cultivos se dejaron reposando 5 minutos en hielo. Se centrifugaron los cultivos a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, los pellets se resuspendieron en 10 ml de TSS frío. Se hicieron alícuotas de 100 µl y se reposaron en hielo seco durante 1 hora. Posteriormente las alícuotas se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

2.2 Extracción de RNA viral, RT-qPCR y purificación de cDNA

Para extraer el RNA viral, se añadieron 250 µl de una solución viral concentrada en un tubo Eppendorf y se siguió el protocolo del reactivo TRIzol[®] (GibcoRBL).

En resumen, se centrifugo a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue desechado y al pellet se le añadieron 750 µl de TRIzol[®] y se pipeteo hasta la homogenización completa de la muestra, la cual se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se le agregaron 150 µl de cloroformo y se agitó el tubo por inversión. En seguida se incubó la muestra a temperatura ambiente por tres minutos y luego se centrifugó a 12000 x g por 15 minutos y se obtuvo la fase acuosa, a la que se le añadieron 375 µl de isopropanol 100%. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 x g por 10 minutos a 4 °C.

Se obtuvo el pellet de RNA que fue lavado con 750 µL de etanol 75%, se agitó la muestra y se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos, 4 °C. El pellet fue secado durante 20 minutos al aire y se resuspendió en agua libre de RNasas y se calentó a 60 °C durante 15 minutos. El RNA se cuantificó usando el equipo NanoDrop 2000 (ThermoSCIENTIFIC).

Para amplificar el cDNA correspondiente a la proteína E se llevó a cabo una RT-PCR, utilizando el kit One Step RT-PCR de Qiagen, con las siguientes condiciones:

Tabla 2. Volumen de reactivo necesario por reacción de RT-PCR para amplificar cDNA de proteína E de DENV-2.

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer 5X	4.0
dNTPs (10 mM)	0.8
Primer Fwd (10 mM)	1.0
Primer Rev (10 mM)	1.0
Enzima	0.8
RNA (0.4 µg/µl)	5.0
Agua	7.4
Volumen Total	20.0

Las condiciones establecidas en el termociclador GeneAmp PCR system 2700 de Applied Biosystems, fueron las siguientes:

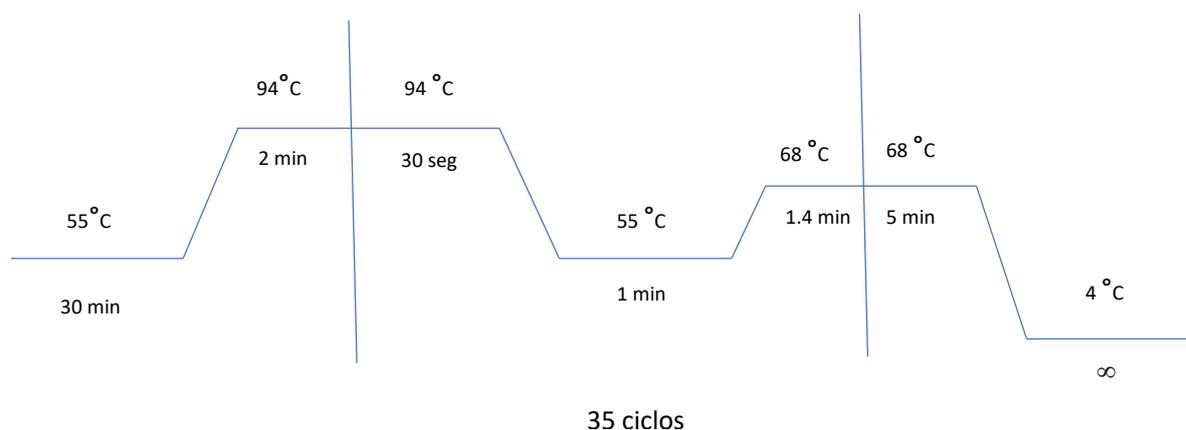


Figura 5. RT-PCR para amplificar cDNA correspondiente a la proteína E.

Los primers específicos, proveídos por Sigma-Aldrich, que se utilizaron fueron:

Tabla 3. Primers específicos para amplificar cDNA correspondiente a la proteína E de DENV-2. El primer FWD tiene el sitio de corte para la enzima NotI y el tag de histidinas. El primer REV tiene el sitio de corte para la enzima EcoRV.

Primer	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño (pb)
FWD	5'GCGGCCGCCATCATCATCATCATATGCGTTG3'	69.0	1500
REV	5'CTAGAGATATCCGGCCTGCACCATAACTCCC3'	66.0	

Los amplificados obtenidos se corrieron en geles de agarosa 1.5% y se utilizó el marcador de peso molecular 1kb “plus DNA Ladder ready to use” de Fermentas (Fig 9A). Las bandas de 1500 pb se purificaron siguiendo el protocolo del kit utilizado QIAquick Gel extraction. Los productos purificados se cuantificaron con el NanoDrop 2000.

2.3 Plásmidos y ligación

El vector de clonación pJET1.2 Blunt se obtuvo del kit CloneJET PCR de ThermoScientific. Con este vector se hizo la reacción de ligación con la banda purificada de 1500 pb (E). Se siguieron

las especificaciones del protocolo del kit para la formación de extremos romos, utilizando 0.5 μ l del producto purificado y ajustando la cantidad de agua para un volumen final de reacción de 9.0 μ l. La reacción se llevó a cabo durante 10 minutos a 70 °C, luego se incubó en hielo por un minuto para después seguir con la reacción de ligación.

A los 9.0 μ l de reacción que se tenían se les agregó 0.5 μ l del vector pJET 1.2 Blunt y 0.5 μ l de T4 DNA Ligasa. Se mezclaron bien todos los componentes de la reacción y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos. El contenido de los tubos se utilizó para transformar las bacterias competentes.

Los plásmidos pET15B(+)-E, pET15B(+)-DIII, AC5-STABLE2-Neo-E y AC5-STABLE2-Neo-E se mandaron a sintetizar con la empresa Synbio Technologies, NJ, USA.

El plásmido AC5-STABLE2-Neo se obtuvo como donación del Dr. Juan Ernesto Ludert, del Departamento de Infectómica y Patogénesis molecular del CINVESTAV, Zacatenco.

2.4 Transformación y PCR de colonia

A 100 μ l de bacterias competentes se les dejó reposar a 4 °C hasta que se descongelaran por completo, luego se les añadió 100 pg de plásmido y 100 μ l de solución KCM a 4 °C. Se mezclaron los reactivos y se incubó la mezcla en hielo por 10 minutos. Inmediatamente después, los tubos se incubaron a 42 °C por 1 minuto, en seguida se incubaron de nuevo en hielo durante dos minutos. Se les añadió 1 ml de medio LB a 37 °C y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación constante. Finalmente se tomó todo el contenido de los tubos para sembrarlo por plaqueo en placas LB con ampicilina, las cuales se incubaron toda la noche a 37 °C.

Al día siguiente se seleccionaron 17 candidatas al azar y se resembraron en placas de LB con ampicilina y se dejaron incubando toda la noche. Al siguiente día se picaron con una punta estéril, cada una de las 17 colonias y se llevó a cabo la PCR de colonia. Para esta reacción se utilizaron 0.5 μ l de polimerasa High Fidelity Taq Polymerase (JennaBioscience), 2.0 μ l de buffer 10X, 1.0 μ l de primer FWD, 1.0 μ l de primer REV, 0.5 μ l de dNTPs y 15.0 μ l de agua. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

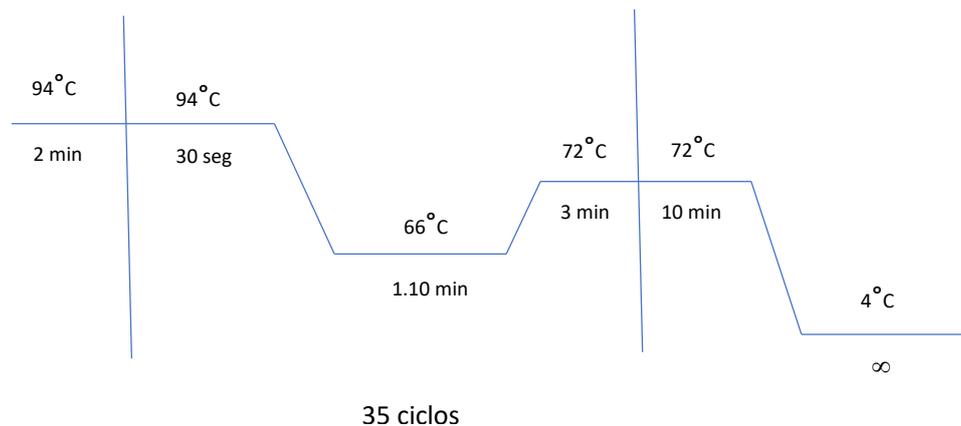


Figura 6. PCR de colonia, condiciones de reacción para amplificar fragmentos correspondientes a la proteína E.

2.5 Extracción de plásmidos y secuenciación

Las candidatas que en la PCR de colonia amplificaron el fragmento de 1500 pb se sembraron en 5 ml de LB con ampicilina y se dejaron incubando toda la noche a 37 °C con agitación constante. Al siguiente día, se separaron los cultivos en tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 13400 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. Los pellets obtenidos se suspendieron en 100 µl de solución GTE y se reposaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó a cada tubo 200 µl de NaOH/SDS y se mezclaron por inversión. Después se incubaron en hielo por 5 minutos para posteriormente añadir 150 µl de solución de acetato de potasio y se mezclaron de nuevo por inversión.

Se centrifugaron los tubos a 13000 rpm a 4 °C por 3 minutos, el sobrenadante se transfirió a tubos limpios a los que se les añadió 800 µl de etanol 95%, se reposaron los tubos por dos minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugaron a 13 400 rpm por 3 minutos, se removieron los sobrenadantes y el pellet se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugaron de nuevo. El etanol se decantó y se dejaron secar los pellets en el termoblock Multi-Blok heater Lab-line. Los pellets secos se resuspendieron en 30 µl de agua miliQ y se cuantificaron

los plásmidos usando el NanoDrop 2000. La integridad de los plásmidos se observó corriéndolos en un gel de agarosa 1.0%.

Se llevaron a cabo las reacciones de secuenciación de acuerdo con lo que se especifica en la tabla 4 y la Fig 7. Después de terminada la reacción, se purificó el producto con etanol y las muestras se llevaron a la unidad de secuenciación del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV Zacatenco.

Tabla 4. Componentes de la reacción de secuenciación para un volumen final de 20.0 μ l.

Reactivo	Volumen (μ l)
Big Dye	2.0
Buffer 5X	4.0
Primer (10 μM)	1.0
Betaína 5M	1.0
DMSO	1.0
DNA (1 μg)	1.3
Agua	9.7

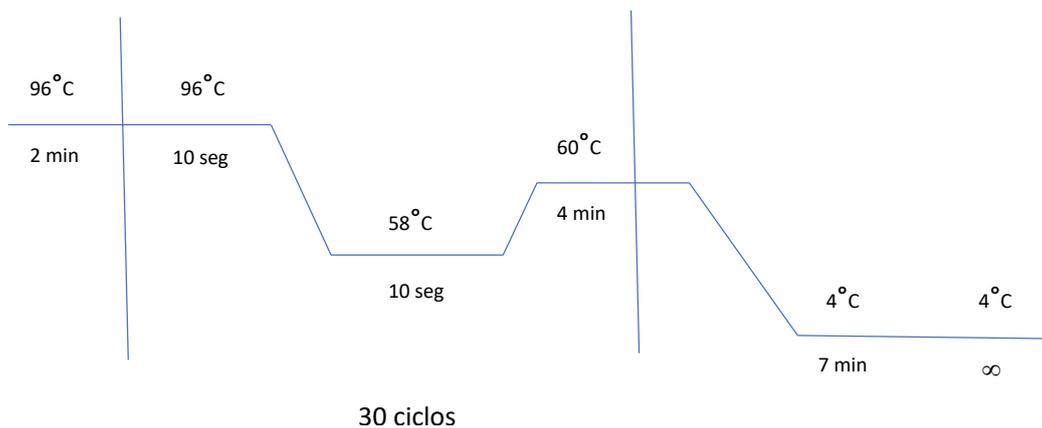


Figura 7. Condiciones para las reacciones de secuenciación establecidas en el termociclador SuperCycler Gradient de Kyratec.

2.6 Restricciones de Restricción

Se llevaron a cabo 5 diferentes reacciones de restricción. Para los plásmidos pJET1.2-E y AC5-STABLE2-Neo-E (NotI/EcoRV) se utilizaron las enzimas NotI y EcoRV. Para el plásmido pET15B(+)-E se utilizaron las enzimas NdeI y XhoI. Para el plásmido pET15B(+)-DIII se utilizaron las enzimas NdeI y BamHI. Para el plásmido AC5-STABLE2-Neo-DIII se usaron las enzimas XbaI y HindIII. La tabla 5 muestra las cantidades de reactivo necesarias para las dobles restricciones de los plásmidos, las enzimas 1 y 2 se sustituyen en cada caso por las enzimas correspondientes. Para el plásmido AC5-STABLE2-Neo-ProteinE se usaron las enzimas NdeI y NotI y se hizo una doble restricción en dos pasos, tabla 6.

Tabla 5. Cantidad de reactivo para las dobles restricciones de pJET1.2-E, pET15B(+)-E, pET15B(+)-DIII, AC5-STABLE2-Neo-E y AC5-STABLE2-Neo-DIII. Enzima 1: NdeI o XbaI. Enzima 2: BamHI o HindIII.

Reactivo	Volumen (μ l)
Buffer 10X	2.0
Enzima 1 (4 U)	1.0
Enzima 2 (4 U)	1.0
DNA (1-2 μg)	5.0
Agua	11.0
Total	20.0

Todas estas reacciones de restricción se llevaron a cabo a 37°C durante 1 hora y se desactivaron las enzimas calentando a 65°C durante 15 minutos.

Tabla 6. Cantidad de reactivo para la doble restricción de AC5-STABLE2-Neo-ProteinE, esta reacción se llevó a cabo en dos pasos.

Reactivo	Primer paso (μ l)	Segundo paso (μ l)
Buffer 10X	1.5	1.5
NdeI (6 U)	1.0	
NotI (6 U)		1.0
DNA (0.351 μg/μl)	5.0	
Agua	7.5	12.5
Total	15.0	30.0

La reacción de restricción en dos pasos se incubó con los componentes del primer paso a 37°C por 30 minutos, luego se añadieron los componentes del paso 2, se mezclaron bien en el tubo y se volvió a incubar a 37°C por media hora. La inactivación de las enzimas se hizo calentando a 65°C por 15 minutos.

Los productos de las reacciones de restricción se corrieron en geles de agarosa 1.5% usando el marcador de peso molecular 1 kb "Plus ready to use" de Fermentas.

2.7 Transfección

Para la transfección, se obtuvieron monocapas de células C6/36 al 80% de confluencia en placas de 24 pozos. En un tubo, por cada pozo, se hizo la mezcla A, mezclando 123.0 μ l de medio MEM (GIBCO) sin suero y sin antibióticos, 1.0 μ l de reactivo Plus y 1-2 μ l de DNA. En seguida se preparó en otros tubos diferentes la mezcla B (1 tubo por cada tubo de mezcla A), con 123 μ l de medio MEM sin suero y sin antibiótico y 2 μ l de lipofectamina. Ambas mezclas se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo se hicieron los lavados (2) de cada uno de los pozos con 0.5 ml de PBS a 28°C, después de los lavados se dejaron las células en 0.5 ml de medio MEM sin suero y sin antibióticos.

