



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS DE UNIÓN  
AL VIRUS DEL DENGUE EN EL MOSQUITO**

*Aedes aegypti*

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ADRIANA NOLASCO WOLF**



**TUTORA**

**DRA. BLANCA HAYDÉ RUIZ ORDAZ**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Nolasco  
Wolf  
Adriana  
56 15 63 93  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Faculta de Ciencias  
Biología  
300099621

### 2. Datos del tutor

Dra.  
Ruiz  
Ordaz  
Blanca Haydé

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Monroy  
Martínez  
Verónica

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Ramírez  
Santos  
Jesús

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Estrada  
Mena  
Benito

### 6. Datos del sinodal 4

Q.F.B.  
Pozo  
Aguilar  
Jorge Omar

### 7. Datos del trabajo escrito

Identificación de moléculas de unión al virus del dengue en el mosquito *Aedes aegypti*  
120 p  
2011

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la **Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz**.

La presente tesis fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis queridos papás **Rita Wolf Marín** y **Emilio Nolasco Montoya** quienes me dieron la vida, a los que amo profundamente y que me han brindado desde el día en que nací un gran amor incondicional, gracias por guiarme todo este tiempo y que con sus hermosas enseñanzas me dieron la fortaleza para seguir adelante. A ustedes debo mi crecimiento y superación en el ámbito personal y académico, me enseñaron que con trabajo duro, esfuerzo, responsabilidad y dedicación lograré todos los objetivos que me he propuesto en la vida. Gracias por el enorme apoyo que me han dado en cada etapa de mi vida y por los momentos maravillosos que hemos vivido juntos. Por alentarme a perseverar día con día y ser una mejor persona. Por su honestidad, por confiar en mí, por su gran dedicación, por estar a mi lado siempre con palabras de amor y aliento. Gracias por sus grandes sacrificios, por sus desvelos, por su comprensión, por su ternura, entereza y calidez. Siempre los amaré y llevaré en mi corazón.

Asimismo dedico esta tesis a **Niki, Tabatha** y **Buggie** quienes me han brindado su amor sincero, por su valiosa compañía, por su ternura y por la felicidad que me han proporcionado. **Muchas gracias.**

## AGRADECIMIENTOS

En especial a la ***Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz*** por darme la gran oportunidad de formar parte de su laboratorio, por el inmenso apoyo académico, económico y moral que me ha brindado durante la elaboración de este trabajo y que indudablemente sin el no hubiera obtenido este título. Por su comprensión, imparcialidad, por sus palabras de aliento, sinceridad y consejos valiosos en momentos muy difíciles de mi vida. Por guiarme en el arduo camino científico. Por sus enseñanzas valiosas, por alentarme a dar mi mayor esfuerzo, por su confianza y por su enorme compromiso y dedicación. **Muchísimas gracias.**

Al ***Dr. Guillermo Mendoza Hernández*** por la elaboración del análisis de espectroscopía de masas, por su gran disponibilidad, por su enorme apoyo académico, por sus consejos valiosos y trato amable. **Muchas gracias.**

### ***A mis sinodales:***

La ***Dra. Verónica Monroy Martínez*** por su disponibilidad, tiempo y asesoramiento en la revisión de este trabajo. Por sus valiosos consejos y gran apoyo en la elaboración de experimentos así como en la adquisición de los mosquitos. Por todas sus enseñanzas académicas. **Muchas gracias.**

El ***Dr. Jesús Ramírez Santos*** por su gran apoyo, valiosa asesoría y disponibilidad en la revisión de la tesis y también por su trato afable. **Muchas gracias.**

El ***Dr. Benito Estrada Mena*** por el asesoramiento valioso, paciencia y su disponibilidad en la revisión del trabajo. **Muchas gracias.**

El ***Q.F.B. Jorge Omar Pozo Aguilar*** por su gran disponibilidad, paciencia, asesoría valiosa y por su compromiso en la revisión de la tesis. **Muchas gracias.**

## AGRADECIMIENTOS

### ***A mi familia:***

A mis abuelitos maternos ***Isabel Marín*** y ***Guillermo Wolf*** por todo el amor que me han brindado desde el día en que nací, por su apoyo incondicional, por sus valiosísimos consejos, por su fortaleza, por todos los momentos maravillosos que hemos vivido, por sus cuidados y protección, por sus grandes enseñanzas. **Muchas gracias.**

A mis abuelitos paternos ***Ana Montoya*** y ***Emilio Nolasco*** por el gran apoyo que me han brindado siempre, por su amor incondicional, por sus buenos deseos, por su entereza, por sus cuidados, por sus grandes consejos. **Muchas gracias.**

A mis tíos ***Fernando Nolasco*** y ***Estela Cabrera*** por su solidaridad, por su enorme apoyo en momentos muy difíciles de mi vida, por su amor sincero, por su gentileza, por su comprensión, por su gran bondad y paciencia. **Muchas gracias.**

A mis tíos ***Angélica Wolf*** y ***Ernesto García*** por apoyarme y alentarme a crecer día con día, por su amor sincero, por toda su ayuda y comprensión, por todos los momentos felices que hemos vivido juntos, por sus valiosos consejos y enseñanzas, por siempre escucharme y estar conmigo en momentos difíciles. **Muchas gracias.**

A mis tíos ***Lourdes Wolf*** y ***Enrique Pedroza*** por su amor sincero, por su tiempo, por sus palabras de aliento, por su sinceridad, por su apoyo en momentos complicados de mi vida, por su comprensión y valiosos consejos, por su fortaleza, por sus ganas de vivir, por sus grandes enseñanzas, por todos los momentos de felicidad que hemos vivido. **Muchas gracias.**

A mi tía ***Laura Nolasco*** y a mis primos ***Laura*** y ***Luis*** por el gran apoyo que me han brindado, por sus valiosos consejos, por su amor sincero, por su afabilidad, por su comprensión, por su solidaridad y por sus buenos deseos. **Muchas gracias.**

## AGRADECIMIENTOS

Al **Biól. Gabriel Olalde Parra** por darme la oportunidad de realizar el servicio social en su invernadero, por su gran apoyo, por sus enseñanzas académicas, por su bondad, por su paciencia, por su comprensión, por su amistad y por su gentileza. **Muchas gracias.**

Al **Dr. Gabriel Roldán Roldán** por brindarme su conocimiento, por sus enseñanzas académicas, por ser mi asesor dentro del taller de Biología de la Conducta, por su gran apoyo, por sus consejos, por su comprensión, por su tiempo y por su amistad sincera. **Muchas gracias.**

A la **Dra. María Catalina Gómez Espinosa** por su bondad, por su paciencia, por su afabilidad, por su comprensión, por ofrecerme su enorme apoyo en momentos muy complicados de mi vida, por sus valiosas enseñanzas académicas, por brindarme su amistad sincera y por su sencillez. **Siempre le estaré muy agradecida.**

A la **Dra. Alicia Silva Pineda** por su gentileza, por su tiempo, por su compromiso con los estudiantes, por brindarme su enorme apoyo en momentos muy difíciles de mi vida, por su comprensión, por su bondad, por sus valiosos consejos y por su confianza. **Siempre le estaré muy agradecida.**

A la **Lic. Martha Cariño Aguilar** por brindarme su gran apoyo y enseñanzas académicas, por su trato afable, por sus consejos valiosos y amistad sincera. **Muchas gracias.**

**A todos mis profesores de la licenciatura** por sus enseñanzas académicas valiosísimas, por su afabilidad, por su gran compromiso, entrega y dedicación a los estudiantes, por enseñarme valores muy importantes como la responsabilidad, la puntualidad, la autocrítica y dar el máximo esfuerzo en todas las tareas que nos propongamos, entre muchas otras cosas. **Siempre les estaré muy agradecida.**

## AGRADECIMIENTOS

***A mis amigos:***

***Denisse Melgar*** por ser mi gran amiga, por estar siempre a mi lado en el transcurso de toda la licenciatura, por todos tus consejos, por tu amistad valiosa y sincera, por tu paciencia y tiempo, por tu confianza, por tu enorme apoyo, por escucharme siempre, por tu comprensión y por tantos momentos de felicidad que vivimos. **Muchas gracias.**

***Rosaelaine Fragoso*** por tu gran amistad sincera, por tus grandes y sabios consejos, por estar siempre conmigo, por tu tiempo, por todos los momentos felices y divertidos que hemos vivido, por escucharme y por tus palabras de aliento.

***Omar Pozo*** por tu amistad sincera, por tu paciencia, por tu amabilidad, por tu objetividad, por tus sabios consejos, por todo tu apoyo en el laboratorio, por aceptar ser mi sinodal, por tus minuciosas correcciones y por tu gran compromiso en la revisión de la tesis. **Muchas gracias.**

***Janet García*** por tu apoyo en el ámbito académico y personal, por tu amistad sincera, por tus sabios consejos, por escucharme en momentos felices y complicados de mi vida.

***Gabriela Fuentes*** por tu amistad sincera, por todo tu apoyo en el laboratorio, por tus valiosos consejos y por tus palabras de aliento en momentos difíciles de mi vida.

# ÍNDICE

<b>GLOSARIO.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Aspectos epidemiológicos del Dengue.....	5
1.2 Características del virus Dengue y Ciclo replicativo.....	6
1.3 Manifestaciones clínicas de la enfermedad.....	12
1.4 Ciclo de transmisión del virus Dengue.....	18
1.5 Biología y Bionomía de <i>Aedes aegypti</i> .....	24
1.6 El canal alimentario del mosquito vector.....	35
1.7 El sistema reproductivo del mosquito hembra.....	45
<b>II. ANTECEDENTES</b>	
2.1 Receptores descritos para el virus Dengue en células de mamífero.....	56
2.2 Receptores descritos para el virus Dengue en células de mosquito.....	61
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>70</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>71</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>72</b>

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

7.1 Mantenimiento de la colonia de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> .....	73
7.2 Identificación del sexo en el mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	74
7.3 Disección de los tejidos del mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	74
7.4 Obtención del homogenado de tejidos y cuantificación de proteínas.....	76
7.5 Ensayo de proteínas de unión al virus (VOPBA).....	79
7.6 Espectroscopía de masas.....	81

## **VIII. RESULTADOS**

8.1 Identificación del sexo en el mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	82
8.2 Disección de los tejidos del mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	85
8.3 Cuantificación de proteínas del homogenado de tejidos.....	91
8.4 Ensayo de proteínas de unión al virus (VOPBA).....	92
8.5 Espectroscopía de masas.....	94

## **IX. DISCUSIÓN.....98**

## **X. CONCLUSIONES.....111**

## **XI. PERSPECTIVAS.....112**

## **REFERENCIAS.....113**

## **APÉNDICE.....119**

## GLOSARIO

**Abdomen.** Parte posterior de las tres divisiones principales del cuerpo de un insecto. En el mosquito adulto carece de apéndices locomotores.

**Adulto.** Insecto completamente desarrollado, sexualmente maduro; ímago.

**Ala.** Apéndice destinado a la propulsión aérea.

**Antena.** Primer par de apéndices, situado a cada lado de la cabeza de los insectos, generalmente formado por numerosos antenitos, cumple una función sensorial.