Se mezclaron A y B en un tubo y se dejaron reposar 30 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se extrajo el medio de cada uno de los pozos y se agregó por goteo la mezcla A+B. Las placas se dejaron incubando a 28°C durante 5 horas, después se añadieron 1.250 ml de medio MEM con suero al 20% a cada uno de los pozos, por goteo, y se dejaron incubar por 24, 48 y 72 h. Para el control positivo se transfecto con el plásmido de expresión vacío.

2.8 Mutagénesis sitio dirigida

Para eliminar las señales de paro en la secuencia de la proteína E, se llevaron a cabo 2 reacciones de mutagénesis. Las condiciones para estas reacciones fueron las siguientes:

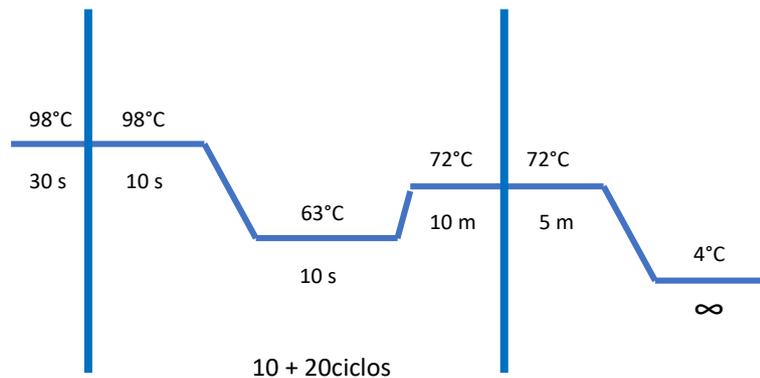


Figura 8. Condiciones para las reacciones de mutagénesis.

Tabla 7. Componentes de las reacciones de mutagénesis sitio dirigida. Se preparan al mismo tiempo las reacciones R1 y R2, en tubos diferentes. El DNA utilizado fue el de la construcción AC5-STABLE2-Neo-E y para la segunda mutación el DNA proveniente de la transformación con la primera mutación.

Componente	[R1] (μ l)	[R2] (μ l)
Buffer SuperFi 5X	2.0	2.0
dNTP mix (10 mM)	0.3	0.3
primer Forward (10 μ M)	0.5	-----
primer Reverse (10 μ M)	-----	0.5
Platinum SuperFi DNA polimerasa	0.1	0.1
enhancer SuperFi GC5X	2.0	2.0
DNA (0.351 μ g/ μ l)	0.5	0.5
Agua	4.6	4.6
Volumen final.	10.0	10.0

Una vez que se llevaron a cabo los 10 ciclos iniciales de la reacción, se mezclaron R1 y R2 en un mismo tubo y se siguió con los otros 20 ciclos para completar 30 ciclos al final. Una vez que la reacción se terminó, se agregaron a cada tubo 1 μ l de enzima DpnI y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se utilizaron 5 μ l de esta reacción para transformar células competentes.

Los primers utilizados para estas reacciones de mutagénesis fueron los siguientes:

Tabla 8. Primers diseñados para la primera mutagénesis en donde se buscó cambiar una T por una G, se muestra en color rojo el nucleótido que se cambió en la secuencia.

Primer	Secuencia	Tm (°C)
FWD	5'GCGTTGCATAGGAATATCAAATAGAGAC3'	55.0
REV	5'CTATTTGATATTCCTATGCAACGCATATGATG3'	53.0

Tabla 9. Primers diseñados para la segunda mutagénesis en donde se buscó cambiar los nucleótidos TA por G, se muestra en color rojo los nucleótidos que se cambiaron en la secuencia.

Primer	Secuencia	Tm (°C)
FWD	5' CGGATATCTCGGAGCCACCATGGTGAGCAAGG3'	61.0
REV	5' CCATGGTGGCTCCGAGATATCCGGCCTGCAC3'	63.0

2.9 Fluorescencias y obtención de proteínas de C6/36 y *E.coli* BL21

Las placas utilizadas para la transfección se observaron al microscopio de fluorescencia 24, 48 y 72 h después de la transfección. Inmediatamente después se obtuvieron las proteínas de C6/36 como se ha descrito previamente (Muñoz et al., 2013).

Para obtener las proteínas de *E.coli*, primero se llevó a cabo la inducción con IPTG de una de las candidatas con pET15B(+)-E, la cual se inoculó en 5 ml de medio LB (NaCl, 10 g/L Triptona, 10 g/L y extracto de levadura, 5 g/L) con ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante. Al día siguiente se tomaron 500 µl de este cultivo para inocular 49.5 ml de medio LB con ampicilina, de este cultivo se separaron 3 matraces con 16 ml de muestra cada uno. Uno de ellos fue la muestra sin inducir, a otro de los matraces se le agregó IPTG hasta una concentración de 0.5mM y al tercer matraz se le agregó IPTG hasta una concentración de 1.0 mM. Estos cultivos se incubaron a 16°C con agitación constante toda la noche.

Al día siguiente se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 12000 x g a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó 2 veces con 1 ml de PBS. Finalmente, el pellet fue suspendido en 5 ml de buffer de lisis. Se centrifugaron de nuevo las muestras a 12000 x g durante 25 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó hasta su uso.

2.10 Western Blot

Se corrieron las muestras de proteínas en geles de poliacrilamida al 15% y 12%. En cada pozo se cargaron 15 μ l de muestra. Los geles se corrieron primero a voltaje constante de 80 por 15 minutos y después a voltaje constante de 120 por 75 minutos. Una parte de los geles se tiñó con azul de coomasie para ver el patrón de las bandas; la otra parte se transfirió a membranas de nitrocelulosa a un amperaje constante de 250 mA durante 1 hora. Las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau para comprobar la eficiencia de la transferencia. Luego se lavaron las membranas con TBST hasta que quedaron completamente blancas. Después se bloquearon con una solución de leche 5% durante hora y media. Se lavaron las membranas con TBST tres veces, cada una por 5 minutos.

Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario, monoclonal de ratón, 6X His tag antibody [GT359] de GeneTex (1:500, 1:1000, 1:5000) durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día se lavaron las membranas 3 veces con TBST, cada una por 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal de conejo anti-Mouse IgG (AP) GTX26729 de GeneTex (1:2500) y 5% de leche durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se lavaron las membranas con TBST y se revelaron usando el Kit de quimioluminiscencia de Promega, la reacción se desarrolló por 20 minutos.

3. Resultados

3.1 Amplificación de cDNA y ligación en pJET1.2Blunt

Después de extraer el RNA viral, se llevaron a cabo dos reacciones de RT-PCR utilizando primers específicos (Tabla 3) para amplificar la secuencia correspondiente a la proteína E de DENV-2 variando la concentración de RNA utilizada en cada caso. Para la muestra 1 se tomaron 1.2 μg de RNA, mientras que para la muestra 2 se tomaron 0.7 μg de RNA, se siguieron las especificaciones descritas en la sección 2.2 de este trabajo. Los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1.0% Fig. 9A, con una flecha se marcan los amplificados obtenidos con el peso molecular esperado correspondiente a la proteína E de DENV-2, de 1500 pb.

Las bandas de los amplificados se purificaron y se ligaron en el vector pJET1.2 Blunt para obtener la construcción pJET-E (Fig 9B). De esta reacción se utilizaron 5 μl para transformar las células competentes. Después de incubarlas por 16 horas, se seleccionaron al azar 17 candidatas y se resembraron para hacer la PCR de colonia utilizando los primers del kit CloneJET.

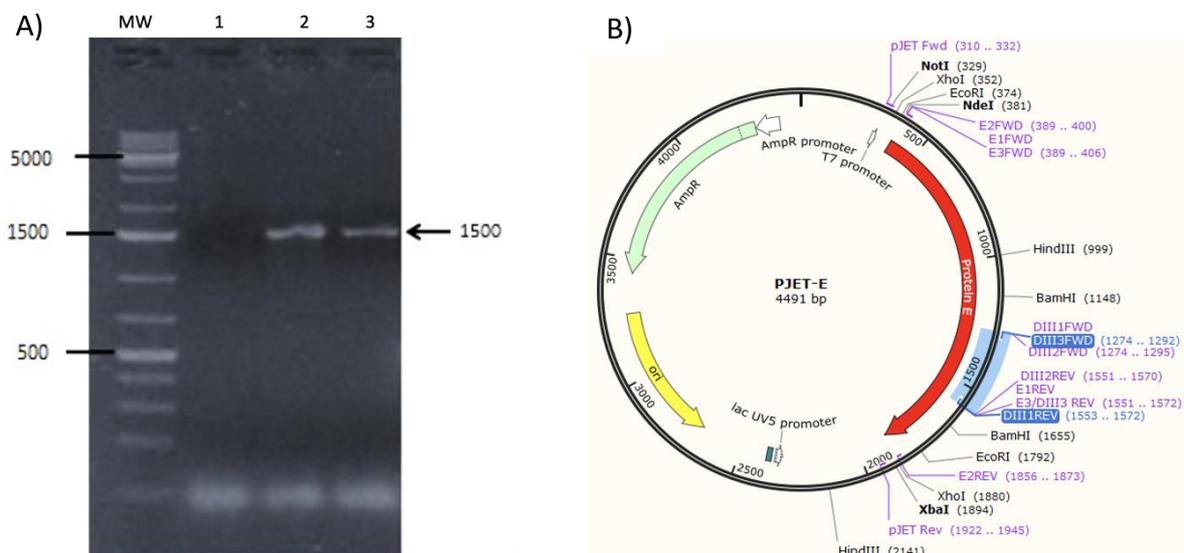


Figura 9. Amplificado de cDNA correspondiente a la proteína E. A) Bandas de los amplificados correspondientes a la proteína E (1500 pb). B) Mapa de la construcción pJET-E.

3.2 Transformaciones, secuenciaciones y restricciones con NotI y EcoRV

Los productos de estas reacciones se corrieron en geles de agarosa al 1.0% y se observó claramente la presencia de fragmentos liberados (Fig 10A y 10B) con un tamaño de 1500 pb correspondientes a la proteína E en las candidatas S2, S6 y S11. Para la candidata S8 se observa una banda tenue muy cercana a los 1500 pb, por lo que también se seleccionó para comprobar la presencia de la secuencia de nucleótidos de la proteína E mediante la doble restricción y secuenciación.

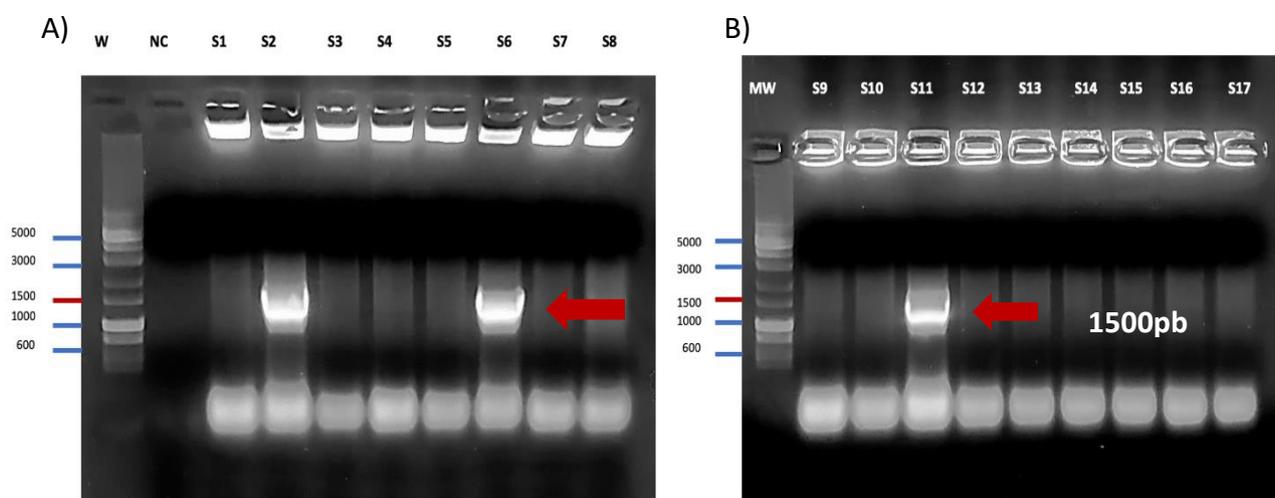


Fig 10. PCR de colonia para amplificar la banda correspondiente a la proteína E a partir de las candidatas transformadas con las construcciones pJET-E.

Se llevaron a cabo reacciones de secuenciación del inicio y fin de los insertos en pJET-E para comprobar que contenían los sitios de restricción para las enzimas NotI y EcoRV (Fig. 11).

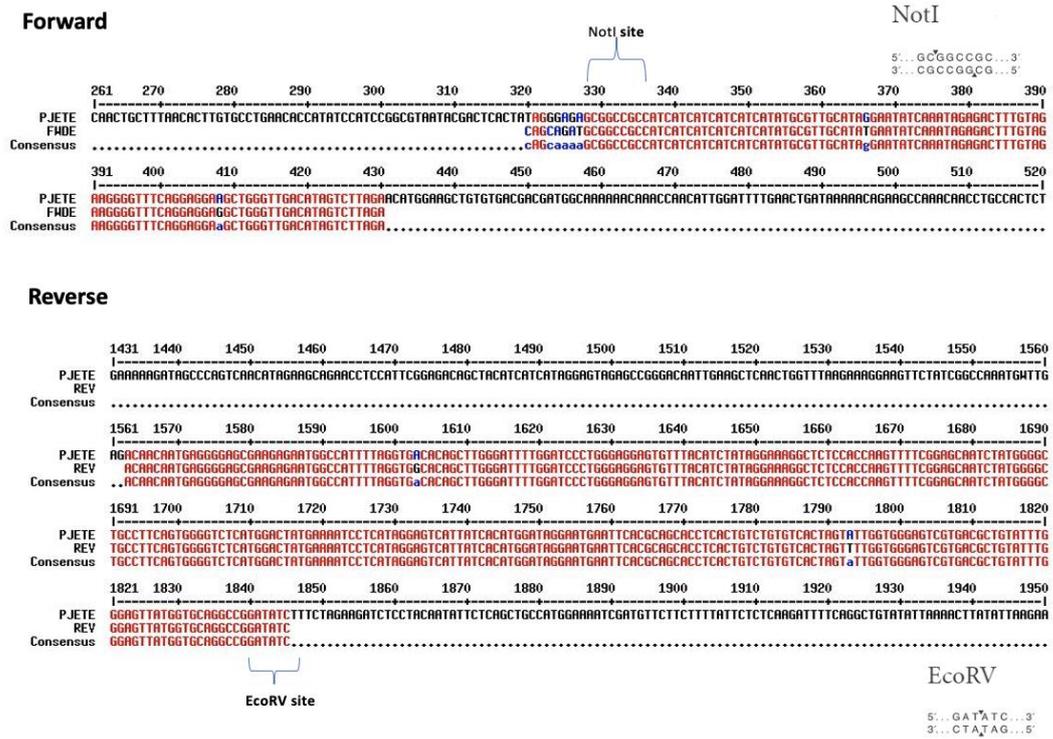


Fig 11. Ejemplo de las secuencias obtenidas en las que se comprueba que los insertos tienen los sitios de restricción EcoRV y NotI. Esta secuenciación es la correspondiente a la candidata S2.

Las secuencias de las candidatas S6 y S11 también demostraron la presencia de estos sitios de restricción. En el caso de la candidata S8, estos sitios de restricción no estuvieron presentes. Estos resultados fueron comprobados al hacer la doble restricción, como se observa, únicamente la candidata S8 no liberó el fragmento de 1500 pb (Fig 12).

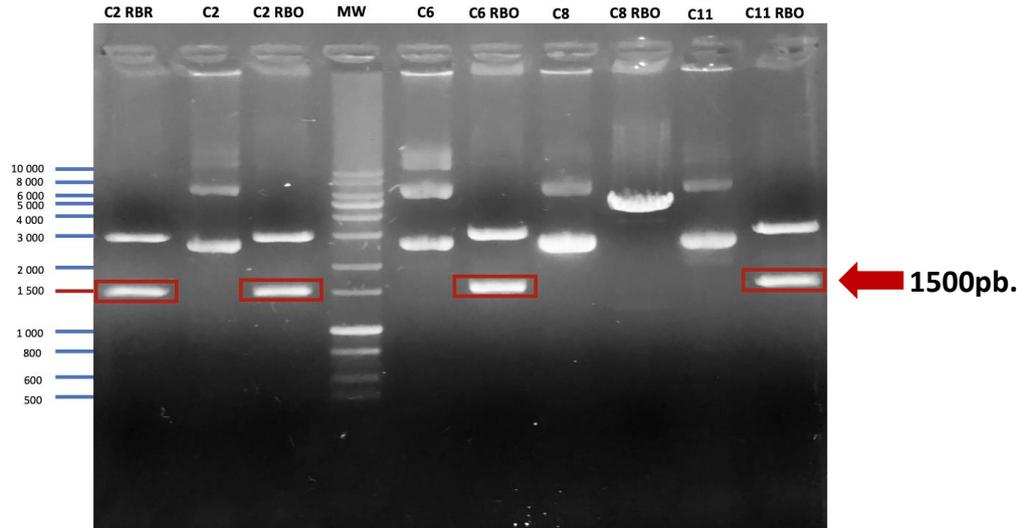


Figura 12. Dobles restricciones con las enzimas NotI y EcoRV.

Una vez comprobado que se tenían los insertos esperados en la construcción pJET-E se procedió a hacer la doble restricción del vector de expresión en insectos (AC5-STABLE2-Neo) el cual se observa en la Fig 13. donde se pueden ver las principales características de este vector.

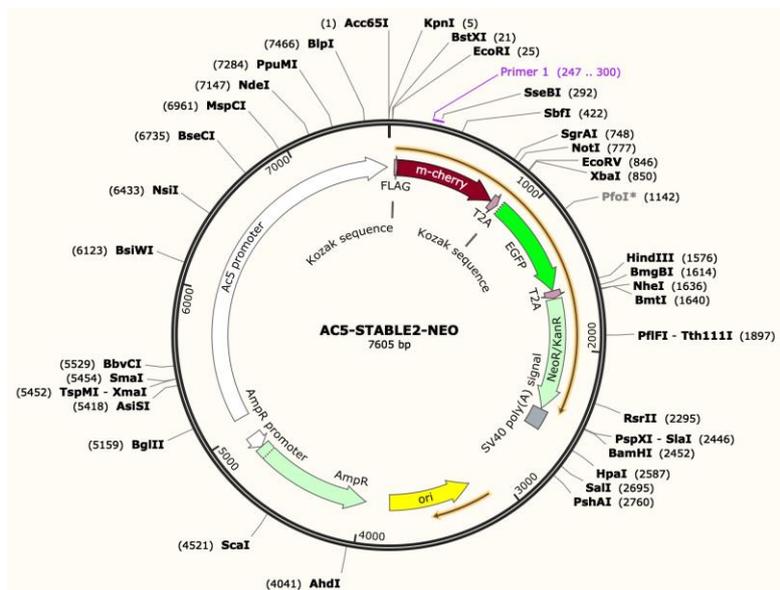


Fig 13. Vector de Expresión en insectos. Contiene el promotor Ac5 que es específico para insecto. Tiene además fluorescencia roja conferida por la proteína m-Cherry y fluorescencia verde conferida por la proteína EGFP. Tiene un cassette de resistencia a neomicina el cual

permite seleccionar las células transfectadas utilizando geneticina (G418). Como se observa también contiene los sitios de restricción NotI y EcoRV.

El inserto de la secuencia correspondiente a la proteína E debería quedar entre la proteína m-Cherry y la EGFP para que se pudiera comprobar que se estaba expresando la proteína E al observar ambas fluorescencias, además de que esto iba a permitir que se pudieran seleccionar las células con geneticina para después hacer la sobreexpresión de la proteína E.

Se hizo la doble restricción del plásmido Ac5-STABLE2-Neo y de pJET1.2-E para obtener bandas bien definidas para la hacer la ligación y obtener la construcción Ac5-STABLE2-Neo-E (Fig 14).

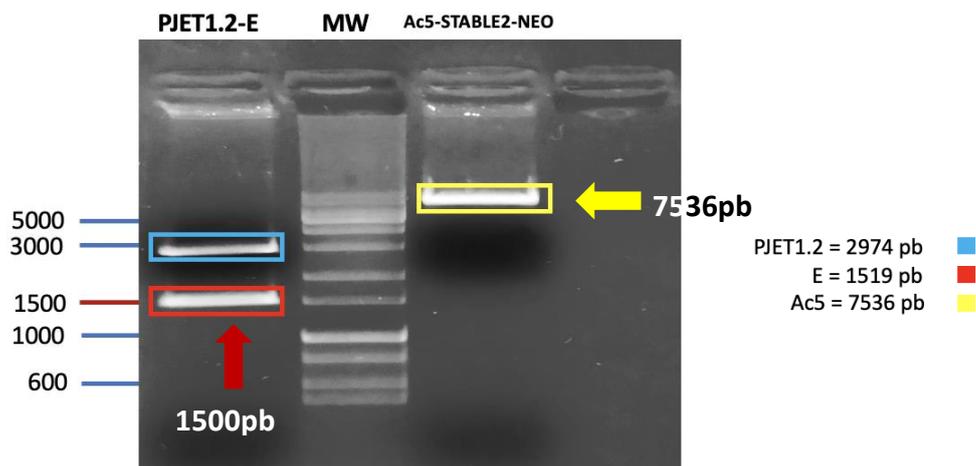


Fig 14. Doble restricción de pJET1.2-E y Ac5-STABLE2-Neo. Las dobles restricciones se hicieron con las enzimas NotI y EcoRV. Los fragmentos de interés, de 1500 pb (en color rojo) y 7536 pb (en color amarillo) se utilizaron para hacer la ligación y obtener la construcción Ac5-STABLE2-Neo-E.

Se utilizaron 5 μ l del producto de la reacción de ligación para transformar células competentes. De esta transformación se seleccionaron 14 candidatas al azar para hacer una PCR de colonia y comprobar que estaba presente el inserto correspondiente a la proteína E (Fig 15A). Únicamente las candidatas AE3, AE7 y AE10 tuvieron un amplificado con un tamaño de 1500 pb.

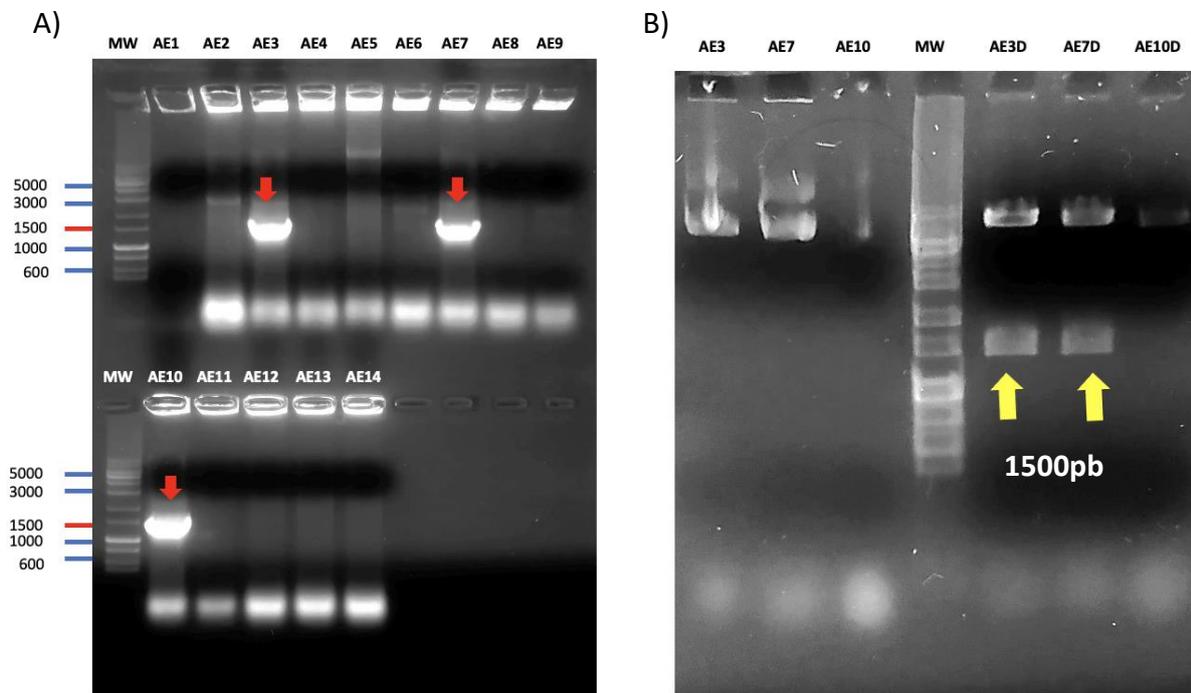


Figura 15. PCR de colonia y doble restricción de Ac5-STABLE2-Neo-E. A) PCR de colonia. Se utilizaron los primers específicos descritos en la tabla 3 para amplificar los insertos. Tamaño esperado = 1500 pb. B) La doble restricción con NotI y EcoRV se hizo con los plásmidos de las tres candidatas que si mostraron un amplificado en la PCR de colonia. En los carriles del 1-3 (AE3, AE7 y AE10) se encuentran los plásmidos sin restringir. En los carriles del 5-7 (AE3D, AE7D y AE10D) se observan los insertos liberados después de hacer la doble restricción y en el carril 4 está el marcador de peso molecular.

Al hacer la doble restricción, solo en las candidatas AE3D y AE7D (carriles 5 y 6) se liberaron el fragmento esperado, por lo que se utilizaron estos dos plásmidos para hacer las transfecciones de C6/36 (fig. 15B).

3.3 Transfección de C6/36 con Ac5-STABLE2-Neo-E y mutagénesis.

Para las transfecciones se utilizó al plásmido vacío como control positivo. A las 24 h post transfección, las células transfectadas con las muestras A3 y A7 se observaron con un microscopio de fluorescencia y aún no presentaban fluorescencia de ningún color a diferencia del control positivo que si presentaba la fluorescencia roja y la fluorescencia verde (imagen no mostrada). A las 48 h post transfección, el control positivo seguía teniendo las dos fluorescencias claramente identificables y para ambas muestras se observaba únicamente la fluorescencia roja (Fig 16B). Este mismo resultado se mantuvo hasta las 72 h post transfección (imagen no mostrada)

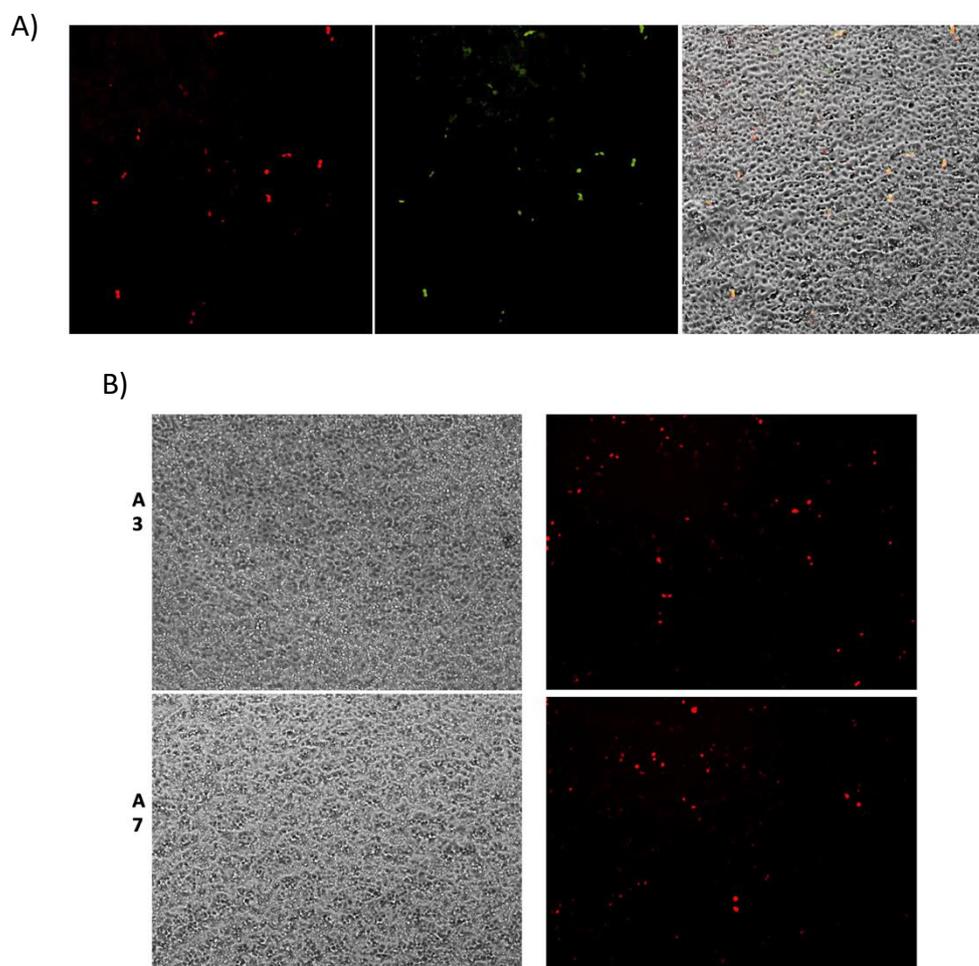


Fig 16. Fluorescencias detectadas 48 h post transfección. A) Transfección de C6/36 con el plásmido vacío (control positivo). B) Transfección de C6/36 con las muestras A3 y A7 en donde solo se observa fluorescencia roja.

Al ser un resultado no esperado, lo que se hizo después fue secuenciar todo el fragmento correspondiente a la proteína E para ver si el problema estaba en la secuencia. Se obtuvo la secuencia de nucleótidos correspondiente (ambas secuencias fueron iguales) (Fig 17A).