**Antenito.** Cada uno de los artejos o segmentos que forman la antena.

**Artralgia.** Dolor de articulaciones.

**Ascitis.** Es la presencia de líquido seroso en el espacio que existe entre el revestimiento membranoso del abdomen y los órganos abdominales (la cavidad peritoneal).

**Bionomía.** Asociación de las etapas del ciclo de vida de mosquitos con su medio ambiente.

**Cabeza.** Primera región del cuerpo de los insectos, en esta región se sitúan ojos, antenas y piezas bucales.

**Cefalea.** Se refiere al dolor localizado en cualquier parte de la cabeza.

**Cefalotórax.** En las pupas de los mosquitos, comprende la región globosa que cubre la cabeza y el tórax.

**Cerco.** Apéndice por lo general par, situado usualmente en el último segmento abdominal, normalmente delgado y filamentoso.

**Clásper.** Estructura propia de los insectos machos la cual es utilizada para sujetar a la hembra durante la cópula.

**Clípeo.** Esclerito en la parte inferior de la cara entre la frente y el labro; también llamado epistoma.

**Coxa.** Primer segmento basal de las patas, el cual se articula con el tórax.

**Coagulación Intravascular Diseminada.** Síndrome caracterizado por la presencia de alteraciones en la hemostasia, en el que se presenta una producción excesiva de trombos ó coágulos a nivel sistémico.

**Criadero.** Es todo ambiente acuático donde viven y se desarrollan las formas inmaduras del mosquito.

**Derrame pleural.** Acumulación patológica de líquido en el espacio pleural.

**Edema pulmonar.** Acumulación anormal de líquido en los pulmones, en especial en los espacios entre los capilares sanguíneos y el alveolo.

**Esclerito.** Funcionalmente es un término general para cada componente individual del exoesqueleto de los insectos en el que ha sido depositada la proteína esclerotina.

**Eritema.** Enrojecimiento de la piel condicionado por una inflamación debida a un exceso de riego sanguíneo mediante vasodilatación.

**Exoesqueleto.** Esqueleto externo continuo que recubre toda la superficie de los artrópodos (arácnidos, insectos, crustáceos, miriápodos y otros grupos relacionados), que cumple una función protectora, de respiración y mecánica, proporcionando el sostén necesario para la eficacia del aparato muscular.

**Balancines.** Par de apéndices clavados situados a cada lado del metatórax, su estructura es alargada, generalmente más grande en su extremo terminal. Son característicos de la Orden Díptera y son una modificación de las alas posteriores. Ayudan al insecto a guardar equilibrio durante el vuelo. También se denominan halterios.

**Hembra grávida.** Se refiere al mosquito hembra que posterior a la ingesta adecuada de sangre ha desarrollado un conjunto de huevos.

**Hembra nulípara.** Se refiere al mosquito hembra que nunca ha desarrollado un conjunto de huevos.

**Hipoperfusión.** Disminución del volumen de sangre que pasa por un órgano.

**Hipopigio.** Apéndice delgado, situado en el último segmento abdominal, que en los mosquitos machos está provisto del cláster.

**Mesonoto.** Placa dorsal del mesotórax de los insectos.

**Mesotórax.** Es el segundo de los tres segmentos del tórax de los insectos; se dispone entre el protórax y el metatórax. Su principales escleritos (placas exoesqueléticas) son el mesonoto (dorsal), el mesoterno (ventral) y las mesopleuras (laterales).

**Mialgia.** Dolor muscular que pueden afectar a uno o varios músculos del cuerpo.

**Omatidios.** Son unidades sensoriales formadas por células fotorreceptoras capaces de distinguir entre la presencia y la ausencia de luz. El conjunto de omatidios forman los ojos compuestos, presentes en algunos invertebrados como los insectos y los crustáceos. Cada omatidio es análogo al ojo de los vertebrados.

**Oogénesis.** Son las fases que conllevan a la transformación del conjunto de folículos en un conjunto de oocitos maduros.

**Tórax.** Segunda región del cuerpo de un insecto.

**Palpo maxilar.** Apéndice olfatorio que se encuentra en el maxilar superior de un insecto. Es importante señalar que la localización del huésped y el hábitat está mediada principalmente por claves olfatorias.

**Pedicelo.** Segundo segmento de la antena de un insecto.

**Prurito.** Hormigueo peculiar o irritación de la piel que conlleva un deseo de rascar la parte en cuestión.

**Probóscide.** Aparato bucal en forma de pico, dispuesto para la succión.

**Sifón.** Tubo anal respiratorio presente en las larvas del mosquito.

**UFP.** La unidad formadora de placa lítica, la cual se produce cuando una partícula viral infecta una célula, se replica y posteriormente provoca la lisis de dicha célula.

## RESUMEN

El virus Dengue (DENV) es el causante de una de las infecciones transmitidas por vector más importantes en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. La OMS estima que cada año se presentan entre 50-100 millones de casos de Dengue no severo y de 250,000 a 500,000 casos de Dengue severo y que el 55% de la población mundial se encuentra en riesgo de contraer la enfermedad. El DENV es transmitido al humano mediante la picadura de la hembra hematófaga de mosquitos del género *Aedes* durante la alimentación. Las especies más importantes son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, las cuales juegan un papel muy importante en el mantenimiento del DENV en la naturaleza, ya que se ha registrado la presencia del DENV en periodos interepidémicos, lo que sugiere que la transmisión vertical (transovárica) del virus en el mosquito puede ser un mecanismo importante mediante el cual el DENV pueda sobrevivir en estaciones frías y secas, durante la ausencia temporal de hospederos vertebrados infectados. Aunque se ha documentado la transmisión transovárica del DENV, aún se desconocen los posibles receptores del virus en los ovarios del mosquito hembra *Aedes aegypti*.

En el presente trabajo nos propusimos identificar las moléculas que interaccionan con el DENV, tanto en los ovarios del mosquito hembra *Aedes aegypti*, como en el tejido intestinal, el cual funciona como sitio inicial de replicación viral. Mediante ensayos de proteínas de unión al virus ó VOPBA, se identificaron once diferentes péptidos que reconocen al DENV-2, en los tejidos antes mencionados. Las proteínas fueron caracterizadas mediante análisis proteómico (espectroscopía de masas). Encontramos que los iones masa de las muestras corresponden a las siguientes proteínas: Prohibitina, anexina, HSP70, ATP sintasa, actina, gelsolina, miosina, tubulina, Rack-1, metaloproteinasas y carboxipeptidasa B. Con base tanto en los hallazgos experimentales del presente trabajo, como en la literatura previa, proponemos que estas proteínas puedan formar parte del complejo de internalización del DENV durante la infección tanto de las células epiteliales de los intestinos como de las células de los ovarios del mosquito hembra *Aedes aegypti*.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Aspectos epidemiológicos del Dengue

El virus Dengue (DENV) es el causante de una de las infecciones más importantes en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, predominando en las zonas urbanas y semiurbanas (Gubler y Kuno, 1997; OMS y TDR, 2009). Se estima que el 55% de la población mundial se encuentra en riesgo de contraer la enfermedad (Figura 1). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año se presentan 50-100 millones de casos de Dengue no severo y de 250,000 a 500,000 casos de Dengue severo (OMS y TDR, 2009).

La enfermedad es endémica en más de 124 países comprendidos en regiones de África, Las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. Las dos últimas son las regiones más afectadas. Se conocen dos formas de la enfermedad; el Dengue no severo y el Dengue severo que puede llegar a ser mortal (OMS y TDR, 2009).

Se estima que cada año se producen 500 000 hospitalizaciones por casos de Dengue grave, y una gran proporción de esos pacientes son niños. Aproximadamente un 2.5% de los afectados mueren. Sin un tratamiento adecuado, las tasas de letalidad de Dengue severo pueden superar el 20% (OMS y TDR, 2009).

El DENV es transmitido a los humanos por la picadura de la hembra hematófaga de mosquitos del género *Aedes*, las especies más importantes son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ya que están ampliamente distribuidas a nivel mundial (Gubler y Kuno, 1997; OMS y TDR 2009).

Hasta el momento no se cuenta con una vacuna para prevenir la enfermedad, ni con fármacos antivirales específicos contra el Dengue (Gubler y Kuno, 1997; OMS y TDR, 2009).

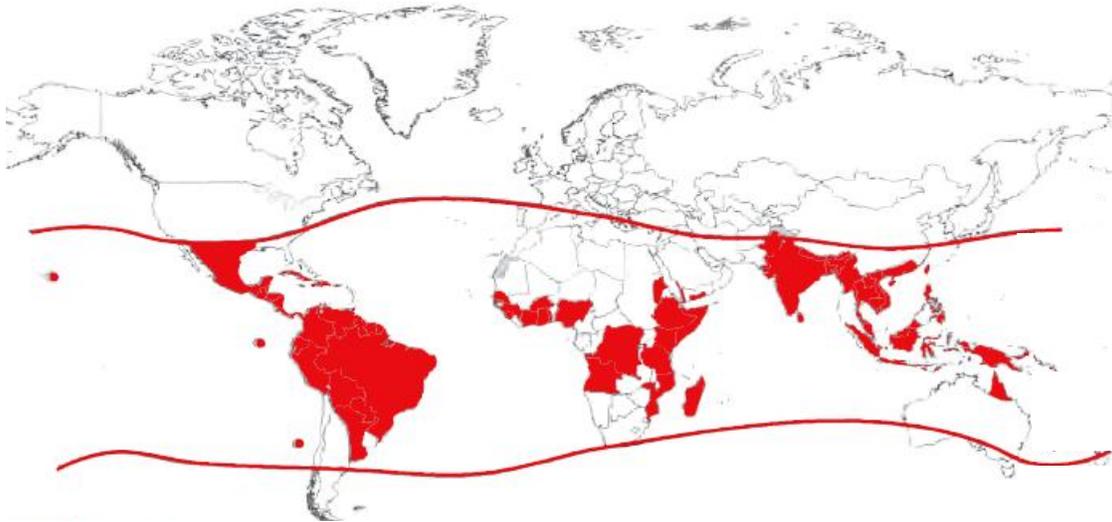


Figura 1. Áreas del mundo que se encuentran en riesgo de contraer Dengue (mostradas en rojo). Imagen adaptada de WHO y TDR, 2009.

En la naturaleza coexisten cuatro serotipos diferentes del virus Dengue, DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (Gubler y Kuno 1997; OMS y TDR, 2009). Los serotipos están antigénicamente relacionados pero no confieren protección cruzada, de tal manera que la infección con un serotipo, produce inmunidad protectora sólo para ese serotipo (OMS y TDR, 2009).

## 1.2 Características del virus Dengue

El virus Dengue es un arbovirus (*arbo* acrónimo del inglés *arthropod-borne*, transportado por artrópodos) que pertenece a la familia *Flaviviridae* (Figura 2), la cual incluye un número importante de patógenos humanos tales como la Fiebre Amarilla, el Virus del Oeste del Nilo, la Encefalitis japonesa y la Hepatitis C (Perera y Kuhn, 2008; Tomlinson *et al*, 2009). Esta familia contiene más de 70 miembros organizados dentro de tres géneros: *Flavivirus* (**lt** *flavus*, amarillo), *Pestivirus* (**lt** *pestis*, peste, plaga) y *Hepacivirus* (**gr** *hepato*,

hígado), más de la mitad de estos son transmitidos por mosquitos, once por garrapatas y para los demás no se conoce su vector (Tomlinson *et al*, 2009).