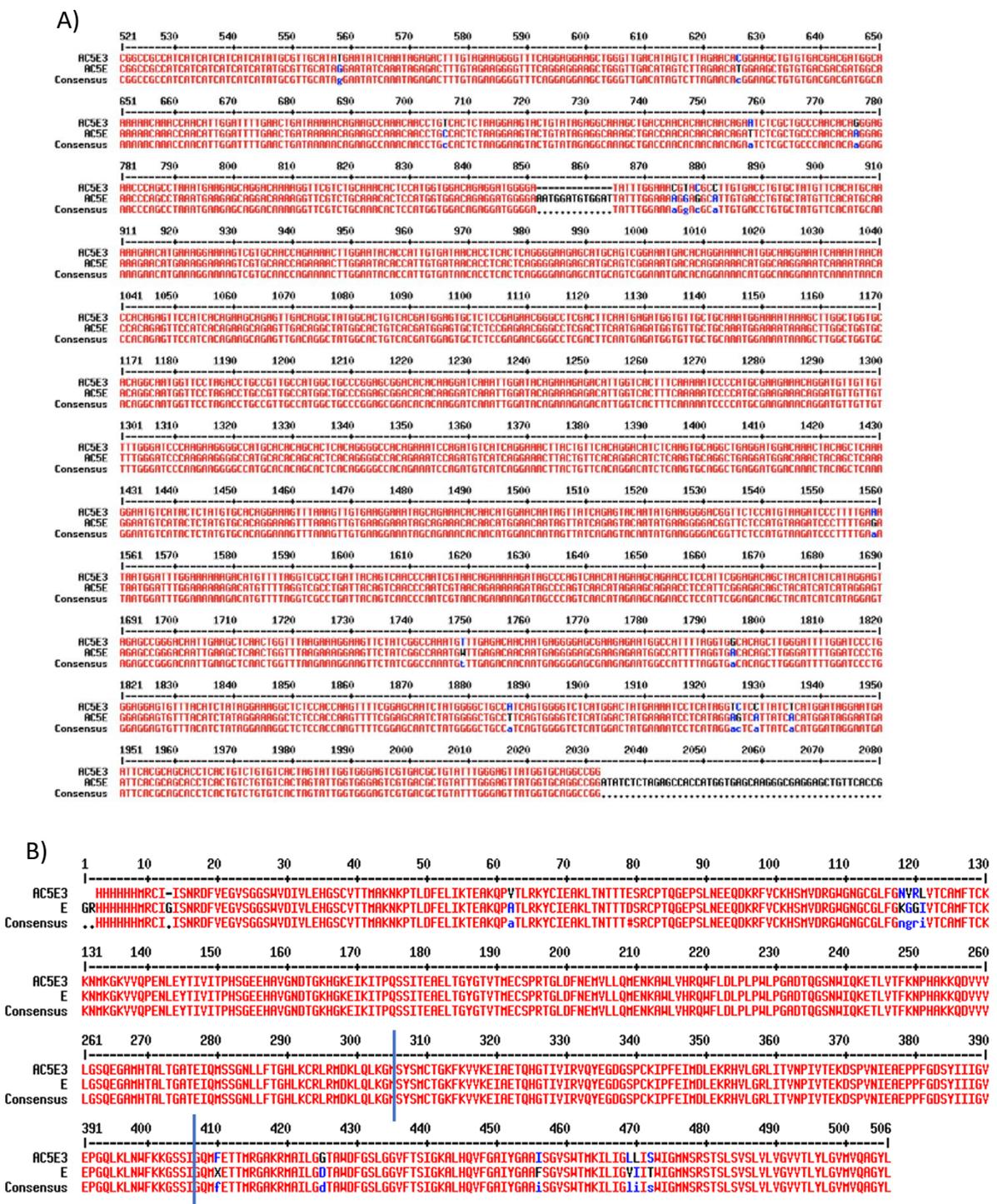


Fig 16. Secuenciación de la muestra A3. A) Secuencia de nucleótidos donde se pueden apreciar algunos cambios de bases a lo largo de la secuencia. B) Secuencia de aminoácidos en

donde se observan los cambios de aminoácidos en la secuencia de la proteína. Para la muestra A7 se obtuvo una secuencia de nucleótidos exactamente igual a la de A3 y por lo consiguiente la secuencia de aminoácidos fue también la misma. La parte de la secuencia delimitada por las líneas azules es la correspondiente al DIII.

Como se observa en la fig 16B, al inicio de la secuencia aminoacídica hay una señal de paro, lo que coincide con el hecho de que solo se observara la fluorescencia roja ya que únicamente se estaba expresando la proteína m-Cherry y no la proteína E, ni la EGFP. Con el fin de eliminar esta señal de paro, se diseñaron los primers para hacer una mutagénesis (Fig 17A). Con estos primers se buscó cambiar una T por una G, este cambio lograría que la secuencia final en vez de tener una señal de paro tuviera una glicina.

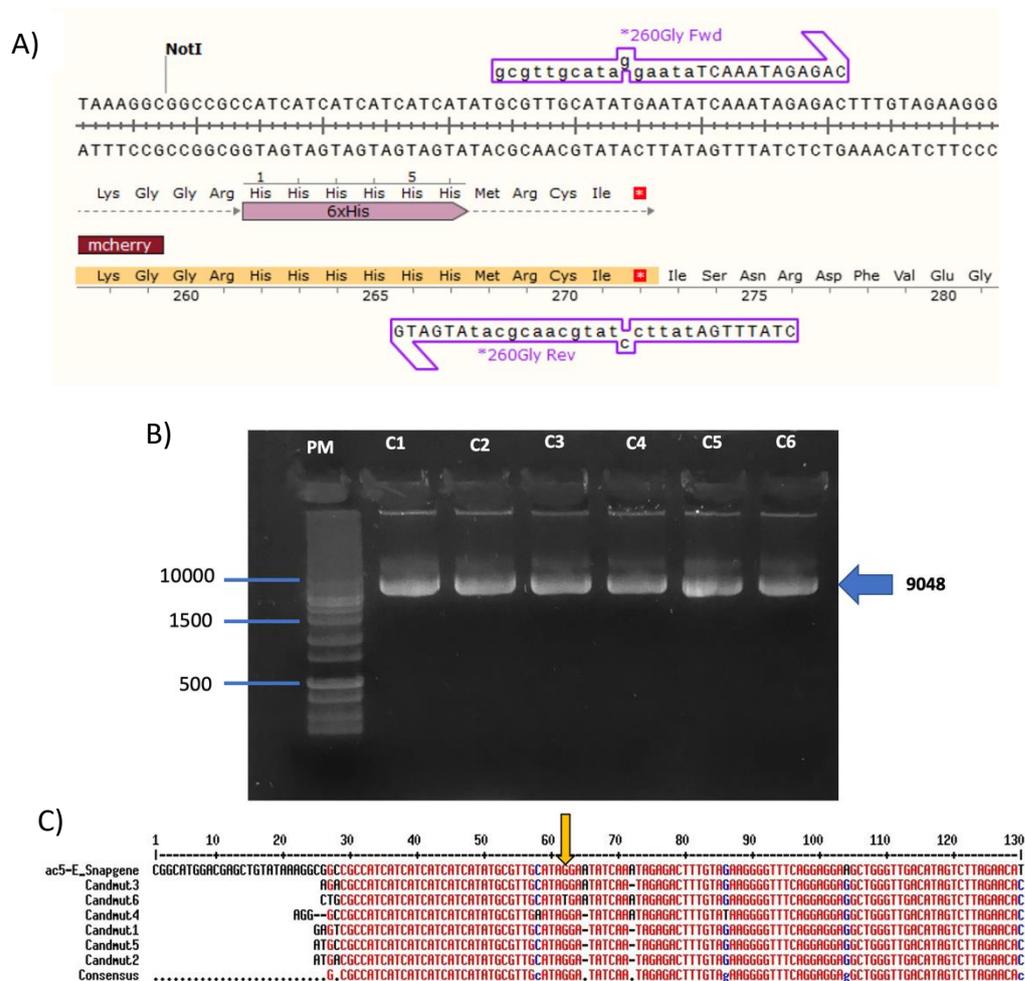


Fig 17. Mutagénesis dirigida. A) Secuencia de primers diseñados para eliminar la señal de paro en la secuencia aminoacídica. Se muestra también el sitio en la secuencia donde está presente esta señal. B) Plásmidos mutados purificados, todos tienen el tamaño de 9048 pb esperado.

C) Alineamiento de las secuencias de las 6 candidatas mutadas obtenidas (solo se muestra el sitio correspondiente a la mutación, marcado con una flecha amarilla).

Luego de hacer la reacción de mutagénesis, con esta reacción se transformaron células competentes y se obtuvieron 6 candidatas a las cuáles se les extrajeron los plásmidos. Estos plásmidos se secuenciaron y se hicieron los alineamientos. Como se aprecia en la fig 17C, únicamente la candidata 6 no presentó el cambio de nucleótido deseado, esta candidata se utilizó después como control negativo para la siguiente transfección, mientras que se seleccionó a la candidata 3 para probarla.

En la figura se observan las fluorescencias, 48 h post transfección y de nuevo para la muestra AC5EC3 M1, se observó solo la fluorescencia roja (Fig 18), motivo por el que se revisaron a fondo las secuencias completas tanto de nucleótidos como de aminoácidos y se observó que al final de la secuencia de la proteína E había otra señal de paro justo antes del inicio de la secuencia de la EGFP, por lo que se diseñó un segundo juego de primers para hacer una segunda mutagénesis (Fig 19).

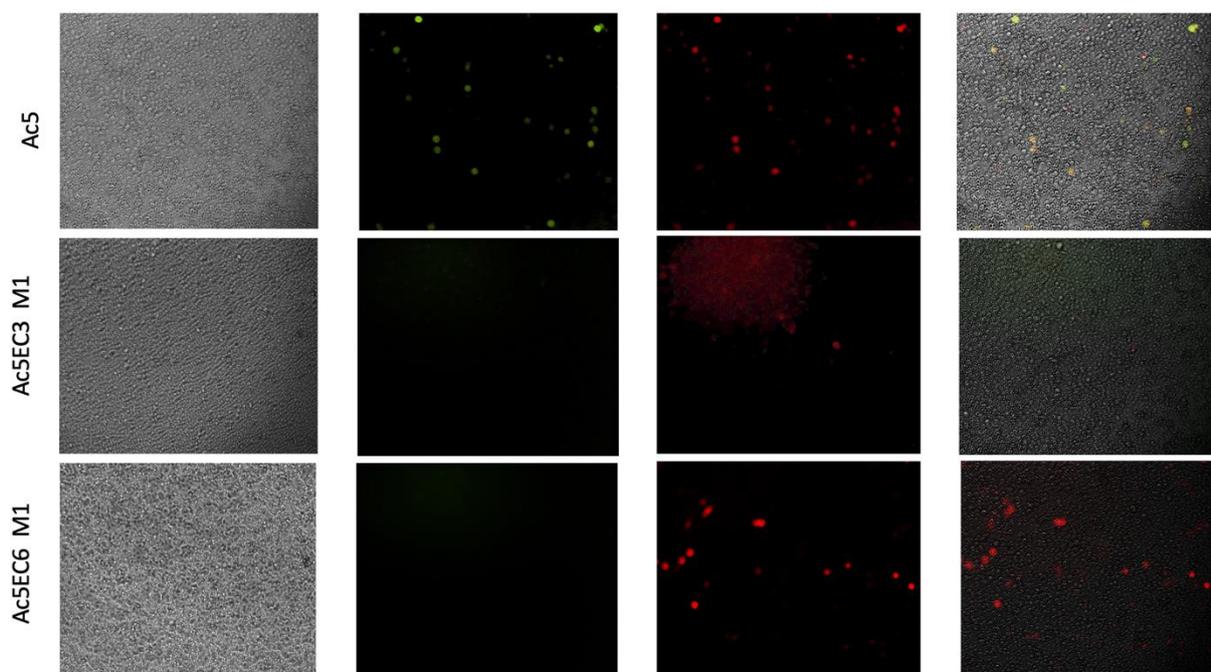


Figura 18. Fluorescencia detectada en C6/36, 48 horas post transfección. Los paneles superiores corresponden al control positivo. Los paneles de en medio corresponden a la

muestra en la que si fue exitosa la mutación. Los paneles de abajo corresponden a la única muestra que no fue mutada con éxito y que se está usando como control negativo.

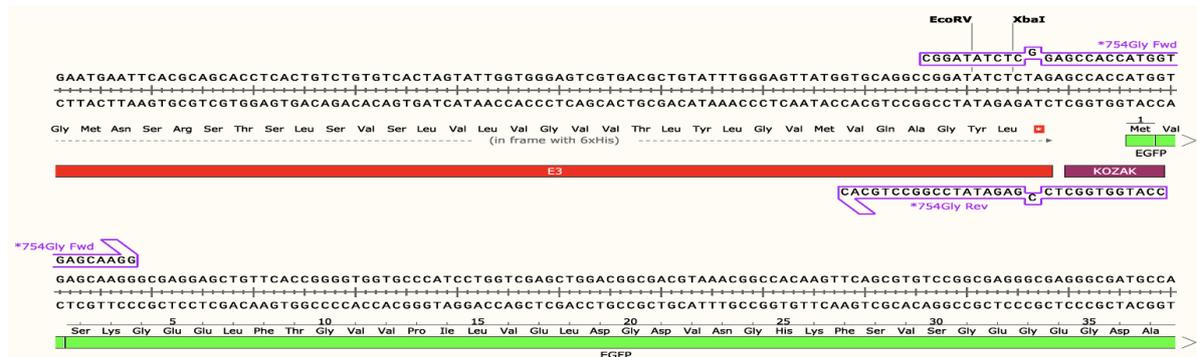
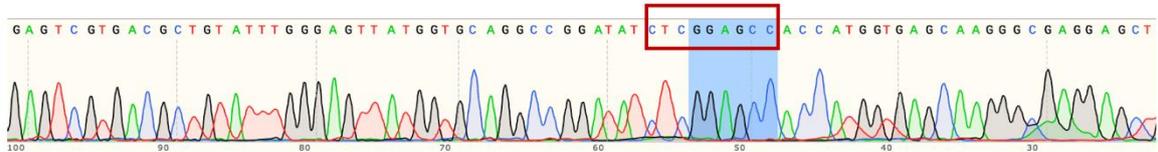


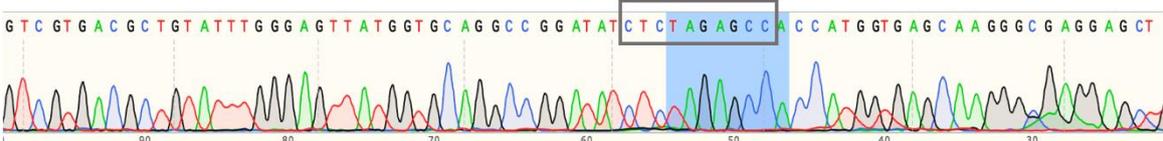
Figura 19. Primers diseñados para la segunda mutación. Se puede observar la zona donde se encuentra la señal de paro justo antes de que empiece la secuencia de la EGFP. Para esta segunda mutación lo que se buscó fue cambiar los nucleótidos TA por una G, este cambio produciría una glicina en la secuencia aminoacídica.

Se llevó a cabo la segunda mutagénesis en el plásmido AC5EC3M1 y se realizó la transformación de bacterias competentes con el producto de esta mutagénesis. Se seleccionaron 6 candidatas al azar, las cuáles se identificaron añadiendo al nombre de la muestra el distintivo M2 (de mutación 2) y el número de candidata al final del nombre. Los plásmidos purificados de estas candidatas fueron secuenciados. En la figura 20, se muestran los electroferogramas obtenidos de estas secuenciaciones, específicamente de las regiones en donde se hizo la mutación.