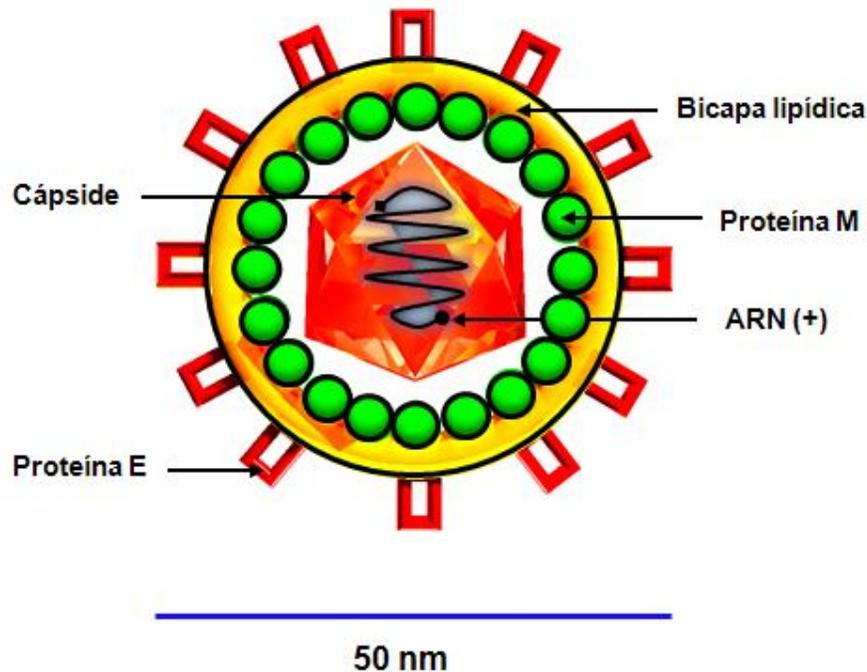


Figura 2. Representación esquemática del virus Dengue donde se muestran las proteínas estructurales que lo conforman (proteína E, bicapa lipídica, la proteína M y la cápside), así como el ARN de cadena sencilla de polaridad positiva.

Los virus dentro del género *Flavivirus* presentan características moleculares similares. Son virus con un genoma de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb, con un marco abierto de lectura (ORF) de más de 10000 nucleótidos. Flanqueando el ORF se encuentran dos regiones no codificantes una hacia el extremo 5' y otra hacia el extremo 3' (Tomlinson *et al*, 2009). El genoma viral codifica tres proteínas estructurales en el extremo 5' que incluyen la cápside (C), el precursor de la membrana (prM) y la envoltura (E), mientras que en el extremo 3' codifica siete proteínas no estructurales, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS4B y NS5 (Figura 3). La poliproteína de los *Flavivirus* es procesada tanto por la proteasa viral NS2B-NS3 como por una proteasa celular llamada peptidasa señal, dando lugar a las diez proteínas virales (Perera y Kuhn,

2008; Tomlinson *et al*, 2009). El ARN viral por ser de cadena sencilla y de polaridad positiva tiene la capacidad de funcionar como ARN mensajero (mARN) (Tomlinson *et al*, 2009). Los *Flavivirus* son partículas icosaédricas compuestas de una bicapa de lípidos, que se deriva de la célula infectada (retículo endoplásmico) y de una nucleocápside, en la que el ARN se encuentra rodeado por la proteína de la cápside (Clyde *et al*, 2006) (Figura 2). En los sobrenadantes de células infectadas, el DENV se encuentra tanto como una partícula madura como inmadura con un diámetro de 50 nm y 60 nm, respectivamente (Perera y Kuhn, 2008).

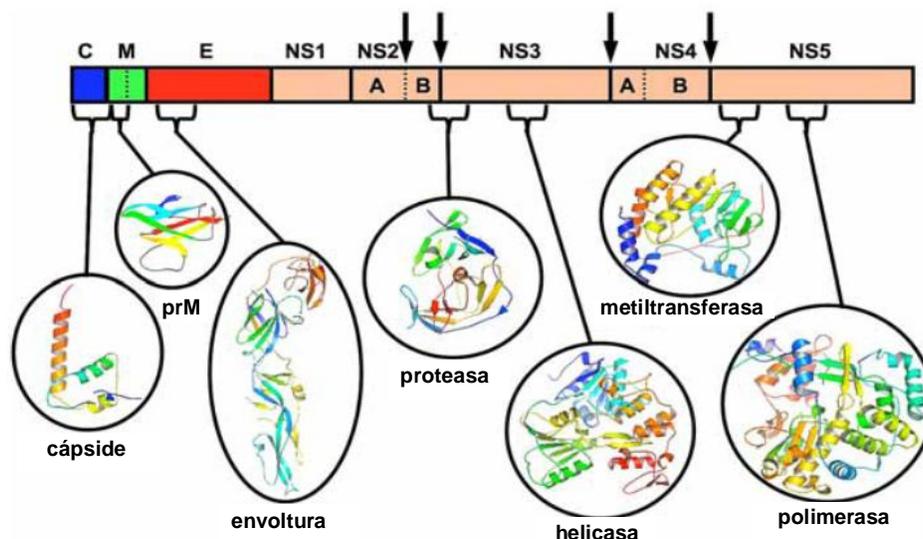


Figura 3. Elementos estructurales de la poliproteína del virus Dengue. Imagen adaptada de Tomlinson y colaboradores, 2009. Las flechas verticales indican los sitios de corte que realiza la proteasa NS2B-NS3.

### *Características de las proteínas estructurales*

Dentro de las proteínas estructurales, la **proteína C** es de las más pequeñas (14 kDa), la cual presenta carga positiva debido a que tiene numerosos residuos de Lisina y Arginina. La alta proporción de aminoácidos básicos tiene la función de neutralizar la carga negativa de la molécula del ARN viral con la cual está asociada. Es necesaria para el

empaquetamiento y la liberación de partículas virales maduras de la célula hospedera. Presenta un sitio hidrofóbico que promueve la asociación con la membrana del retículo endoplásmico durante el ensamblaje de la partícula viral (Tomlinson *et al*, 2009).

Existen dos formas de la **proteína M**: un precursor llamado prM el cual es una glicoproteína (19 kDa) que existe únicamente en los virus inmaduros y la proteína M (9 kDa) que la presentan sólo los virus maduros. La proteína M es una proteína integral de membrana, no glicosilada. Para que prM genere a la proteína M se debe llevar a cabo el corte del péptido por la proteasa celular furina (Tomlinson *et al*, 2009).

La **proteína E** (54 kDa) es una glicoproteína transmembranal constituida por tres dominios. La porción N-terminal del dominio I está localizado centralmente en la proteína E. El dominio II contiene el péptido de fusión involucrado en la fusión viral con la membrana del endosoma y en la liberación del genoma dentro del citosol de la célula hospedera. El dominio III es el sitio de unión al receptor de la célula hospedera, asimismo este dominio ha sido involucrado en la neutralización de los anticuerpos generados contra el virus. Además, la proteína E está implicada en el ensamblaje del virión (Tomlinson *et al*, 2009).

Una vez que el dominio III se ha unido a su receptor celular de alta afinidad, el virus se internaliza en la célula por medio de endocitosis dependiente de clatrina, tras la acidificación del endosoma tardío, la proteína E sufre cambios conformacionales que exponen el péptido de fusión ubicado en el dominio II y por lo tanto inducen la fusión del virus con la membrana del endosoma con lo cual se promueve la liberación de la nucleocápside dentro del citoplasma de la célula infectada (Clyde *et al*, 2006; Tomlinson *et al*, 2009).

#### *Características de las proteínas no estructurales*

La **proteína NS1** (45 kDa) es una glicoproteína que se expresa en tres formas: en el lumen del retículo endoplásmico y se colocaliza con el complejo de replicación viral, en la superficie de las células infectadas y de manera extracelular, es secretada lentamente en

células de mamíferos y no en las células de mosquitos. La proteína NS1 está glicosilada en dos sitios, N130 y N207 lo cual es necesario para la replicación viral en células de mosquito. Asimismo, las mutaciones de esta proteína pueden influir en la virulencia. También se le ha implicado en la evasión viral a través de la inhibición de la activación del complemento (Clyde *et al*, 2006; Perera y Kuhn, 2008).

La **proteína NS2A** (22 kDa) es pequeña e hidrofóbica y se considera que interactúa con el complejo de replicación. Asimismo, es un cofactor proteico de la proteína NS3 y es importante para la replicación viral (Perera y Kuhn, 2008).

La **proteína NS3**, es la segunda proteína viral más grande (70 kDa) y presenta la actividad de proteasa serínica que requiere la presencia de su cofactor proteico **NS2B**, siendo muy conservado entre la familia *Flaviviridae*. La función de proteasa se ha observado en asociación con NS2B para el procesamiento de la poliproteína viral (Perera y Kuhn, 2008). La proteína NS3, el cofactor proteico NS2B y la proteína NS5 forman el complejo de replicación viral (Tomlinson *et al*, 2009). Asimismo, la proteína NS3 exhibe la actividad de helicasa y NTPasa requeridas para la síntesis de ARN viral (Clyde *et al*, 2006). Se considera que la hidrólisis de NTP es requerida para la generación de energía química necesaria para la actividad de helicasa (Tomlinson *et al*, 2009). La helicasa es importante en el desdoblamiento del ARN genómico durante la replicación. Además, el dominio de helicasa presente en la proteína NS3 está involucrado en el ensamblaje del virus. Por otra parte, la proteína NS3 ha sido implicada en la inducción de apoptosis en las células infectadas (Perera y Kuhn, 2008).

La **proteína NS4A** (16 kDa) es la más pequeña de las proteínas no estructurales, también es hidrofóbica y funciona como un cofactor proteico de la proteína NS5 durante la replicación viral (Perera y Kuhn, 2008).

La **proteína NS4B** (27 kDa) es hidrofóbica y pequeña, asimismo es un cofactor proteico de la proteína NS5 importante durante la replicación del ARN viral a través de su interacción directa con la proteína NS3 (Perera y Kuhn, 2008).

La **proteína NS5** es la más grande (104 kDa) de las proteínas no estructurales y la más conservada entre los *Flavivirus* (presenta el 67% de identidad de secuencia entre los serotipos 1-4 del DENV), es una enzima bifuncional con un dominio de metiltransferasa en el extremo N-terminal y con un dominio de ARN polimerasa dependiente de ARN en el extremo C-terminal. Las funciones de metiltransferasa y ARN polimerasa dependiente de ARN son esenciales para la replicación viral (Clyde *et al*, 2006; Perera y Kuhn, 2008; Tomlinson *et al*, 2009).

## 1.2 Ciclo replicativo del virus Dengue

El primer paso en el proceso de infección de la célula blanco por el DENV es la interacción con la superficie celular, la cual está mediada por la proteína E del virus y los receptores de baja afinidad que concentran al virus en la superficie celular y facilitan su interacción con receptores de alta afinidad, los cuales, permiten la internalización del DENV a la célula hospedera (Figura 4) (Clyde *et al*, 2006; Tomlinson *et al*, 2009). El proceso de internalización se lleva cabo por endocitosis dependiente de clatrina (Acosta *et al*, 2008; van der Schaar *et al*, 2008). Una vez dentro del endosoma, el aumento de la concentración de iones hidrógeno provoca un cambio en el pH que induce modificaciones estructurales en la proteína E que promueven la fusión entre la membrana viral y la membrana endosómica, lo que conlleva a la liberación de la nucleocápside en el citoplasma (Modis *et al*, 2003). Posteriormente el genoma de ARN interactúa con la maquinaria celular que lleva a cabo la traducción del mRNA. De esta manera se sintetiza la poliproteína viral que se asocia a la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER). Asimismo, en forma co-traducciona ocurre el procesamiento proteolítico de esta poliproteína, principalmente por medio de la proteasa viral NS2B-NS3, dejando libre y de forma activa a la proteína NS5 (ARN polimerasa dependiente de ARN). La porción de la poliproteína viral que contiene las proteínas estructurales se asocia a la membrana del RER lo que conlleva a la formación de la cápside y la envoltura). La ARN polimerasa viral transcribe el genoma de polaridad positiva, posteriormente el genoma producido se asocia a la proteína C la cual se encuentra

en la membrana del RER. Este proceso es asistido por las proteínas NS4A y NS4B. El ensamblaje de las partículas virales ocurre en el RER que da como resultado la formación de partículas inmaduras que posteriormente son transportadas al aparato de Golgi donde ocurre el proceso de maduración a través de furinas celulares o mediante proteasas liberadas por la célula. Finalmente las partículas infecciosas son liberadas de las células mediante la vía exocítica (Clyde *et al*, 2006; Tomlinson *et al*, 2009).

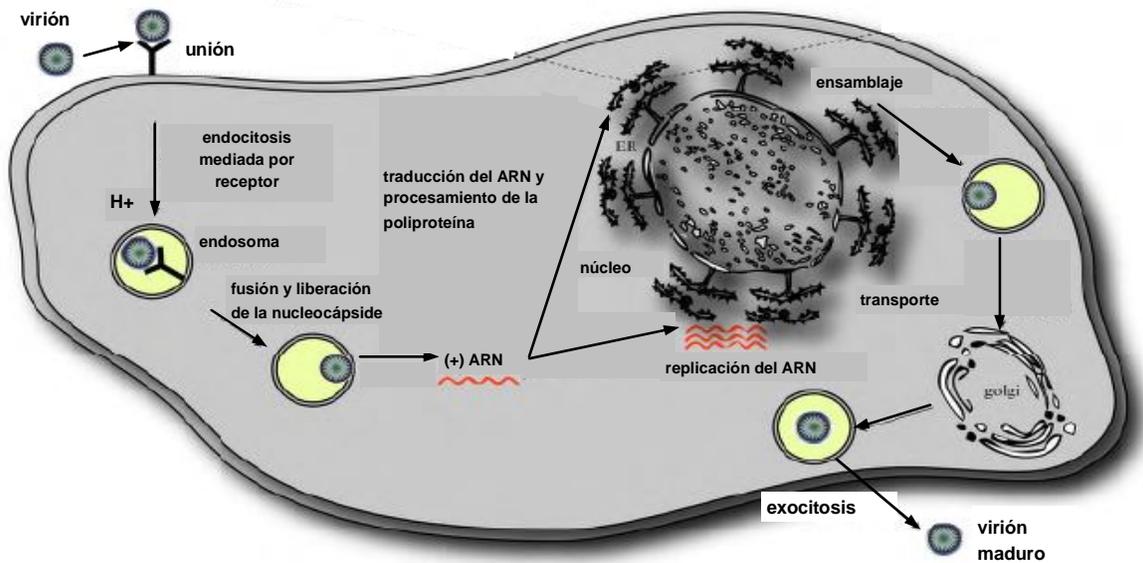


Figura 4. Ciclo replicativo de los *Flavivirus*. Imagen adaptada de Pastorino y colaboradores, 2010.

### 1.3 Manifestaciones clínicas de la enfermedad

La infección por el virus Dengue es una enfermedad sistémica y dinámica. Presenta un amplio espectro clínico que incluye manifestaciones clínicas no severas (se presentan en el 90-95% de los casos) y severas (se presentan en el 5-10% de los casos) (Figura 5) (OMS y TDR, 2009).

El Dengue no severo se caracteriza por la aparición repentina de fiebre y síntomas y signos inespecíficos tales como náuseas, vómito, cefalea, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias, erupción cutánea y debilidad generalizada (OMS y TDR, 2009).

Algunos casos de Dengue pueden evolucionar a una enfermedad grave, la cual se define por una o más de las siguientes condiciones: (i) extravasación de plasma que puede conducir a choque (choque por dengue) o acumulación de líquidos, con insuficiencia respiratoria o sin ella, ó ambas (ii) sangrado grave o deterioro grave de órganos, ó ambos. La rehidratación intravenosa es el tratamiento de elección; esta intervención puede reducir la tasa de letalidad a menos del 1% en los casos graves, pero sin el tratamiento oportuno la letalidad se incrementa hasta en un 20% (OMS y TDR, 2009).

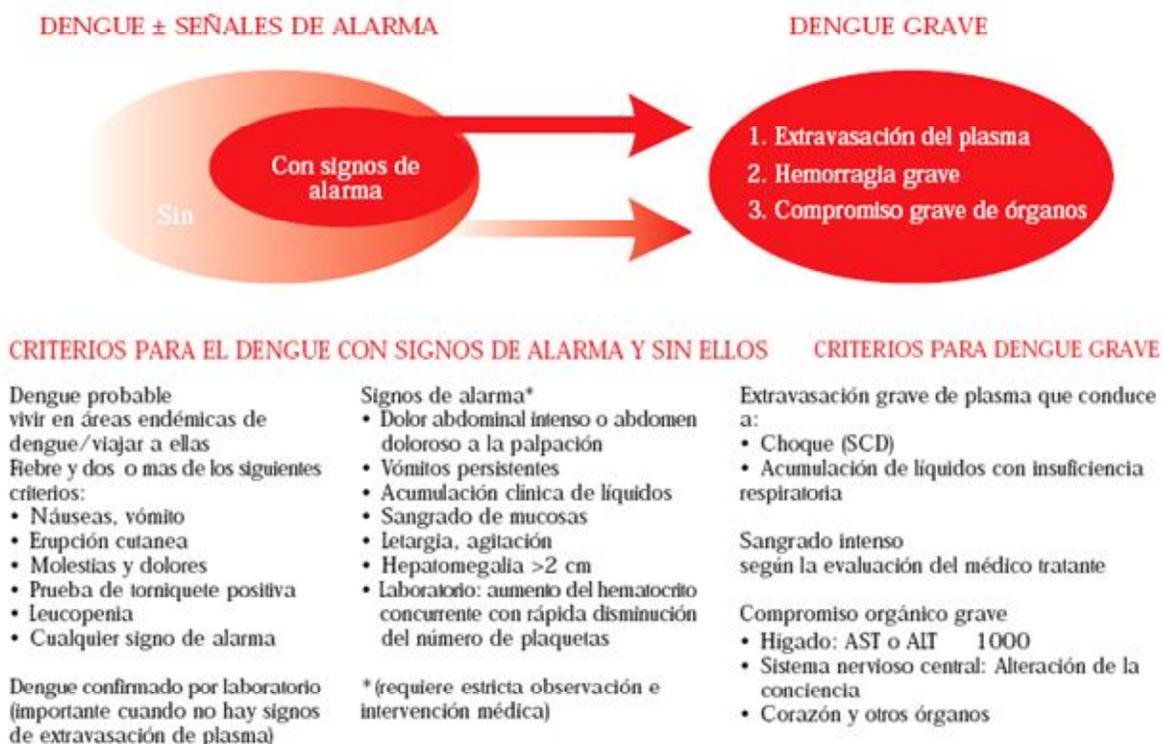


Figura 5. Clasificación de los casos de Dengue y niveles de gravedad. Imagen adaptada de la OMS y TDR, 2009.

Los casos de Dengue grave son más frecuentes en personas que ya padecieron Dengue por un serotipo determinado (infección primaria) y que se infectan nuevamente (infección secundaria) con un serotipo diferente al que le ocasionó la primera infección. Este fenómeno puede ocurrir hasta muchos años después de ocurrida la infección primaria, pero no implica necesariamente que toda infección secundaria conduzca a Dengue grave. No obstante, la infección primaria puede asociarse a Dengue grave, debido a la virulencia de la cepa o a otros factores del hospedero (OMS y TDR, 2009).

Después del período de incubación, la enfermedad inicia abruptamente, presentando tres fases de evolución: la febril, la crítica y la de convalecencia (OMS y TDR, 2009).

### *Fase febril*

Durante esta fase es común que los pacientes desarrollen fiebre elevada (38°C ó más) de forma abrupta. Su duración es variable (entre 3 a 6 días en niños y 4 a 7 días en adultos) y se asocia a la viremia, durante la cual existe una alta posibilidad de transmisión viral si la persona es picada por el mosquito vector. En esta etapa (Figura 6) el paciente puede presentar además de la fiebre, dolor corporal generalizado, mialgias, artralgias, cefalea y eritema. También son comunes la anorexia, las náuseas y el vómito. Durante la fase febril temprana, puede ser difícil distinguir clínicamente el Dengue de otras enfermedades febriles que no tienen relación con el Dengue (OMS y TDR, 2009).

Se pueden observar manifestaciones hemorrágicas leves, como petequias y sangrado de mucosas (por ejemplo, nasal y de las encías). El sangrado vaginal masivo (en mujeres en edad fértil) y el sangrado gastrointestinal pueden ocurrir en esta fase, pero no es lo común. El hígado a menudo está aumentado de tamaño y blando después de algunos días de fiebre. La anormalidad más temprana en el cuadro hemático es una reducción progresiva del número total de glóbulos blancos, lo cual debe alertar al médico de una elevada probabilidad de Dengue (OMS y TDR, 2009).

### *Fase crítica*

Alrededor del momento de la disminución de la fiebre (cuando la temperatura desciende a 37.5°C ó menos y permanece por debajo de este valor) usualmente en los días 3 a 7 de la enfermedad, se puede presentar un aumento en la permeabilidad capilar junto con valores incrementados del hematocrito. Esto marca el inicio de la fase crítica (Figura 6). El período de extravasación de plasma dura generalmente entre 24 y 48 horas (OMS y TDR, 2009).

La leucopenia progresiva (disminución del número de leucocitos totales por debajo de 4.000 - 4.500 /mm<sup>3</sup>) seguida de una rápida disminución del número de plaquetas usualmente precede la extravasación de plasma (escape de líquidos del espacio intravascular al intersticial). En este momento, los pacientes que no presentan aumento de la permeabilidad capilar mejoran, pero en los que hay vasodilatación se agravan como resultado de la pérdida del volumen plasmático. El grado de extravasación varía. Un aumento superior al valor de referencia del hematocrito (porcentaje ocupado por los glóbulos rojos del volumen total de la sangre) a menudo refleja la gravedad de la extravasación de plasma (OMS y TDR, 2009).