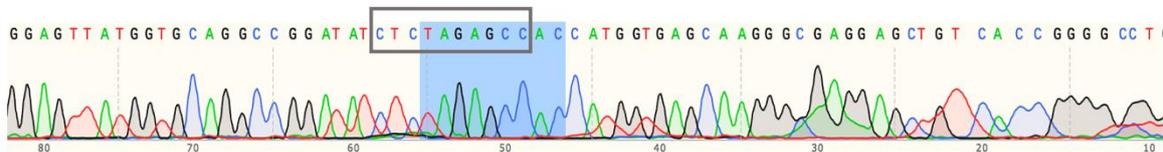
Ac5EC3M1M2-1



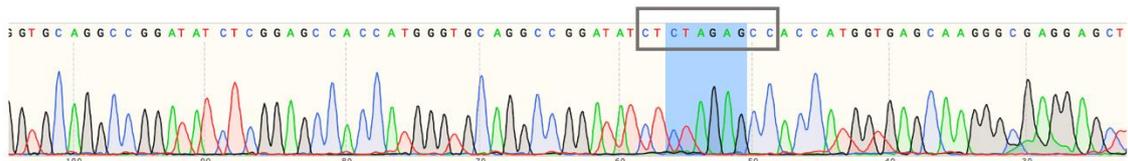
Ac5EC3M1M2-13



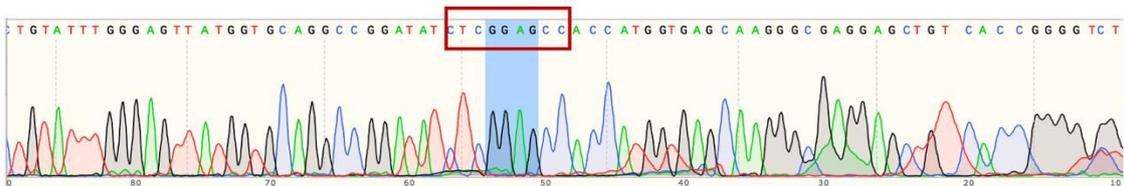
Ac5EC3M1M2-25



Ac5EC4M1M2-9



Ac5EC4M1M2-33



Ac5EC4M1M2-34

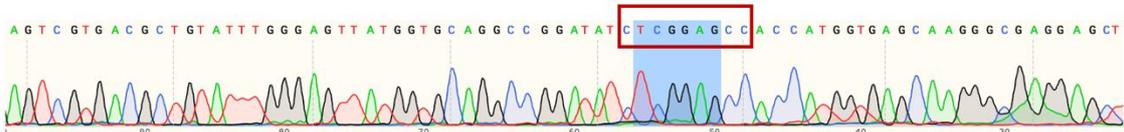


Figura 20. Electroferogramas de las secuenciaciones de las candidatas obtenidas luego de la segunda mutagénesis. En los recuadros se marca la zona en donde se esperaba encontrar la mutación. Los recuadros rojos se utilizaron para resaltar aquellas candidatas en las que si se lograron las mutaciones con éxito, mientras que los recuadros grises marcan aquellas candidatas que no tuvieron la mutación deseada. Mutación esperada: cambio de TA por G.

Se utilizó el plásmido extraído de la candidata Ac5EC3 M1M2-1 para la transfección de las células C6/36. Estas se observaron con el microscopio de fluorescencia a las 48 y 72 horas post transfección y se comprobó que había presencia de fluorescencia roja y verde (fig 21A).

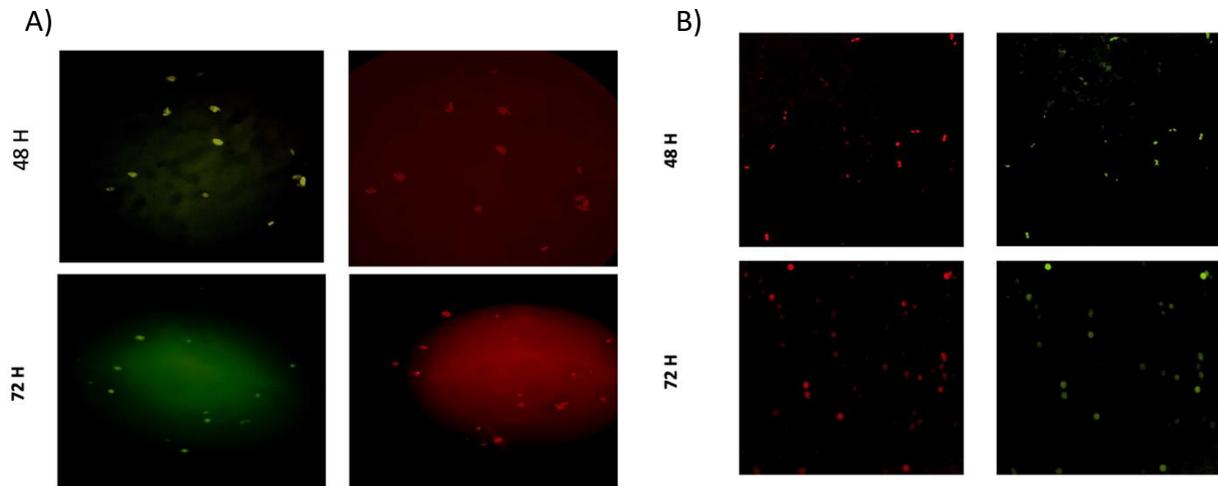


Figura 21. Fluorescencias 48 y 72 h post transfección. A) C6/36 transfectadas con Ac5EC3 M1M2-1. B) Control positivo de la transfección, Ac5-STABLE2-Neo vacío.

Al observar la fluorescencia verde y roja de la muestra con las dos mutaciones, se comprobó que las dos mutagénesis fueron exitosas y que la proteína E se está traduciendo en conjunto con las proteínas m-Cherry y EGFP. El cassette de resistencia a geneticina está en marco con las proteínas fluorescentes, por lo que al expresarse las proteínas también puede procederse con la selección con el antibiótico.

3.4 Caracterización de pET15B-E

Las construcciones pET15B-E (fig 22A), pET15B-DIII (fig 24A), Ac5-STABLE2-Neo-ProteinE (fig 26A) y Ac5-STABLE2-Neo-DIII (fig 27A), se mandaron a sintetizar con la empresa Synbio Technologies.

Con pET15B-E (fig 22A), se transformaron bacterias competentes y se obtuvo un gran número de candidatas (fig 22B), de las cuales se seleccionaron 8 al azar para extraer y purificar sus plásmidos. Estos plásmidos fueron observados en un gel de agarosa 1.5% para observar su integridad y tamaño (fig 22C). Posteriormente se llevó a cabo la doble restricción con las enzimas NdeI y XhoI y se observó la liberación del fragmento de 1500 pb en todas las candidatas (fig 22D).

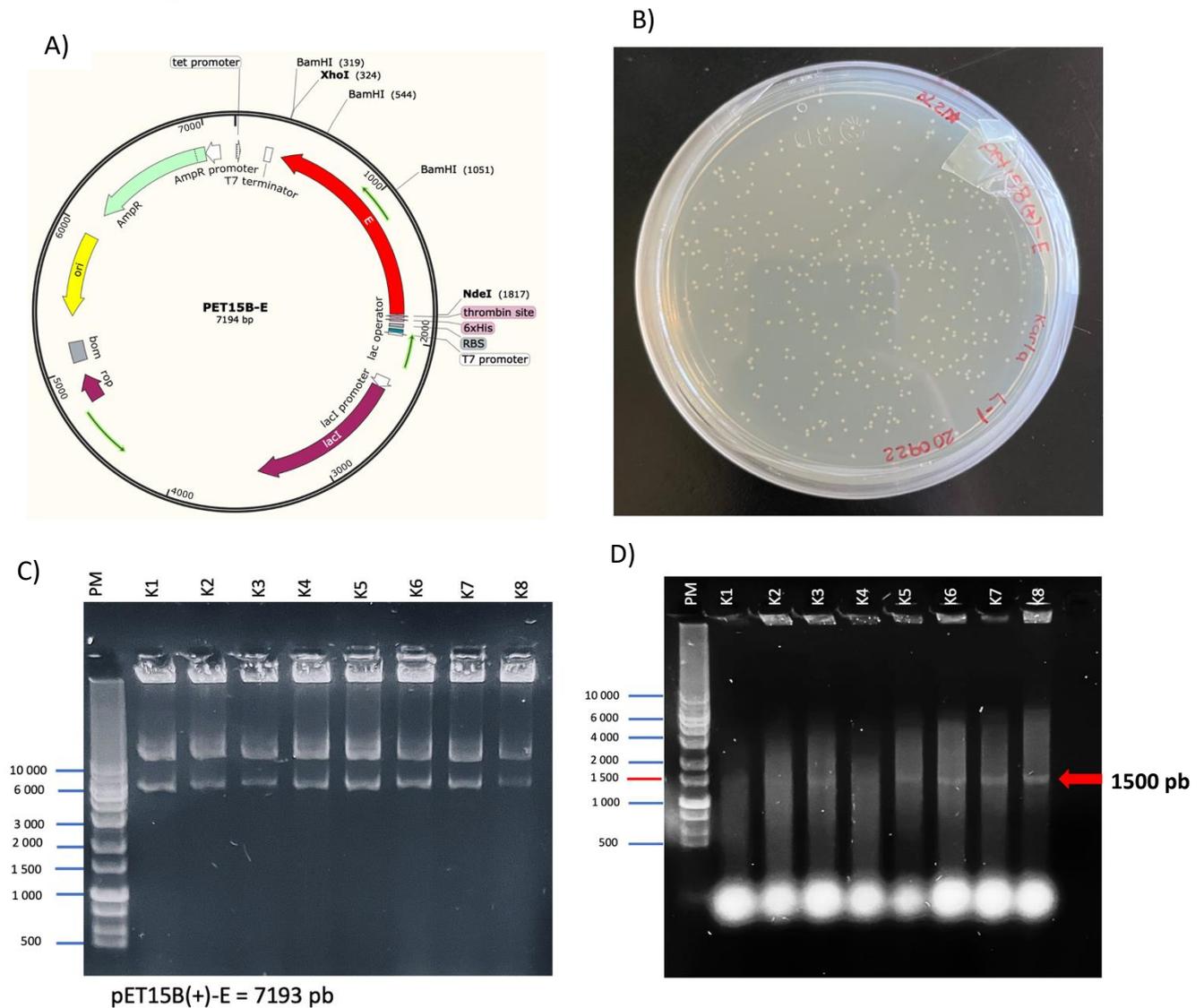


Figura 22. Caracterización de pET15B-E. A) Mapa del plásmido pET15B-E. Se observan los sitios de restricción para NdeI y XhoI y el tag de Histidinas. Se trata de un plásmido inducible con IPTG y que confiere resistencia a ampicilina. B) Candidatas obtenidas después de la transformación de *E. coli* BL21 competentes. C) Plásmidos purificados de las 8 candidatas seleccionadas al azar, todos ellos tienen el tamaño esperado de 7193 pb. D) Doble restricción

con NdeI y XhoI. Con la flecha roja se marca el fragmento de 1500 pb liberado por todas las candidatas.

Una vez caracterizado el plásmido, se llevó a cabo la inducción con IPTG como se especifica en la sección 2.9 de este trabajo. Se obtuvo el lisado de proteínas de las bacterias inducidas y se corrieron las muestras por SDS-PAGE 12%, se hizo la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios y el revelado de las membranas. En la figura 23 se observa aparición de una banda difusa de 55 kDa, correspondiente a la proteína E, en la muestra inducida con IPTG 0.5 mM, en la muestra inducida con IPTG 1.0 mM se observa más claramente esta banda, la cual no es observada cuando no hay inducción con IPTG.

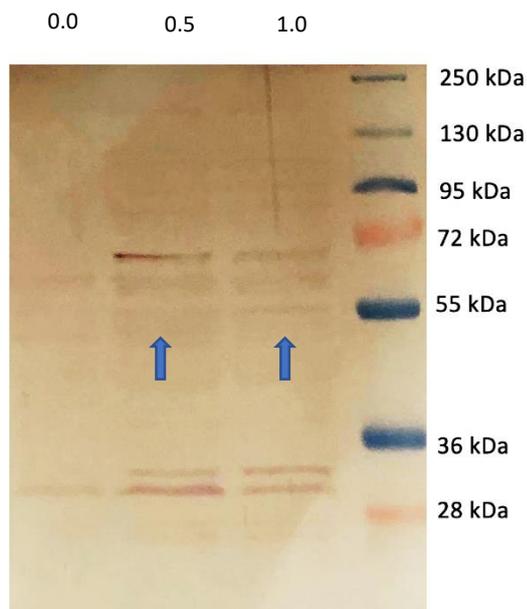


Figura 23. Western Blot de las muestras inducidas con IPTG. Las muestras fueron inducidas toda la noche a 16°C con concentraciones variables de IPTG. Se utilizó el anticuerpo primario, monoclonal de ratón, 6X His tag antibody [GT359] de GeneTex (1:500) y el anticuerpo secundario policlonal de conejo, anti-Mouse IgG (AP) GTX26729 de GeneTex (1:5000).

3.5 Caracterización de Ac5-STABLE2-Neo-ProteinE

Una vez caracterizado el plásmido de expresión en bacteria y comprobado la presencia de la proteína E inducible, se procedió a hacer la caracterización del plásmido Ac5-STABLE2-Neo-ProteinE (fig 24A). Se transformaron *E. coli* DH5 α competentes y de las colonias obtenidas (fig 24B) se seleccionaron 5 candidatas al azar. De las cuales se purificaron sus plásmidos y se les hicieron dobles restricciones con las enzimas *Nde*I y *Not*I (fig 24C). Cuatro de las cinco candidatas liberaron el fragmento de 1500 pb.

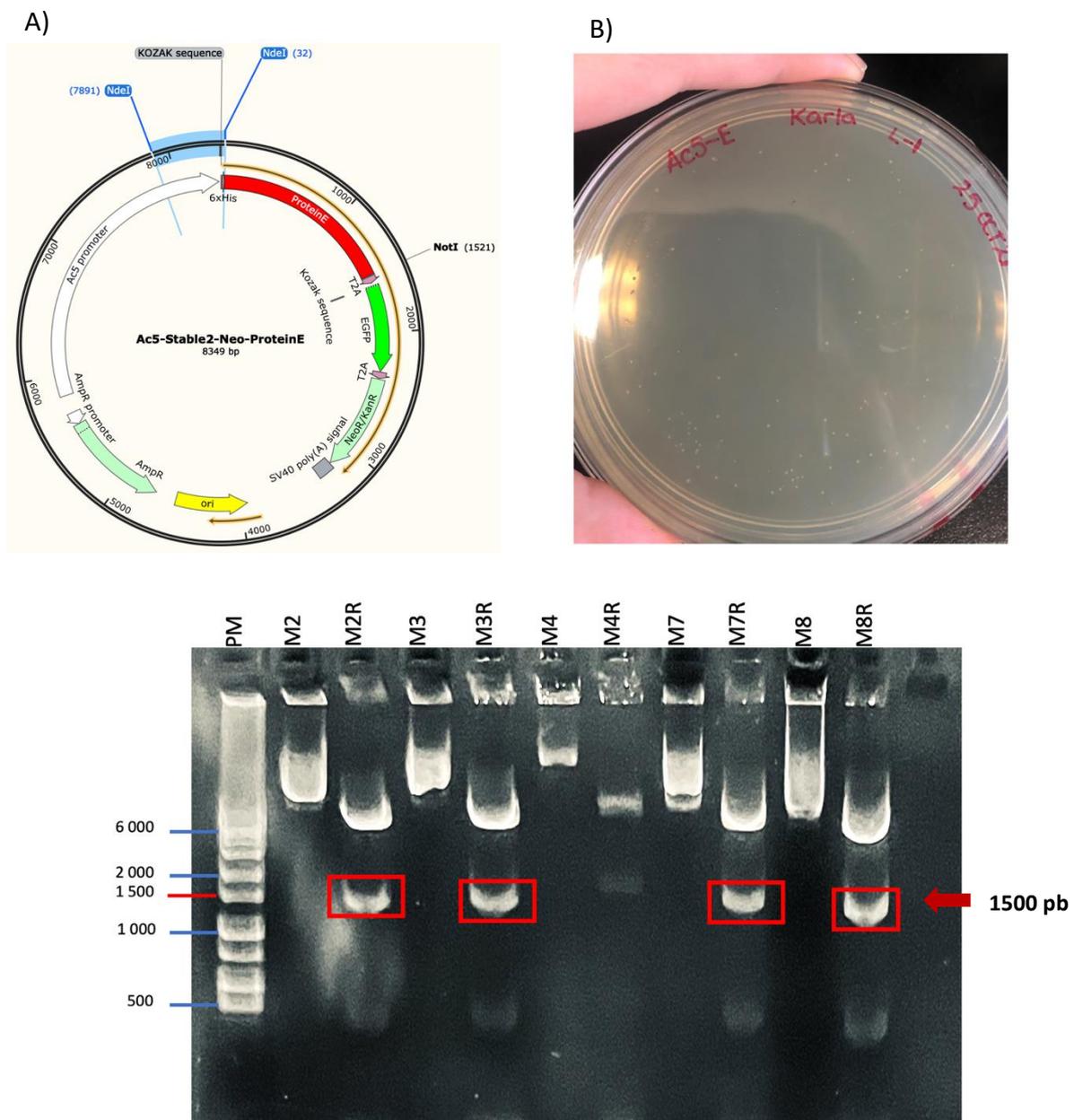


Figura 24. Caracterización de Ac5-STABLE2-Neo-ProteinE. A) Mapa del plásmido en donde se observa que la secuencia correspondiente a la proteína E, junto con el tag de histidinas, se insertó en lugar de la secuencia de la proteína m-Cherry. Las secuencias Kozak y T2A de Ac5-STABLE2-Neo se mantuvieron al igual que la EGFP. El tamaño de esta construcción fue de 8349 pb. B) Colonias obtenidas después de la transformación. C) Doble restricción de los plásmidos con las enzimas NdeI y NotI. Las muestras restringidas se marcan con la letra R después del nombre de la muestra.