El choque se presenta cuando existe una pérdida crítica del volumen plasmático, y que a menudo está precedido por signos de alerta (Figura 5). La temperatura corporal puede estar por debajo de lo normal cuando ocurre el choque (OMS y TDR, 2009).

En el Síndrome de Choque por Dengue, la hipoperfusión resulta en deterioro orgánico progresivo, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada (OMS y TDR, 2009). Esto, además, puede favorecer la presencia de hemorragia (por consumo de los factores de la coagulación). En lugar de la leucopenia que se observa generalmente durante esta fase del Dengue, el número total de glóbulos blancos puede aumentar en los pacientes con sangrado grave. Además, se puede desarrollar un deterioro orgánico importante, con hepatitis, encefalitis, miocarditis, insuficiencia renal y sangrado grave, sin extravasación plasmática evidente o choque (OMS y TDR, 2009).

Los pacientes que llegan a la fase crítica de la enfermedad, sin un diagnóstico temprano y un tratamiento oportuno, pueden tener una mortalidad entre el 30% al 50%.

Aquellos pacientes que mejoran después de la disminución de la temperatura, presentan Dengue no grave. Los que empeoran, pueden presentar Dengue con signos de alerta (Figura 5). Estos pacientes probablemente se recuperarán con la rehidratación intravenosa temprana. Algunos casos pueden progresar a Dengue grave (OMS y TDR, 2009).

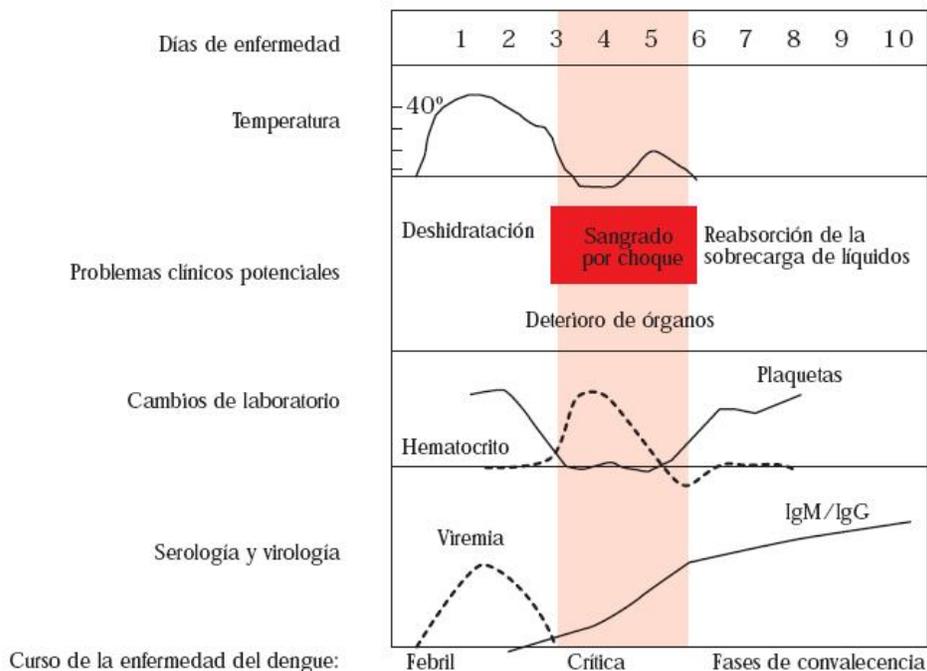


Figura 6. Fases de evolución durante la infección por Dengue. Imagen adaptada de la OMS y TDR, 2009.

### *Fase de recuperación*

Si el paciente sobrevive a la fase crítica (24 a 48 horas), en las siguientes 48 a 72 horas tiene lugar una reabsorción gradual de los líquidos del compartimiento extravascular. Mejora el estado general, disminuyendo los síntomas gastrointestinales y se normaliza la diuresis (eliminación urinaria). Algunos pueden presentar prurito generalizado (OMS y TDR, 2009).

El hematocrito se estabiliza o puede ser menor debido al efecto de dilución de los líquidos reabsorbidos. El conteo de leucocitos generalmente comienza a subir

inmediatamente después de la disminución de la fiebre, aunque la recuperación del número de plaquetas generalmente es posterior al del número de leucocitos (OMS y TDR, 2009).

La insuficiencia respiratoria y la ascitis pueden ocurrir en cualquier momento si se han administrado líquidos intravenosos en exceso. Durante la fase crítica y la fase de recuperación, el reemplazo excesivo de líquidos se relaciona con edema pulmonar o insuficiencia cardíaca (OMS y TDR, 2009).

### *Patogenia*

En relación con la patogenia de la enfermedad asociada al Dengue severo, se han planteado tres hipótesis para tratar de explicar las formas graves de la enfermedad:

La hipótesis de Halstead (1970), plantea que el Dengue severo ocurre en aquellas personas que ya tienen anticuerpos preformados contra algún serotipo del virus Dengue, los cuales, en presencia de un segundo serotipo infectante (diferente al de la primoinfección), permiten la formación de complejos inmunes (anticuerpos del primer serotipo más partículas virales del segundo serotipo) que se unirán a los receptores Fc de los monocitos y macrófagos, lo que permitirá que el virus Dengue se internalice y se replique en la célula hospedera. Asimismo, la activación de las células infectadas, favorece la producción de citocinas pro-inflamatorias que participan en el aumento de la permeabilidad vascular presente en el Dengue severo. La secuencia de infección DENV-1, DENV-2, DENV-3 seguida por DENV-2 está asociada con el incremento en el riesgo de presentar Dengue severo.

La hipótesis planteada por Rosen (1977), fue propuesta con base en la presencia de casos de Dengue severo en el curso de una epidemia de Dengue primario, en los cuales, se demostró que las personas infectadas no habían estado expuestas al DENV anteriormente, por lo que independientemente del estatus inmunológico del huésped, los factores virales podían jugar una papel importante. Así, para tratar de explicar estos casos, Rosen planteó que la variabilidad antigénica que sufren las cepas mientras circulan en la naturaleza, es decir, del humano al mosquito y del mosquito al humano, es un componente importante en

la aparición de los casos desafortunados de la enfermedad. Rosen propone que los aislados virales pueden sufrir mutaciones en una región específica del gen que codifica para la proteína E lo que podría conducir a la atenuación o la reversión de la virulencia de una cepa dada. De esta manera las cepas más virulentas son las responsables de los síntomas graves que se observan en el Dengue severo.

La hipótesis integral planteada por Kourí y colaboradores (1987), incluye factores de riesgo individual relacionados con la existencia de anticuerpos dirigidos contra el virus Dengue, la edad, el sexo, la raza y las enfermedades crónicas como el asma, la anemia por células falciformes ó drepanocitosis y la diabetes; factores de riesgo epidemiológicos relacionados con el vector (alta densidad), el intervalo entre ambas infecciones, la amplia circulación viral y factores relacionados con el serotipo y la virulencia del agente. La presencia o ausencia de estos factores individuales en el contexto de los factores epidemiológicos y virales hacen posible que se incremente el riesgo de una epidemia de Dengue severo.

#### **1.4 Ciclo de transmisión del virus Dengue**

El ciclo replicativo del virus Dengue es mantenido en la naturaleza a través de los mosquitos (hembra) hematófagos del género *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti*, los cuales transmiten al virus entre los hospederos vertebrados. El vector se infecta con el DENV a través de dos mecanismos: a) ingiriendo la sangre de un hospedero vertebrado virémico (necesaria para el desarrollo de sus huevos) y b) mediante la transmisión transovárica (el virus, atraviesa los ovarios y entra a los folículos, los cuales se desarrollarán hasta convertirse en huevos). En el ciclo de transmisión, el virus Dengue debe infectar y replicarse en el mosquito hembra para poder ser transmitido a un nuevo hospedero vertebrado y posteriormente a otro mosquito vector (Marquardt, 2005).

El periodo comprendido desde la ingesta del virus por parte del vector hasta su posterior transmisión a un hospedero humano se conoce como periodo extrínseco de

incubación, contrario al periodo intrínseco, que se presenta desde el inicio de la infección del huésped hasta la aparición de la enfermedad (Figura 7) (Marquardt, 2005). Durante el PEI, el intestino medio del mosquito hembra *Ae. aegypti* es el tejido inicial que se infecta con el DENV, el cual lleva a cabo su primer ciclo replicativo en el interior de las células epiteliales del intestino medio. Las nuevas partículas virales se liberan y alcanzan el hemocele y la hemolinfa, teniendo así acceso a diferentes tejidos del mosquito hembra como: la tráquea, el cuerpo graso (región abdominal, torácica y cefálica), el esófago, los hemocitos, el omatidio, el tejido nervioso, los tubos de Malpighi, las glándulas salivales (Salazar *et al*, 2007; Figura 8), el cerebro, el intestino posterior y los ovarios (Linthicum *et al*, 1996; Figura 9).

Sin embargo, existen diferentes tejidos que no son infectados por el DENV, como son la musculatura que rodea el intestino medio, los divertículos dorsales y el divertículo ventral, sugiriendo la existencia de un tropismo selectivo en el mosquito hembra como ocurre en el humano (Linthicum *et al*, 1996; Salazar *et al*, 2007). El estudio llevado a cabo por Salazar y colaboradores (2007) sugiere que el sistema traqueal (tráqueas y traqueolas) provee de una ruta en la cual el DENV-2 se disemina del intestino medio al hemocele, para posteriormente dispersarse a otros órganos y tejidos. Una vez que las glándulas salivales se infectan y los viriones son depositados en los conductos salivales (Figura 10), el virus puede ser transmitido a un hospedero humano durante la alimentación sanguínea (Marquardt, 2005). La primera región de las glándulas salivales (Figura 8) que se infecta por el DENV-2 es la región distal de los lóbulos laterales, posteriormente el virus Dengue infecta el lóbulo medio y la región proximal de los lóbulos laterales (Salazar *et al*, 2007) (para ubicar las regiones de las glándulas salivales véase Figura 10). Además, si los folículos en desarrollo se infectan, el virus puede ser transmitido a la progenie del mosquito vector (transmisión transovárica) (Marquardt, 2005).