Se seleccionó a la candidata M3 para hacer la transfección en C6/36. Estas transfecciones fueron comprobadas por la fluorescencia observada a las 48 y 72 horas post transfección (fig 25), se observa únicamente la fluorescencia verde de acuerdo a lo esperado, lo que demuestra la expresión de la proteína E.

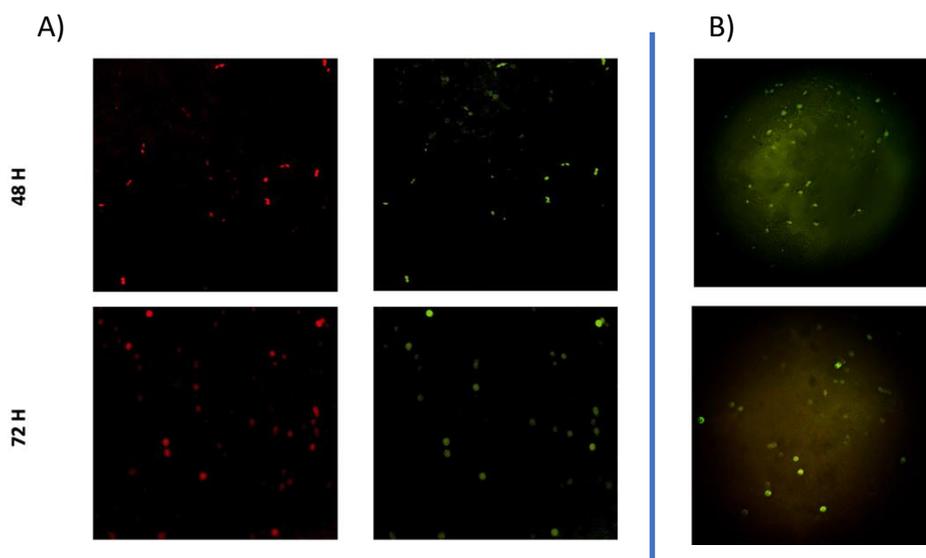


Fig 25. Transfección de C6/36 con Ac5-STABLE2-Neo-ProteinE. A) Control positivo con fluorescencia roja y verde a las 48 y 72 horas post transfección. B) Fluorescencia de las células transfectadas con la muestra M3.

Debido a que se observó más fluorescencia a las 48 post transfección, las proteínas extraídas a las 48 horas se corrieron en un SDS-PAGE 15%, se realizó el western blot para el que se utilizó el anticuerpo primario, monoclonal de ratón, 6X His tag antibody [GT359] de GeneTex

(1:500, 1:1000 y 1:5000) y el anticuerpo secundario policlonal de conejo, anti-Mouse IgG (AP) GTX26729 de GeneTex (1:5000). Se tiene un resultado preliminar el cual no se presenta.

3.6 Caracterización de pET15B-DIII

La construcción pET15B-DIII (fig 26A) también fue caracterizada, se hizo la transformación de *E.coli* BL21 competentes y de las colonias obtenidas (fig 26B) se seleccionaron 8 candidatas al azar. De estas se purificaron sus plásmidos, con un tamaño esperado de 5943 pb (fig 26C) y se hicieron las dobles restricciones con las enzimas NdeI y BamHI (fig 26D). Para las candidatas S4, S5 y S6 fue claro que se liberó el fragmento de 300 pb correspondiente al DIII. En el caso de las otras candidatas el resultado no es claro.

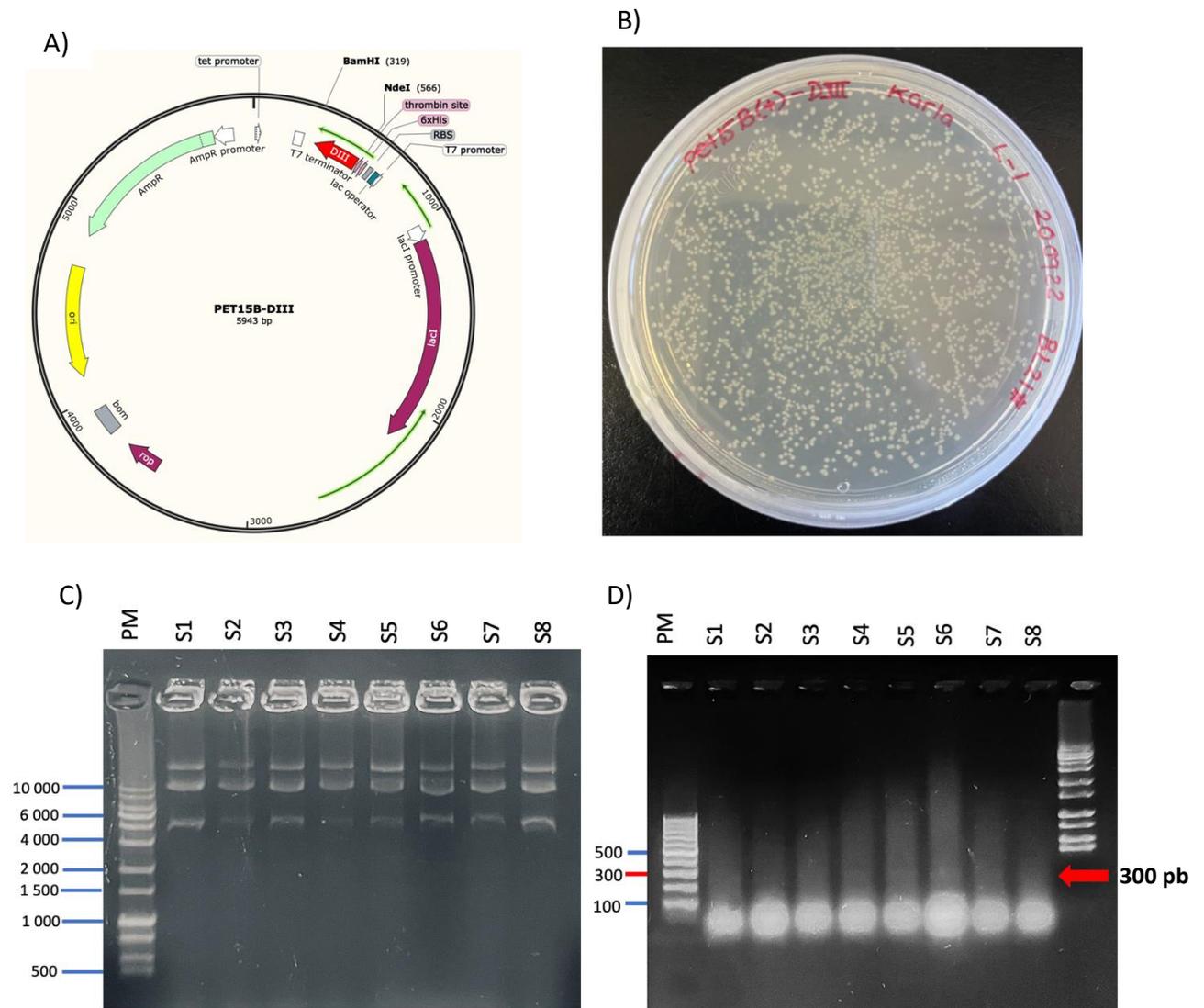
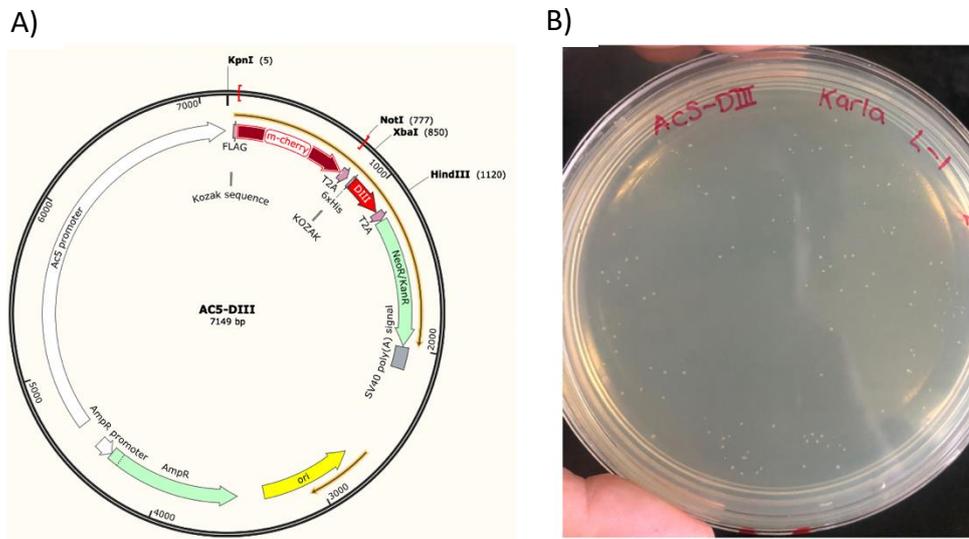


Figura 26. Caracterización de pET15B-DIII. A) Mapa del plásmido pET15B-DIII con sitios de restricción para las enzimas NdeI y BamHI. B) Colonias obtenidas de la transformación. C) Plásmidos purificados de las candidatas. D) Doble restricción de los plásmidos purificados.

3.7 Caracterización de Ac5-DIII

En la figura 27A, se observa el mapa de la construcción Ac5-DIII, en este caso la secuencia correspondiente al DIII se insertó en sustitución de la EGFP, por lo que este plásmido tendría únicamente fluorescencia roja. Se conservaron también las secuencias Kozak y T2A. Los sitios de restricción que se utilizaron fueron los de las enzimas XbaI y HindIII. En la figura 27B, se observan las candidatas obtenidas luego de la transformación de bacterias competentes. Se seleccionaron 5 candidatas al azar, se extrajeron los plásmidos de estas y se hicieron las dobles restricciones. Se observa la liberación del fragmento de 300 pb en tres de las candidatas (C3, C4 y C5) fig 27C.



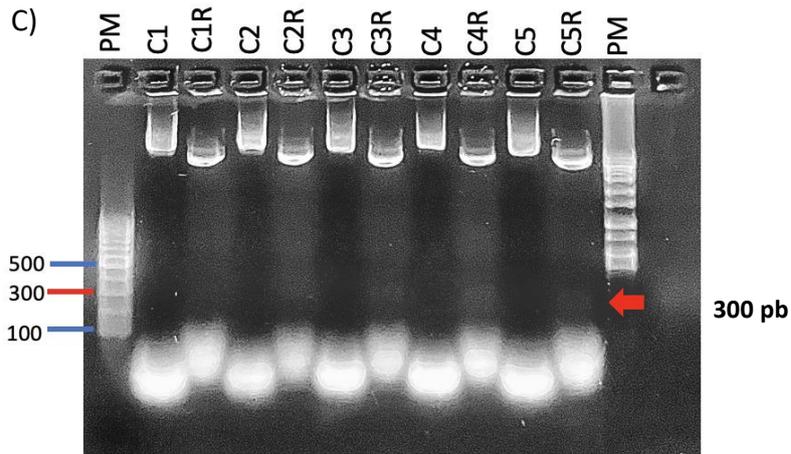


Figura 27. Caracterización de Ac5-DIII. A) Mapa de Ac5-DIII. B) Colonias obtenidas luego de la transformación. C) Doble restricción con las enzimas XbaI y HindIII. Se liberaron fragmentos de 300 pb en al menos 3 de las candidatas. Este fragmento se marca con una flecha roja.

Una vez caracterizada la construcción, se hicieron las transfecciones en C6/36. Las muestras de 48 y 72 h post transfección se observaron con el microscopio de fluorescencia (fig 28A Y B). De acuerdo con lo esperado, únicamente se observó la fluorescencia roja (28B).

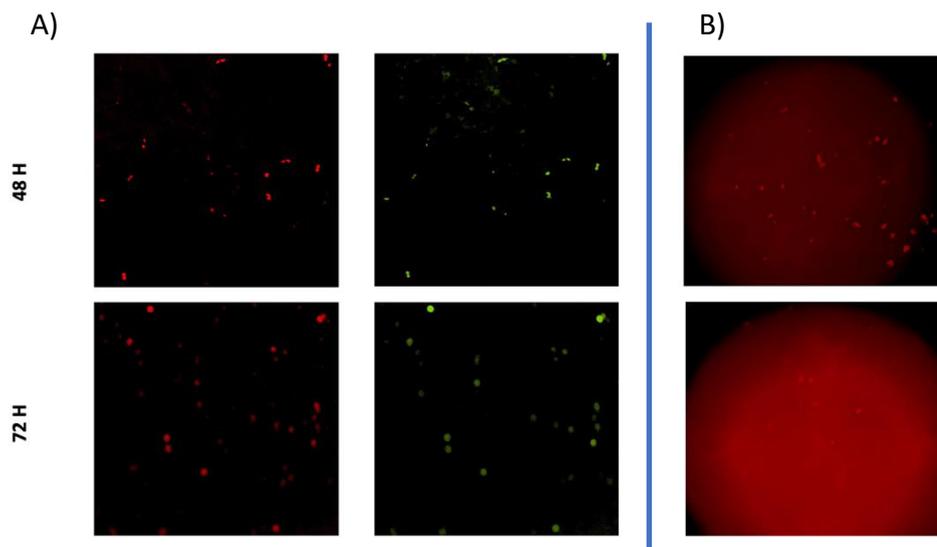


Figura 28. Fluorescencias observadas de la transfección de C6/36 con Ac5-DIII. A) Control positivo a 48 y 72 h post transfección. B) C6/36 transfectadas con el plásmido de la muestra C4.

La banda correspondiente al DIII no se pudo detectar exitosamente mediante western blot, ni al inducir las bacterias con IPTG, ni en los lisados de proteínas de C6/36 transfectadas.

3.8 Confirmación de la enolasa como receptor del virus dengue.

Los resultados de esta parte del trabajo se presentan en la publicación adjunta (Brito-Carreón et al., 2022). Aquí presento un resumen de la parte del trabajo donde participe.

Mediante el uso de columnas de afinidad hechas con sefarosa 4B con DENV2 acoplado covalentemente y luego de pasar a través de ellas lisados proteicos de C6/36, se obtuvo la fracción de elución que se separó por SDS-PAGE 12 %. Se realizó el western blot utilizando anticuerpos anti-enolasa específicos que permitieron detectar una banda de 47 kDa correspondiente a la enolasa (Fig. 1A y 1B mostradas en la publicación, ver al final de esta tesis). Esta banda se analizó por espectrometría de masas y se detectaron varios péptidos que correspondían a la secuencia de enolasa. La fracción de elución también se analizó por espectrometría de masas y se detectaron péptidos. Los péptidos detectados en ambos análisis tuvieron scores entre 35.8 y hasta el 76.1, estos pueden apreciarse en la figura 2, en la que se hizo un análisis manual acomodando los péptidos debajo de la secuencia de enolasa, en donde coinciden con la secuencia teórica.

Mediante RT-PCR se obtuvo el cDNA de la enolasa de células C6/36, utilizando primers específicos. Estos amplificados se secuenciaron y se obtuvo la secuencia de nucleótidos correspondientes la cual fue traducida a su secuencia de aminoácidos. Ambas secuencias se analizaron haciendo los alineamientos con las secuencias de enolasa α , β y γ de humano, la secuencia de MBP-1, dos secuencias teóricas de enolasa de *Ae. albopictus* y una secuencia de enolasa de *Ae. aegypti*. Se encontró que la enolasa de células C6/36, así como la enolasa de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* tienen los sitios alternativos de inicio de la traducción presentes en la enolasa α -humana, por lo que es probable que tengan la capacidad de producir una

proteína similar a la MBP-1 humana, aunque hasta el momento esto no ha sido descrito en otros trabajos de investigación. Además, también se detectaron los sitios de reconocimiento de los anticuerpos CAR, el dominio de unión a sustrato, la secuencia de la isoforma MBP-1 y el dominio de interacción con plasminógeno. Este sitio es importante ya que se sabe que la enolasa es un receptor de plasminógeno (Redlitz et al., 1995) y por lo tanto podría tener alguna implicación durante el desarrollo de la forma grave del dengue y las hemorragias que se presentan en el dengue grave.

Aunado a esto también se demostró la inmunolocalización de la enolasa en las células C6/36, en donde se observa su presencia en el citoplasma de la célula, como se esperaba, y además en el núcleo en donde se hipotetiza que pueda estar implicada en otros puntos de la infección por DENV además de funcionar como receptor en el paso inicial de la infección (Fig. 4). Todos los resultados se presentan al final de la tesis en la publicación que se anexa.

4. Discusión

La continua amenaza de la emergencia y re-emergencia de los flavivirus resalta la necesidad de entender la biología de estos virus y las posibles medidas que se pueden tomar para reducir su impacto en la salud pública (Pierson & Diamond, 2020). El DENV infecta un estimado de 400 millones de humanos cada año; más de la cuarta parte de la población mundial vive en áreas en donde el dengue es ahora endémico (Bhatt et al., 2013).

La mitigación de la enfermedad recae principalmente en estrategias de control del vector, incluyendo el uso de insecticidas, remoción de sitios de oviposición cercanos a los hábitats humanos y el uso de mosquiteros y cortinas protectoras (Beaty et al., 2010). Sin embargo, debido al movimiento humano e intercambio transcontinental, la prevalencia del dengue ha aumentado dramáticamente en los países endémicos y se ha esparcido a nuevas regiones del mundo (Gubler et al., 2014; Weaver & Reisen, 2010). La situación se ha complicado más aún debido a que la resistencia a los insecticidas está incrementándose en las poblaciones de mosquitos (Bisset et al., 2013) y dado que la vacuna existente para dengue no es capaz de prevenir la enfermedad con la misma eficacia en todas las personas y en los diferentes grupos de edades (Villar et al., 2015), se necesita buscar otras estrategias para controlar la enfermedad con estrategias nuevas promisorias que se centran en interrumpir el ciclo viral directamente en el vector. Estas estrategias implican el manejo de herramientas moleculares genéticas para reducir las poblaciones de mosquitos o modular la competencia del vector (Alphey & Andreasen, 2002; Franz et al., 2014).

Dado que la infección del intestino medio del mosquito vector es el primer paso para que se establezca la infección (Hardy et al., 1983), es importante dilucidar que proteínas en la superficie de las células del intestino medio pueden estar actuando como receptores del DENV.

La unión a la superficie celular y la penetración al citoplasma celular son pasos claves en el ciclo de vida del virus, los cuales determinan el tropismo celular. La identificación de estos

factores de unión y receptores así como su distribución en huéspedes susceptibles provee pistas importantes para entender la patogénesis viral (Acosta et al., 2014).

Uno de los candidatos a receptores de DENV mejor caracterizado es la prohibitina, una proteína de 35 kDa. Esta proteína se identificó en células C6/36, CCL-125 y mosquitos *Ae. aegypti* adultos, mediante VOPBA y espectrometría de masas (Kuadkitkan et al., 2010a).

También se han detectado otros posibles candidatos como proteínas de 40 y 45 kDa, en células C6/36 para el virus DEN-4. Ambas proteínas presentes también en tejido de mosquito permisivo a la infección por DENV (Mendoza et al., 2002; Salas-Benito & del Angel, 1997). La proteína gp45 se identificó usando una proteína E recombinante, obtenida de bacteria, por columna de afinidad (Chen et al., 1997; Reyes-Del Valle & Del Angel, 2004).

Sakoonwatanyoo et al, estudiaron una proteína de 50 kDa que ya había sido propuesta como receptor para DENV1 en células hepáticas. Sin embargo, fue la primera vez que se propuso a la laminina como receptor de DENV3 y DENV4 en mosquitos, no así para DENV1 y DENV2. Se propuso que el receptor gp45 descrito previamente (Salas-Benito & del Angel, 1997) podía ser la misma proteína que el receptor de laminina (Sakoonwatanyoo et al., 2006).

Se identificaron también proteínas de 67 y 80 kDa de intestino medio de *Ae. aegypti* y de células C6/36 (De Lourdes Muñoz et al., 1998b) que son capaces de unirse a los cuatro serotipos de DENV (Mercado-Curiel et al., 2006). La proteína de 67 kDa se relacionó después con la susceptibilidad de las cepas de mosquito a infectarse con DENV, ya que se comprobó que su expresión variaba en las diferentes partes del intestino medio de estas cepas de mosquito (Mercado-Curiel et al., 2008). La proteína de 67 kDa fue identificada como enolasa mediante espectrometría de masas (Muñoz et al., 2013) y recientemente comprobamos que efectivamente la enolasa se encuentra presente en la membrana de células C6/36 y que ahí interactúa con DENV2. Además se hipotetizó que pudiera estar implicada en otros puntos de la infección ya que también se encuentra esta proteína en el núcleo de las células (Brito-Carreón et al., 2022). Otro aspecto importante respecto a la enolasa es que se sabe que es un receptor de plasminógeno (Plow & Das, 2009), por lo que podría estar implicada también en el desarrollo de las hemorragias cuando se presenta el dengue grave. También demostramos que la enolasa de *Ae. albopictus* y de *Ae. aegypti* tienen el sitio alternativo para la traducción

que se encuentra presente en la α -enolasa de humano, la cual da lugar a la expresión de la proteína MBP1 (Feo et al., 2000), por lo que no se descarta que en los mosquitos *Ae. albopictus* y de *Ae. aegypti* se exprese una proteína similar a MBP1.

Todos estos receptores se han encontrado principalmente mediante el uso de técnicas como VOPBA, cromatografía de afinidad (con virus completo o proteína E o DIII recombinantes) y utilizando anticuerpos contra las proteínas propuestas como receptores para demostrar que al bloquear a estas proteínas también se disminuye la infección por DENV (Brito-Carreón et al., 2022; Kuadkitkan et al., 2010b; Mendoza et al., 2002; Mercado-Curiel et al., 2006; Salas-Benito & del Angel, 1997).

La proteína E y su DIII recombinantes, además de ser utilizados en las columnas de afinidad para la búsqueda de receptores para DENV, también se han utilizado para encontrar formas de prevenir la infección por DENV, principalmente en el desarrollo de propuestas para vacunas (Corzo-Gómez et al., 2019; Huerta et al., 2008).

Es debido al amplio uso de estas proteínas recombinantes que se necesita encontrar métodos rápidos para expresarlas y además que sean lo más parecidos a la forma natural en la que se expresan en eucariontes, ya que el sistema de expresión más rápido y más comúnmente usado son las bacterias. Sin embargo, no puede descartarse que las proteínas obtenidas en bacterias provean resultados diferentes de los que se obtendrían si se utilizaran proteínas expresadas en células de mosquito debido a las modificaciones estructurales que puedan haber, más específicamente la glicosilación (S. S. L. Yap et al., 2017).

La proteína E de DENV2 está glicosilada en Asn-67 y Asn-153. Se ha observado que las mutaciones que afectan a Asn-67 no interfieren con la replicación del virus en células de mamífero, pero si producen virus que no son capaces de infectar, mientras que las mutaciones que afectan la glicosilación de Asn-153 reducen hasta 100 veces la liberación del RNA viral y hasta 10 veces la infectividad (Bryant et al., 2007). Las mutaciones en la glicosilación de ambos residuos reducen la liberación del virus de las células de mosquito (Lee et al., 2010). Los virus con proteína E no glicosilada muestran una menor capacidad para

infectar células dendríticas inmaduras, indicando una posible interacción entre los glicanos y DC-SIGN (Alen et al., 2012).

Debido a estas alteraciones observadas cuando se han modificado los patrones de glicosilación de la proteína E fue que decidimos expresar esta proteína E y su DIII en células de mosquito, ya que de esta forma las proteínas expresadas conservarían las modificaciones post traduccionales que tienen de manera natural. Como se demostró en este trabajo, la proteína E fue expresada con éxito en células C6/36. Para comprobar que el DIII se expresa en las células C6/36 será necesario identificar a este dominio por western blot.

Ya que ambas proteínas sean sobreexpresadas en cultivos de C6/36, se utilizarán acopladas a sepharose 4B para hacer columnas de afinidad, cuyo procedimiento de montaje ya tenemos establecido (Brito-Carreón et al., 2022), para de los extractos de intestino medio de mosquito identificar las proteínas que se unen y comparar los resultados obtenidos con los que se han obtenido previamente con proteínas expresadas en bacteria y de esta forma descartar o corroborar según sea el caso la importancia de las modificaciones post traduccionales en la estructura final de la proteína E y del DIII.

5. Conclusión

Se obtuvieron los insertos de la proteína E en los plásmidos AC5-E y pET15b(+)-E y estamos en el proceso de obtener suficiente cantidad de proteína para poder identificar las proteínas de células C6/36 e intestinos medios de mosquitos que se unen a la proteína E.

Se observó la presencia de la banda correspondiente a la proteína E en el western blot (WB). Sin embargo, es necesario repetir la transfección de las células C6/36 incrementando la cantidad de DNA, confirmar la presencia de la proteína E mediante microscopia de fluorescencia y posteriormente hacer la selección con geneticina.

Se confirmó a la enolasa como receptor de los DENV y se determinará si esta también es identificada con las columnas de afinidad usando a la proteína E y el dominio III de la proteína E.

6. Perspectivas

Se obtendrán las proteínas que se unen a la proteína E y el dominio III obtenido de la transfección de células C6/36 con los vectores Ac5 y se compararán con las obtenidas con la proteína E expresada en bacterias con los vectores pET15-B(+).

7. Referencias

- Acosta, E. G., Kumar, A., & Bartenschlager, R. (2014). Revisiting dengue virus-host cell interaction: New insights into molecular and cellular virology. In *Advances in Virus Research* (Vol. 88). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00001-5>
- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(2), 376–381. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.02.376-381.2002>
- Alen, M. M. F., Dallmeier, K., Balzarini, J., Neyts, J., & Schols, D. (2012). Crucial role of the N-glycans on the viral E-envelope glycoprotein in DC-SIGN-mediated dengue virus infection. *Antiviral Research*, *96*(3), 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.10.007>
- Alphey, L., & Andreasen, M. (2002). Dominant lethality and insect population control. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *121*(2), 173–178. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00040-3)
- Alvarez, D. E., De Lella Ezcurra, A. L., Fucito, S., & Gamarnik, A. V. (2005). Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*, *339*(2), 200–212. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.009>
- Amarasinghe, A., Kuritsky, J. N., William Letson, G., & Margolis, H. S. (2011). Dengue virus infection in Africa. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(8), 1349–1354. <https://doi.org/10.3201/eid1708.101515>
- Beaty, B. J., Black, W. C., Blair, C. D., Eisen, L., Darwin, E.-Q., Farfan-Ale, J. A., Lozano-Fuentes, S., Franz, A., Olson, K. E., & Sanchez-Vargas, I. (2010). Novel Strategies to Control *Aedes aegypti* and Dengue. *Vector Biology, Ecology and Control*, 1–260. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2458-9>
- Bennett, S. N., Holmes, E. C., Chirivella, M., Rodriguez, D. M., Beltran, M., Vorndam, V., Gubler, D. J., & McMillan, W. O. (2003). Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Molecular Biology and Evolution*, *20*(10), 1650–1658. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg182>
- 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., William 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>
- Bisset, J. A., Marín, R., Rodríguez, M. M., Severson, D. W., Ricardo, Y., French, L., Díaz, M., & Pérez, O. (2013). Insecticide resistance in two *aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. *Journal of Medical Entomology*, *50*(2), 352–361.
<https://doi.org/10.1603/ME12064>
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Moyes, C. L., Farlow, A. W., Scott, T. W., & Hay, S. I. (2012). Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
- Brito-Carreón, C. A., Zavala-Maldonado, K., Suárez-Andino, E. I., David, R. E., Perez-Ramírez, G., Diaz-Badillo, A., & Muñoz, M. de L. (2022). Cell membrane enolase of *Aedes albopictus* C6/36 cells is involved in the entrance mechanism of dengue virus (DENV). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *25*(2).
<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.101924>
- Bryant, J. E., Calvert, A. E., Mesesan, K., Crabtree, M. B., Volpe, K. E., Silengo, S., Kinney, R. M., Huang, C. Y. H., Miller, B. R., & Roehrig, J. T. (2007). Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology*, *366*(2), 415–423.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.007>
- Calisher, C. H., Nuti, M., Lazuick, J. S., Ferrari, J. D., & Kappus, K. D. (1981). Dengue in the Seychelles. *Bulletin of the World Health Organization*, *59*(4), 619–622.
- Carey, D. E. & C. O. R. (1971). DENGUE VIRUSES FROM FEBRILE Sum ary. *The Lancet*, *16*(297), 105–106.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Ricardo, G., & Rice, C. M. (1990). FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. *Annual Reviews of Microbiology*, *44*, 649–688. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245>
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., & Marks, R. M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Publishing Group*, *3*(8), 866–871.