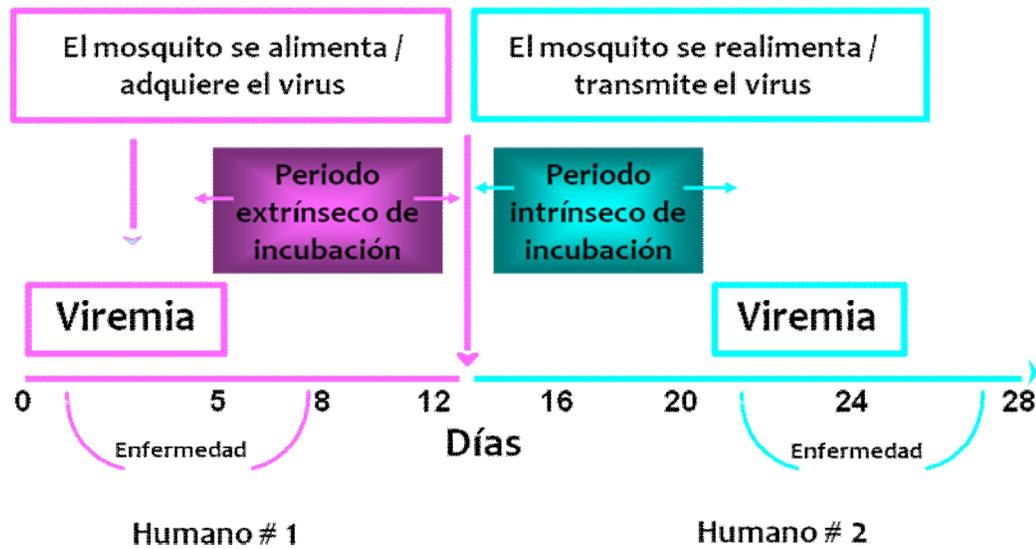


Figura 7. Diagrama que esquematiza tanto el periodo extrínseco de incubación (PEI) como el periodo intrínseco. El PEI inicia cuando el mosquito hembra adquiere el virus al alimentarse de la sangre de un humano virémico, por lo que el DENV se replica en los tejidos del mosquito y cuando este se re-alimenta puede infectar a otro humano. Imagen adaptada de PAHO (Organización Panamericana de la Salud: [www.paho.org](http://www.paho.org)).

Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han indicado la presencia de la transmisión transovárica en el mosquito *Ae. aegypti*. Akbar y colaboradores (2008) realizaron colectas de campo en la ciudad de Bandung y sus alrededores de larvas de *Ae. aegypti* y las mantuvieron en condiciones de insectario hasta convertirse en adultos, posteriormente demostraron mediante ensayos de RT-PCR la presencia del DENV-2 en los mosquitos adultos, lo cual indica el potencial de *Ae. aegypti* para transmitir al DENV transováricamente. Asimismo, Günther y colaboradores (2007) llevaron a cabo colectas de campo de larvas de *Ae. aegypti* y las mantuvieron en condiciones de insectario hasta convertirse en adultos, y demostraron mediante ensayos de RT-PCR la presencia del DENV-2,-3 y -4 en el mosquito adulto *Ae. aegypti* en dos localidades de Oaxaca endémicas para Dengue: Tuxtepec y Juchitán. Los resultados sugieren fuertemente que el virus Dengue puede ser transmitido transováricamente (verticalmente). Se sugiere que la transmisión transovárica del virus en el vector, puede jugar un papel importante en el

mantenimiento del virus en la naturaleza. Asimismo, este puede ser el mecanismo por el cual, el DENV sobrevive en estaciones frías y secas (periodos interepidémicos), durante la ausencia temporal de hospederos vertebrados infectados (Akbar *et al*, 2008).

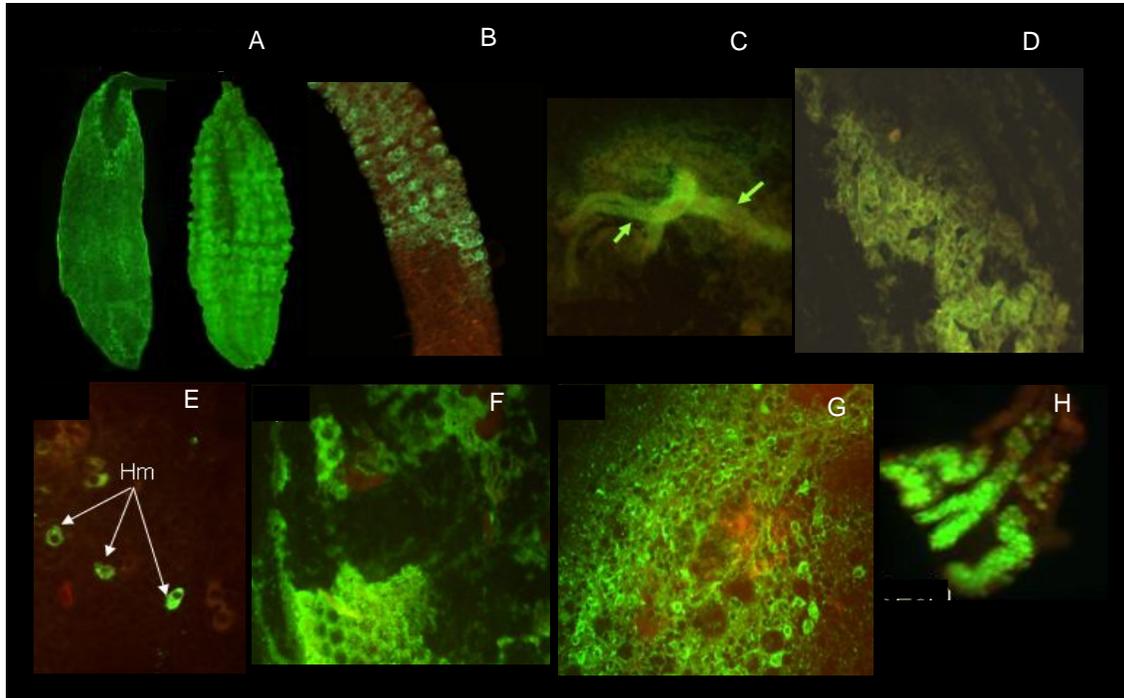


Figura 8. Tejidos del mosquito hembra *Ae. aegypti* infectados con el DENV-2. El antígeno viral DENV-2 (verde) fue detectado en los diferentes tejidos mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta. A, estómago; B, región anterior del intestino medio; C, tráqueas, señaladas con flechas verdes; D, cuerpo graso asociado al abdomen; E, hemocitos, señalados con flechas blancas; F, omatidio del ojo compuesto; G, tejido nervioso y H, glándula salival. Imagen adaptada de Salazar y colaboradores, 2007.

Cuando el virus Dengue se replica y disemina en el mosquito hembra, este permanece infectado durante toda su vida (Marquardt, 2005). La duración del PEI en el mosquito hembra *Ae. aegypti* es de 7-12 días (Salazar *et al*, 2007). Asimismo, la duración del PEI en el mosquito vector depende de la temperatura ambiental, por lo que las temperaturas elevadas acortan el PEI (Marquardt, 2005).

En el sistema vector-arbovirus existen múltiples barreras que impiden una infección productiva en el mosquito. Se denomina una infección productiva cuando el virus infecta una célula permisiva y se replica exitosamente en ella, lo que conlleva a la producción de una progenie viral capaz de infectar otras células. La presencia o ausencia de estas barreras determina parcialmente la competencia vectorial de un artrópodo, la cual se define como la capacidad intrínseca que posee un vector en referencia a la infección, replicación y transmisión de un virus. Es importante mencionar que en el sistema vector-arbovirus, el virus debe atravesar primero las múltiples barreras presentes en su vector para poder ser transmitido a un hospedero vertebrado (Marquardt, 2005).

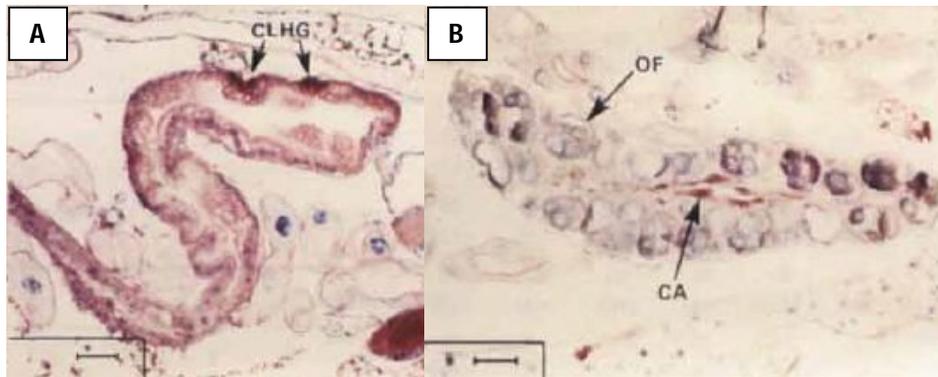


Figura 9. Preparaciones inmunocitoquímicas de tejidos (secciones sagitales) del mosquito hembra *Ae. aegypti* infectados con el DENV-3. A, intestino posterior infectado; B, ovario infectado. El antígeno viral DENV-3 se observa en color rojo. CA, cáliz; CLHG, línea cuticular del intestino posterior; OF, folículo del ovario. Imagen adaptada de Linthicum y colaboradores, 1996.

La barrera del intestino medio es un impedimento para una infección viral productiva, esta barrera ha sido reconocida como el principal determinante de la competencia vectorial. La barrera de infección del intestino medio se refiere a que las células epiteliales son resistentes a la infección, es decir, cuando no son susceptibles a la infección viral. Por ejemplo, las células resistentes (ó refractarias) pueden carecer de los receptores apropiados para que el virus se internalice en la célula y se lleve a cabo la infección viral (Marquardt, 2005).

Asimismo, la barrera de escape del intestino medio se refiere a cuando el virus logra internalizarse en la célula epitelial, y se lleva a cabo la replicación, sin embargo el virus no puede atravesar la membrana basal y por lo tanto no llega al hemocele para diseminarse exitosamente e infectar otros órganos (Marquardt, 2005).

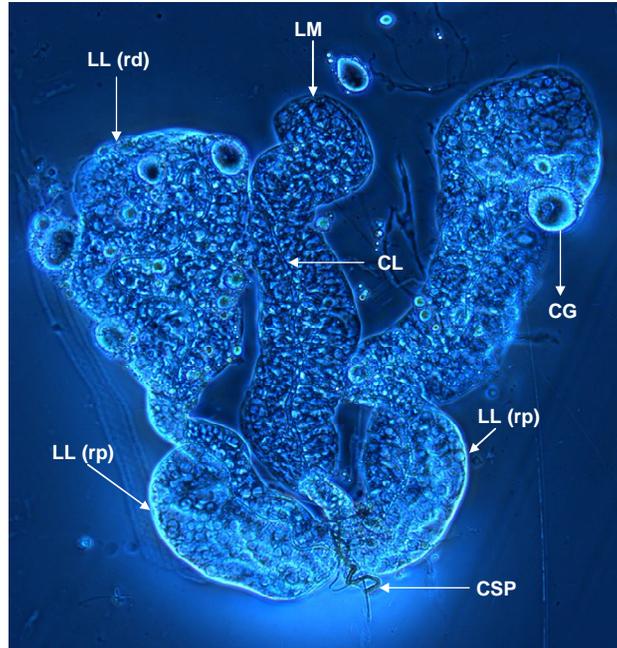


Figura 10. Glándula salival del mosquito *Aedes aegypti*. CG, cuerpo graso; CL, conducto del lóbulo; CSP, conducto salival principal; LL (rp), lóbulo lateral región proximal; LL (rd), lóbulo lateral región distal; LM, lóbulo medio. Imagen capturada por la autora del presente trabajo con el microscopio invertido Olympus IX71. Filtro PH2 contraste de fases. Objetivo 10x.

Existen varias hipótesis que intentan explicar la barrera del intestino medio. Se propone que los artrópodos resistentes poseen mecanismos específicos de defensa para protegerse contra las infecciones virales. Entre ellos se encuentran los agentes antivirales tales como los mucopolisacáridos que se secretan en el intestino medio. La inactivación viral y el procesamiento de la glicoproteína viral de superficie, mediante las enzimas secretadas en el intestino medio es otra explicación potencial para la barrera de infección. Asimismo, algunos patógenos como los nematodos son eliminados después de que entran

en el hemocele mediante factores inmunitarios propios del vector, como la melanización (Marquardt, 2005).

Por otra parte, existe la barrera de infección en las glándulas salivales y se refiere a que las células epiteliales son resistentes a la infección viral por lo que no se llevará a cabo la internalización del virus a la célula. La barrera de escape en las glándulas salivales, se refiere a cuando las células son infectadas, sin embargo el virus es incapaz de llegar al conducto salival (Marquardt, 2005).

La barrera de infección en el ovario también existe y se presenta cuando el virus proveniente del hemocele es incapaz de atravesar la pared de los ovarios e infectar los folículos. La transmisión transovárica del virus Dengue se presenta en el mosquito *Ae. aegypti*, sin embargo poco se conoce a cerca de las bases moleculares de las barreras de infección y escape en el ovario (Marquardt, 2005).

### **1.5 Biología y Bionomía de *Aedes aegypti***

Es esencial conocer los principios básicos de la Ecología y la Biología de *Ae. aegypti* en la aplicación de medidas de prevención y control del mosquito. Se ha acuñado el término bionomía para explicar las asociaciones de todas las etapas del ciclo de vida del mosquito con su medio ambiente, es decir, cuáles son las fuentes de alimento sanguíneo preferidas, qué cuerpos de agua selecciona para depositar sus huevos, qué sitios de reposo prefiere y cuál es el periodo extrínseco de incubación del virus Dengue en el mosquito (Fernández, 1999).

#### *Distribución geográfica*

Los vectores del virus Dengue son los mosquitos del género *Aedes* (Figura 11), y la especie más importante en la transmisión es *Aedes aegypti*, ya que es la más distribuida en el mundo. (Gubler y Kuno, 1997). Su distribución geográfica abarca una extensa franja tropical y subtropical, entre Estados Unidos, toda América hasta Argentina. Se encuentra en

cerca de 100 países tropicales, y cubre la mayor parte de África, Medio Oriente, Sudeste Asiático, norte de Australia, e incluso algunas zonas de Europa. Otro vector de importancia epidemiológica es *Aedes albopictus*, el cual se distribuye en Asia y el Pacífico (Gubler y Kuno, 1997; OPS, 1995).



Figura 11. Mosquitos vectores del virus Dengue.

*Aedes aegypti* es una especie tropical y subtropical cuya distribución se limita a latitudes comprendidas entre los 35° N y los 35° S, correspondientes a una isoterma de 10° durante el invierno; y aunque ha sido encontrado hasta los 45°, su presencia en esta latitud se debe a invasiones durante la estación cálida, no soportando el invierno. La distribución de *Ae. aegypti* también está limitada por la altitud. Aunque generalmente no se localiza por encima de los 1000 msnm, se ha observado a 2121 msnm en la India, incluso a 2,400 msnm en Eritrea (noreste de África) y en Colombia ha sido reportado en los programas de vigilancia entomológica hasta los 2200 msnm, donde la temperatura media anual es de 17°C (OPS, 1995).

## *Ciclo biológico*

*Ae. aegypti* como todos los mosquitos, tiene dos etapas bien diferenciadas en su ciclo biológico (Figura 12): la fase acuática con tres formas evolutivas diferentes (huevo, larva y pupa) y la fase aérea (adulto o ímago) (Christophers, 1960).

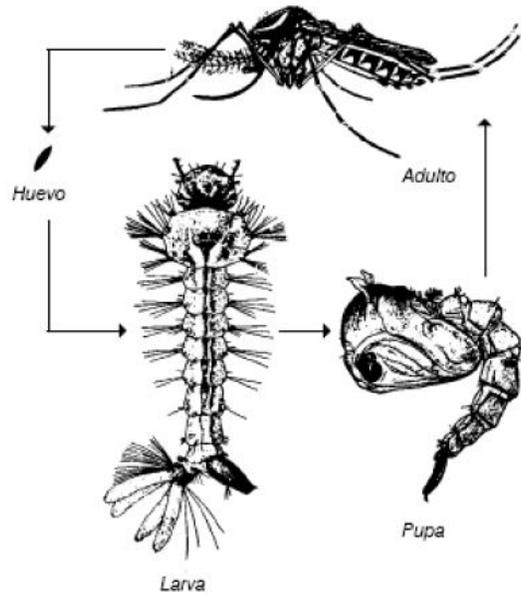


Figura 12. Ciclo biológico de *Ae. aegypti*. Imagen adaptada de Eiman y colaboradores, 2008.

## *El huevo*

Los huevos de *Ae. aegypti* son alargados, en general elípticos, miden aproximadamente 0.6-0.8 mm de longitud, son depositados uno a uno, inmediatamente por encima del nivel del agua quedando adheridos a las paredes del recipiente (Figura 13). Al momento de la ovipositura, los huevos son grises y suaves, sin embargo se oscurecen después de algunas horas (Clements, 1992).

El desarrollo embrionario dura 48 horas en climas húmedos y cálidos, si la temperatura es baja, se prolonga hasta por cinco días. Al concluir el desarrollo embrionario, el embrión

dentro del huevo es capaz de soportar largos periodos de desecación y temperaturas extremas, manteniéndose viables por días, semanas, meses, y a veces hasta por dos años. Para que los huevos eclosionen es necesario un estímulo, generalmente es el agua que los embebe, no obstante el mecanismo más específico que se acepta es la disminución de oxígeno disuelto en el agua del criadero. El oxígeno disuelto comienza a reducirse debido a diversos factores: a) la caída violenta de las gotas de lluvia y el movimiento que produce y b) la presencia de microorganismos en la materia orgánica, hojas secas y hierba, los cuales inician sus procesos de alimentación y respiración. La eclosión ocurre aproximadamente a los 15 minutos (Christophers, 1960; Clements, 1992).



Figura 13. Huevos de *Ae. aegypti* (Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca), ovipositados en papel filtro. Imagen capturada por la autora del presente trabajo con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 35x.

La resistencia de los embriones de *Ae. aegypti* a la desecación es uno de los principales problemas para los programas de control, debido a que no están consideradas medidas ovicidas, asimismo permiten que sean transportados a grandes distancias en recipientes

secos, posibilitando la reinfestación de lugares ya controlados o la infestación de zonas previamente libres del vector (Gubler y Kuno, 1997; OPS, 1995).

### *La larva*

Los huevos eclosionan dando lugar a las formas larvarias, las cuales son acuáticas, fotofóbicas, de respiración aérea, y se alimentan de protozoarios de vida libre y de microalgas, para lo cual utilizan las cerdas bucales que tienen en forma de abanico. Presentan cabeza y tórax ovoide, el abdomen consta de diez segmentos (Christophers, 1960; Rueda, 2004) (Figura 14). El segmento posterior (anal) del abdomen posee un sifón corto para la respiración en la superficie del agua (Chapman, 1998; Christophers, 1960). La posición de reposo en el agua es casi vertical y se desplazan en el agua con un movimiento serpenteante característico. Los estadios larvales comprenden el periodo de crecimiento y desarrollo. A medida que las larvas crecen y se desarrollan, deben mudar su exoesqueleto tres veces, atravesando, en consecuencia por tres estadios larvales, al cabo de los cuales alcanzan una longitud de aproximadamente 0.8 cm (Christophers, 1960).

La duración del desarrollo larval está en función de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad larvaria en el criadero. En condiciones óptimas (25°C a 29°C), el periodo larval desde la eclosión hasta la pupación puede ser de cinco días, sin embargo de manera general ocurre de siete a catorce días. Las larvas no pueden resistir temperaturas inferiores a 10°C ó superiores a 45°C, una temperatura menor a 13°C interrumpe el cambio a fase de pupa. Las larvas y las pupas de los machos se desarrollan más rápido que las hembras, para garantizar la fecundación (Christophers, 1960).

La especie es particularmente vulnerable durante este periodo, ya que las inundaciones, escurrimientos o drenaje y secado prematuro de los criaderos (Figura 15) son responsables del mayor porcentaje de mortalidad de las fases inmaduras. Muchos recipientes en desuso que sirven como criaderos son pequeños (por ejemplo, neumáticos, botellas de plástico) y se encuentran al aire libre, por lo que resultan vulnerables al secado por el sol, a inundaciones y desbordamiento por lluvia (OPS, 1995).

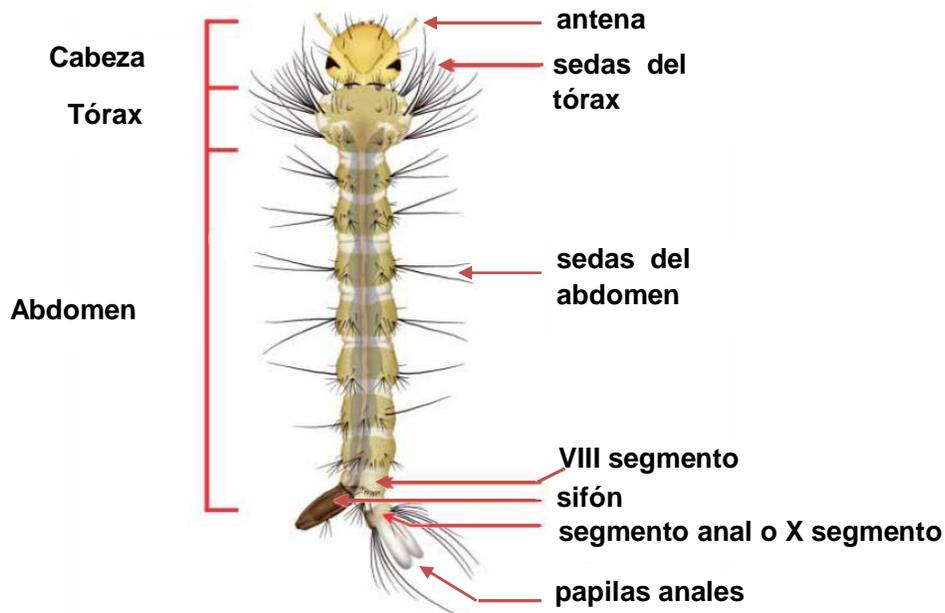


Figura 14. Vista dorsal de la larva del mosquito *Aedes*. *sp.* (segmento octavo y anal, vista lateral). Imagen adaptada de Rueda, 2004.

### *La pupa*

Cuando la larva del cuarto estadio muda, secreta una cubierta alrededor de su cuerpo que finalmente la encierra cambiando así a la fase de pupa (Figura 16). El cuerpo de la pupa está dividido en cefalotórax y abdomen. En la base del cefalotórax dispone de un par de tubos o trompetas respiratorias que atraviesan la superficie del agua para permitir la respiración, en la base del abdomen posee un par de aletas natatorias que le permiten desplazarse en el agua. Reacciona inmediatamente a estímulos externos y se mantiene en la superficie del agua debido a su flotabilidad, propiedad que favorece la emergencia del mosquito adulto (Chapman, 1998; Christophers, 1960).