- 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>
- Corzo-Gómez, J., García-Cordero, J., Montes Gómez, A. E., Bernal-Siria, K., Namorado-Tónix, K., Gutierrez-Castañeda, B., & Cedillo-Barrón, L. (2019). Expression and purification of domain III proteins from Dengue and Zika viruses. *Protein Expression and Purification*, *162*(February), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.05.005>
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 155–170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>
- De Lourdes Muñoz, M., Cisneros, A., Cruz, J., Das, P., Tovar, R., & Ortega, A. (1998a). Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiology Letters*, *168*(2), 251–258. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00434-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00434-0)
- De Lourdes Muñoz, M., Cisneros, A., Cruz, J., Das, P., Tovar, R., & Ortega, A. (1998b). Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiology Letters*, *168*(2), 251–258. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00434-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00434-0)
- Egloff, M. P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J. L., & Canard, B. (2002). An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: Crystal structure and functional characterization. *EMBO Journal*, *21*(11), 2757–2768. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2757>
- Erbel, P., Schiering, N., D'Arcy, A., Renatus, M., Kroemer, M., Lim, S. P., Yin, Z., Keller, T. H., Vasudevan, S. G., & Hommel, U. (2006). Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nature Structural and Molecular Biology*, *13*(4), 372–373. <https://doi.org/10.1038/nsmb1073>
- Fan, J., Liu, Y., Xie, X., Zhang, B., & Yuan, Z. (2013). Inhibition of japanese encephalitis virus infection by flavivirus recombinant e protein domain III. *Virologica Sinica*, *28*(3), 152–160. <https://doi.org/10.1007/s12250-013-3331-8>
- Feo, S., Arcuri, D., Piddini, E., Passantino, R., & Giallongo, A. (2000). ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: Relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Letters*, *473*(1), 47–52. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01494-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01494-0)
- Ferlenghi, I., Clarke, M., Ruttan, T., Allison, S. L., Schlich, J., Heinz, F. X., Harrison, S. C., Rey,

- F. A., & Fuller, S. D. (2001). Molecular Organization of a Recombinant Subviral Particle from Tick-Borne Encephalitis Virus Henry Wellcome Building for Genomic Medicine. *Molecular Cell*, 7, 593–602.
- Ferron, F., Decroly, E., Selisko, B., & Canard, B. (2012). The viral RNA capping machinery as a target for antiviral drugs. *Antiviral Research*, 96(1), 21–31.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.07.007>
- Filomatori, C. V., Lodeiro, M. F., Alvarez, D. E., Samsa, M. M., Pietrasanta, L., & Gamarnik, A. V. (2006). A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes and Development*, 20(16), 2238–2249.
<https://doi.org/10.1101/gad.1444206>
- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F. A., & Deubel, V. (1999). Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion. *Journal of Virology*, 73(7), 6104–6110. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.7.6104-6110.1999>
- Forrester, N. L., Guerbois, M., Seymour, R. L., Spratt, H., & Weaver, S. C. (2012). Vector-Borne Transmission Imposes a Severe Bottleneck on an RNA Virus Population. *PLoS Pathogens*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002897>
- Franco, L., di Caro, A., Carletti, F., Vapalahti, O., Renaudat, C., Zeller, H., & Tenorio, A. (2010). Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. *Eurosurveillance*, 15(7), 1–4. <https://doi.org/10.2807/ese.15.07.19490-en>
- Franz, A. W. E., Kantor, A. M., Passarelli, A. L., & Clem, R. J. (2015). Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses*, 7(7), 3741–3767.
<https://doi.org/10.3390/v7072795>
- Franz, A. W. E., Sanchez-Vargas, I., Raban, R. R., Black IV, W. C., James, A. A., & Olson, K. E. (2014). Fitness Impact and Stability of a Transgene Conferring Resistance to Dengue-2 Virus following Introgression into a Genetically Diverse *Aedes aegypti* Strain. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002833>
- Grove, J., & Marsh, M. (2011). The cell biology of receptor-mediated virus entry. *Journal of Cell Biology*, 195(7), 1071–1082. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108131>
- Gubler, D. J., Ooi, E. E., Vasudevan, S., & Farrar, J. (2014). *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* (2nd ed.). CABI International.
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue

- infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–26.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Guzman, M. G., & Harris, E. (2015). Dengue. *The Lancet*, 385(9966), 453–465.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60572-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9)
- Halstead, S. (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, 239(4839), 476–481. <https://doi.org/10.1126/science.239.4839.476>
- Hardy, J. L., Houk, E. J., Kramer, L. D., & Reeves, W. C. (1983). Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Review of Entomology*. Volume 28, 229–262. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.001305>
- Hecker, H. (1977). Structure and function of midgut epithelial cells in culicidae mosquitoes (insecta, diptera). *Cell and Tissue Research*, 184(3), 321–341.
<https://doi.org/10.1007/BF00219894>
- Houk, E. J. (1977). Midgut ultrastructure of *Culex tarsalis* (Diptera:Culcidae) before and after a bloodmeal. *Tissue and Cell*, 9(1), 103–118. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(77\)90052-0](https://doi.org/10.1016/0040-8166(77)90052-0)
- Huerta, V., China, G., Fleitas, N., Sarría, M., Sánchez, J., Toledo, P., & Padrón, G. (2008). Characterization of the interaction of domain III of the envelope protein of dengue virus with putative receptors from CHO cells. *Virus Research*, 137(2), 225–234.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.022>
- Kanesa-athan, N., Magill, A., Smoak, B., Vaughn, D., Dubois, D., & Burrous, J. (1994). Dengue serotypes 2 and 3 in US forces in Somalia. *The Lancet*, 343, 678.
- Kato, N., Dasgupta, R., Smartt, C. T., & Christensen, B. M. (2002). Glucosamine:fructose-6-phosphate aminotransferase: Gene characterization, chitin biosynthesis and peritrophic matrix formation in *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 11(3), 207–216. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00326.x>
- Kimura, H. S. and R. (1952). Experimental studies on dengue-1. Isolation identification and modification of the virus. *Journal of Infectious Diseases*, 90(1), 1–9.
- Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q. N., 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., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *ELife*, 4(JUNE2015), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>

- Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C., & Smith, D. R. (2010a). Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology*, *406*(1), 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.015>
- Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C., & Smith, D. R. (2010b). Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology*, *406*(1), 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.015>
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, *108*(5), 717–725. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00660-8)
- Kuno, G., Gómez, I., & Gubler, D. J. (1991). An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *Journal of Virological Methods*, *33*(1–2), 101–113. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(91\)90011-N](https://doi.org/10.1016/0166-0934(91)90011-N)
- Lee, E., Leang, S. K., Davidson, A., & Lobigs, M. (2010). Both E Protein Glycans Adversely Affect Dengue Virus Infectivity but Are Beneficial for Virion Release. *Journal of Virology*, *84*(10), 5171–5180. <https://doi.org/10.1128/jvi.01900-09>
- Leitmeyer, K. C., Vaughn, D. W., Watts, D. M., Salas, R., Villalobos, I., de Chacon, Ramos, C., & Rico-Hesse, R. (1999). Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *Journal of Virology*, *73*(6), 4738–4747. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.6.4738-4747.1999>
- Leta, S., Beyene, T. J., De Clercq, E. M., Amenu, K., Kraemer, M. U. G., & Revie, C. W. (2018). Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Infectious Diseases*, *67*, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>
- Leung, J. Y., Pijlman, G. P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J. M., & Khromykh, A. A. (2008). Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *Journal of Virology*, *82*(10), 4731–4741. <https://doi.org/10.1128/jvi.00002-08>
- Libraty, D. H., Young, P. R., Pickering, D., Endy, T. P., Kalayanarooj, S., Green, S., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Ennis, F. A., & Rothman, A. L. (2002). High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, *186*(8), 1165–1168. <https://doi.org/10.1086/343813>

- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2007). Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology*, 1101–1151.
- Luo, D., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2015). The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Research*, 118(September 2005), 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.014>
- Luo, D., Wei, N., Doan, D. N., Paradkar, P. N., Chong, Y., Davidson, A. D., Kotaka, M., Lescar, J., & Vasudevan, S. G. (2010). Flexibility between the protease and helicase domains of the dengue virus NS3 protein conferred by the linker region and its functional implications. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18817–18827. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090936>
- Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., & Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3414–3419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>
- Matusan, A. E., Pryor, M. J., Davidson, A. D., & Wright, P. J. (2001). Mutagenesis of the Dengue Virus Type 2 NS3 Protein within and outside Helicase Motifs: Effects on Enzyme Activity and Virus Replication. *Journal of Virology*, 75(20), 9633–9643. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.20.9633-9643.2001>
- Mendoza, M. Y., Salas-Benito, J. S., Lanz-Mendoza, H., Hernández-Martínez, S., & Del Angel, R. M. (2002). A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: Localization of a 45-KDA glycoprotein. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(1), 76–84. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.76>
- Mercado-Curiel, R. F., Black IV, W. C., & Muñoz, M. D. L. (2008). A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiology*, 8(6), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-118>
- Mercado-Curiel, R. F., Esquinca-Avilés, H. A., Tovar, R., Díaz-Badillo, Á., Camacho-Nuez, M., & Muñoz, M. D. L. (2006). The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiology*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-85>
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 6986–6991.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0832193100>

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13–22.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>

Muller, D. A., & Young, P. R. (2013). The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*, 98(2), 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>

Muñoz, M. D. L., Limón-Camacho, G., Tovar, R., Diaz-Badillo, A., Mendoza-Hernández, G., & Black, W. C. (2013). Proteomic identification of dengue virus binding proteins in *Aedes aegypti* mosquitoes and *Aedes albopictus* cells. *BioMed Research International*, 2013.

<https://doi.org/10.1155/2013/875958>

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>

Okuda, K., De Souza Caroci, A., Ribolla, P. E. M., De Bianchi, A. G., & Bijovsky, A. T. (2002). Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue and Cell*, 34(3), 210–219. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(02\)00032-0](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(02)00032-0)

Parikh, G. R., Oliver, J. D., & Bartholomay, L. C. (2009). A Haemocyte tropism for an arbovirus. *Journal of General Virology*, 90(2), 292–296.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.005116-0>

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>

Perrone, J. B., & Spielman, A. (1988). Time and site of assembly of the peritrophic membrane of the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell and Tissue Research*, 252(2), 473–478.

<https://doi.org/10.1007/BF00214391>

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>

Plow, E. F., & Das, R. (2009). Enolase-1 as a plasminogen receptor. *Blood*, 113(22), 5371–5372. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208546>

Pollett, S., Melendrez, M. C., Maljkovic Berry, I., Duchêne, S., Salje, H., Cummings, D. A. T., & Jarman, R. G. (2018). Understanding dengue virus evolution to support epidemic

- surveillance and counter-measure development. *Infection, Genetics and Evolution*, 62, 279–295. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.032>
- Redlitz, A., Fowler, B. J., Plow, E. F., & Miles, L. A. (1995). The Role of an Enolase-Related Molecule in Plasminogen Binding to Cells. *European Journal of Biochemistry*, 227(1–2), 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20403.x>
- Reiter, P. (1998). *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: The shape of things to come? *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(1), 83–94.
- Rey, A. (2003). Dengue virus envelope glycoprotein structure : *Pnas*, 100(12), 6899–6901.
- Reyes-Del Valle, J., & Del Angel, R. M. (2004). Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant e protein ligand. *Journal of Virological Methods*, 116(1), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.10.014>
- Romoser, W. S., Wasieloski, L. P., Pushko, P., Kondig, J. P., Lerdthusnee, K., Neira, M., & Ludwig, G. V. (2004). Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut. *Journal of Medical Entomology*, 41(3), 467–475. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.467>
- Sabin, A., & Schlesinger, W. (1945). Production of immunity to Dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*, 101(2634), 640–642. <https://doi.org/doi:10.1126/science.101.2634.6>
- Sakoonwatanyoo, P., Boonsanay, V., & Smith, D. R. (2006). Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein. *Intervirology*, 49(3), 161–172. <https://doi.org/10.1159/000089377>
- Salas-Benito, J. S., & del Angel, R. M. (1997). Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *Journal of Virology*, 71(10), 7246–7252. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.10.7246-7252.1997>
- Shiryaev, S. A., Chernov, A. V., Aleshin, A. E., Shiryaeva, T. N., & Strongin, A. Y. (2009). NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: A novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *Journal of General Virology*, 90(9), 2081–2085. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012864-0>
- Southwood, T. R., Murdie, G., Yasuno, M., Tonn, R. J., & Reader, P. M. (1972). Studies on the life budget of *Aedes aegypti* in Wat Samphaya, Bangkok, Thailand. *Bulletin of the World Health Organization*, 46(2), 211–226.

- Stern, O., Hung, Y.-F., Valda, O., Yaffe, Y., Harris, E., Hoffmann, S., Willbold, D., & Sklan, E. H. (2013). An N-Terminal Amphipathic Helix in Dengue Virus Nonstructural Protein 4A Mediates Oligomerization and Is Essential for Replication. *Journal of Virology*, *87*(7), 4080–4085. <https://doi.org/10.1128/jvi.01900-12>
- Teo, C. S. H., & Chu, J. J. H. (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>
- Torres-Galicia, I., Cortés-Poza, D., & Becker, I. (2014). Dengue in Mexico: Increase in the juvenile population during the last decade. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, *71*(4), 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.bmhix.2014.08.003>
- Vasilakis, N., Cardoso, J., Hanley, K. A., Holmes, E. C., & Weaver, S. C. (2011). Fever from the forest: Prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(7), 532–541. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2595>
- Villar, L., Dayan, G. H., Arredondo-García, J. L., Rivera, D. M., Cunha, R., Deseda, C., Reynales, H., Costa, M. S., Morales-Ramírez, J. O., Carrasquilla, G., Rey, L. C., Dietze, R., Luz, K., Rivas, E., Miranda Montoya, M. C., Cortés Supelano, M., Zambrano, B., Langevin, E., Boaz, M., ... Noriega, F. (2015). Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *New England Journal of Medicine*, *372*(2), 113–123. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1411037>
- Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, *85*(2), 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnsse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host and Microbe*, *5*(4), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- WHO. (2009). Special programme for research and training in tropical diseases. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. Geneva: World Health Organization.
- Xie, X., Zou, J., Puttikhunt, C., Yuan, Z., & Shi, P.-Y. (2015). Two Distinct Sets of NS2A Molecules Are Responsible for Dengue Virus RNA Synthesis and Virion Assembly. *Journal of Virology*, *89*(2), 1298–1313. <https://doi.org/10.1128/jvi.02882-14>

- Yap, S. S. L., Nguyen-Khuong, T., Rudd, P. M., & Alonso, S. (2017). Dengue virus glycosylation: What do we know? *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUL), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01415>
- Yap, T. L., Xu, T., Chen, Y.-L., Malet, H., Egloff, M.-P., Canard, B., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2007). Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85-Angstrom Resolution. *Journal of Virology*, *81*(9), 4753–4765. <https://doi.org/10.1128/jvi.02283-06>
- Yu, I. M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., & Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, *319*(5871), 1834–1837. <https://doi.org/10.1126/science.1153264>
- Zhang, M., Zheng, X., Wu, Y., Gan, M., He, A., Li, Z., Liu, J., & Zhan, X. (2010). Quantitative analysis of replication and tropisms of dengue virus type 2 in *Aedes albopictus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *83*(3), 700–707. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0193>
- Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J., Johnson, P. R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T. S., Strauss, J. H., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2003). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural Biology*, *10*(11), 907–912. <https://doi.org/10.1038/nsb990>
- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R., Zhang, W., Pletnev, S. V., Sedlak, D., Baker, T. S., Strauss, J. H., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2003). Zhang et al. - 2003 - Structures of immature flavivirus particles. *The EMBO Journal*, *22*(11).
- Zhang, Y., Zhang, W., Ogata, S., Clements, D., Strauss, J. H., Baker, T. S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2004). Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*, *12*(9), 1607–1618. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.06.019>
- Zou, G., Chen, Y. L., Dong, H., Lim, C. C., Yap, L. J., Yau, Y. H., Shochat, S. G., Lescar, J., & Shi, P. Y. (2011). Functional analysis of two cavities in flavivirus NS5 polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(16), 14362–14372. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.214189>
- Zou, J., Xie, X., Wang, Q.-Y., Dong, H., Lee, M. Y., Kang, C., Yuan, Z., & Shi, P.-Y. (2015a). Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. *Journal of Virology*, *89*(7), 3455–3470. <https://doi.org/10.1128/jvi.03453-14>
- Zou, J., Xie, X., Wang, Q.-Y., Dong, H., Lee, M. Y., Kang, C., Yuan, Z., & Shi, P.-Y. (2015b).

Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. *Journal of Virology*, 89(7), 3455–3470. <https://doi.org/10.1128/jvi.03453-14>