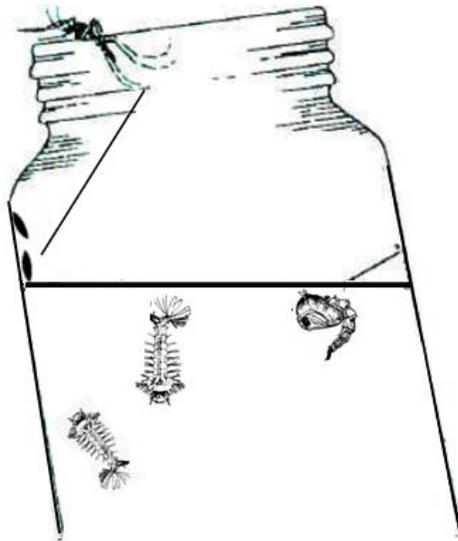


Figura 15. Criadero de mosquitos *Ae. aegypti*. Imagen adaptada de CDC (Centers for Disease Control and Prevention: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

La fase de pupa es un periodo de transición en el que ocurren profundas transformaciones que conducen a la formación del adulto y al cambio de hábitat acuático por el terrestre. Durante esta fase, el individuo no se alimenta y los cambios que ocurren son posibles debido a la energía acumulada durante la fase de larva. La fase de pupa dura aproximadamente dos o tres días, emergiendo alrededor del 88% de los adultos en cuestión de 48 horas.

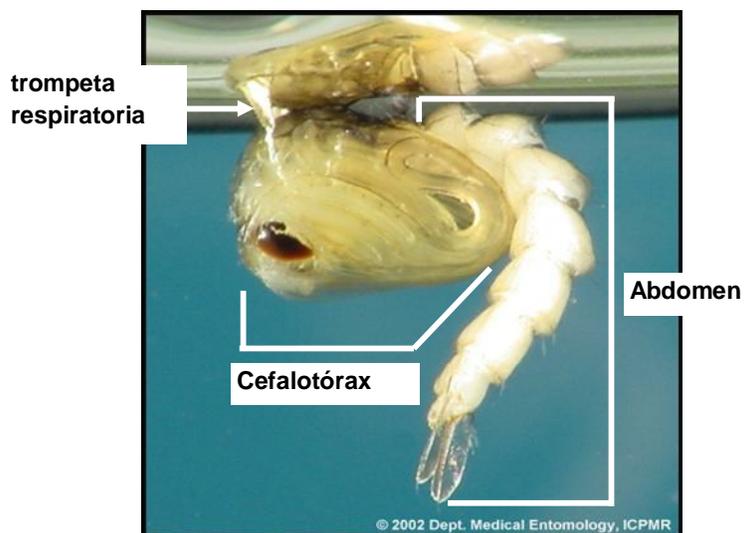


Figura 16. Vista lateral de la pupa del mosquito *Ae. aegypti*.

### *El adulto*

En general, se considera al mosquito *Ae. aegypti* como una especie doméstica, debido a que prolifera en recipientes artificiales encontrados en las viviendas o en sus alrededores. Únicamente las hembras son hematófagas, se alimentan de sangre humana o de animales domésticos que detectan por estímulos visuales, olor, temperatura, concentración de CO<sub>2</sub>, movimientos y tamaño, entre otros (Christophers, 1960).

*Ae. aegypti* es un mosquito que pertenece a la familia *Culicidae*, es de color oscuro (castaño oscuro o negro) con manchas blancas y plateadas. Posee escamas blancas en el clípeo y en los palpos maxilares. En el tórax (mesonoto) presenta un dibujo característico en forma de lira (Figura 17). Las patas están conspicuamente bandeadas (en el tarso y fémur) y el último tarsómero de las patas posteriores es blanco.

El cuerpo de la hembra mide, 3.5-5.0 mm de longitud, los machos son de menor tamaño 3.0-4.5 mm, presenta antenas con numerosos artejos y alas delgadas ornamentadas por escamas blancas. Presenta definida la región cefálica, torácica y abdominal y posee exoesqueleto de quitina con escleritos (Christophers, 1960).

El tórax está formado por tres segmentos fusionados: el protórax, donde se insertan las patas frontales; el mesotórax, donde se ubican las alas funcionales y el segundo par de patas; y el metatórax, con los balancines y las patas posteriores (Christophers, 1960).

El abdomen es alargado cilíndricamente y está conformado por ocho segmentos. Los últimos dos segmentos están modificados para la reproducción y la ovipostura. El octavo segmento consta de dos pequeños cercos dorsales (Christophers, 1960).

Las formas adultas presentan dimorfismo sexual, pueden diferenciarse machos y hembras mediante las características de las antenas y los palpos maxilares. Los machos presentan las antenas plumosas mientras que las antenas de las hembras son simples. Los

palpos maxilares de las hembras son pequeños mientras que los palpos maxilares de los machos son grandes (Christophers, 1960; Marquardt, 2005).

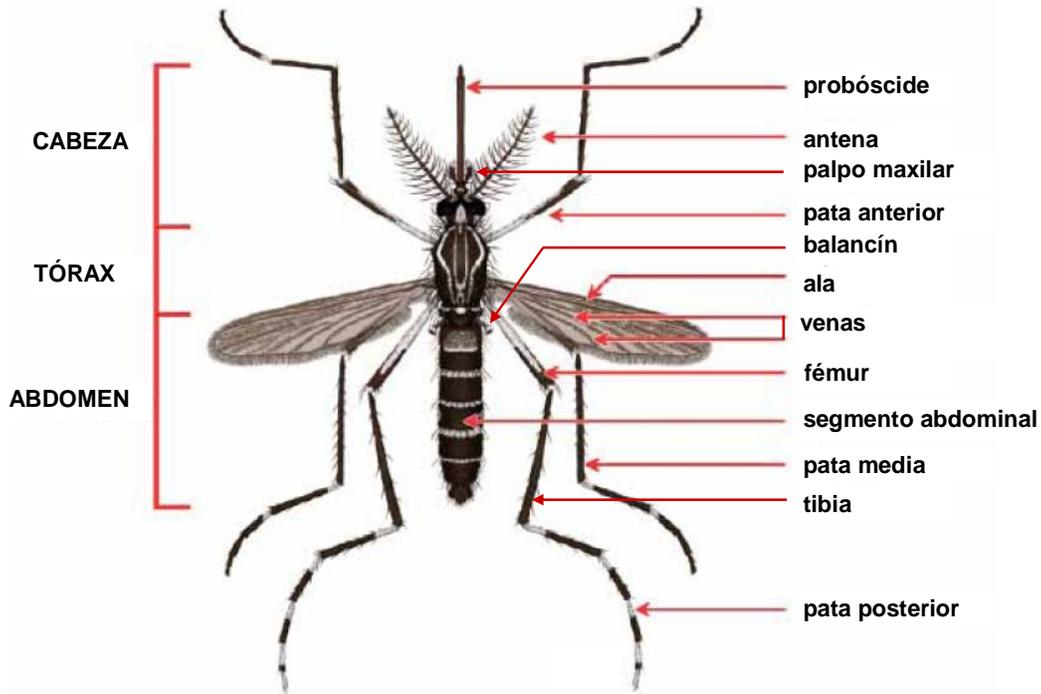


Figura 17. Vista dorsal del mosquito hembra adulto *Aedes aegypti*. Imagen adaptada de Rueda, 2004.

*Ae. aegypti* es un mosquito que presenta una actividad diurna de alimentación. Chadee y colaboradores (1988) describieron en la isla de Trinidad el bioritmo de picadura de *Ae. aegypti*. Con el método de capturas humanas definieron un patrón bimodal, es decir, con dos picos de máxima actividad. El primer pico se observó entre las 6:00 y 7:00 de la mañana, mientras que el segundo pico se observó en la tarde de las 17:00 a 18:00 horas (revisado en Fernández, 1999).

Aunque las hembras se alimentan de una gran variedad de vertebrados es marcada su preferencia por los humanos, a quienes pican en general en más de una ocasión entre cada ovipostura, sobre todo si son perturbadas antes de la repleción (1.5 a 6  $\mu$ l de sangre), lo que aumenta las probabilidades de ingerir y transmitir el virus Dengue (Clements, 1992; Gubler

y Kuno, 1997). Para producir sus huevos, es indispensable que la hembra se alimente de sangre (Figura 18).

Se estima que más del 90% de la sangre ingerida corresponde a sangre humana, mientras que el 10% corresponde a animales domésticos como perros y gatos (Fernández, 1999). Las piezas bucales del macho no se encuentran adaptadas para succionar sangre, sino que se alimentan de carbohidratos que obtienen de las plantas (néctar, exudado de frutos maduros), las hembras también se alimentan de esta misma fuente como complemento indispensable (Christophers, 1960).

Se denomina ciclo gonotrófico al intervalo que transcurre entre la alimentación sanguínea y la ovipostura el cual varía de tres a cinco días, dependiendo de la temperatura ambiental (Marquardt, 2005). La mayoría de las oviposturas ocurren cerca del crepúsculo. La hembra grávida prefiere los recipientes oscuros o sombreados que contienen agua relativamente limpia, clara y transparente. Los huevos se adhieren individualmente a las paredes internas de los recipientes justo por encima del nivel del agua; la hembra acostumbra distribuir los huevos de un mismo ciclo gonotrófico en varios recipientes (generalmente tres) (Gubler y Kuno, 1997). El conocimiento de la duración del ciclo gonotrófico es importante ya que permite identificar la frecuencia con que se alimenta la hembra y está relacionado con el periodo extrínseco de incubación (Fernández, 1999).

La cantidad de huevos que una hembra puede colocar durante una sola ovipostura está en función de factores tales como: tamaño del cuerpo, volumen de sangre ingerida, calidad proteica de la sangre ingerida, edad, entre otros. En términos generales, la hembra coloca un conjunto de 20 a 120 huevos por ovipostura, la primera generación de óvulos requiere por lo menos dos alimentaciones sanguíneas para su maduración. Existe un umbral en la distensión abdominal del estómago que estimula el desarrollo de los ovarios, por lo que una alimentación escasa produce una cantidad menor de huevos y si la alimentación es muy reducida no se producen huevos. Un mosquito hembra en condiciones naturales es capaz de tener hasta tres oviposturas cada 3 a 5 días (Christophers, 1960; Clements, 1992).



Figura 18. Mosquito hembra *Ae. aegypti*, alimentándose de un humano. Se observa que la hembra tiene el abdomen distendido debido a la ingesta de sangre.

El tamaño de una hembra adulta está relacionado con la temperatura, la calidad y cantidad de alimento que obtuvo y con la densidad larvaria (Christophers, 1960). Entre mayor sea el tamaño de su cuerpo, potencialmente serán mejores transmisores del virus Dengue pues ingerirán un mayor volumen de sangre al picar al humano infectado y su longevidad podrá ser mayor; al menos podrán vivir más de 10 días, que es el tiempo suficiente para incubar al virus Dengue (Fernández, 1999).

Las hembras son más longevas que los machos; el periodo de vida de las hembras es de aproximadamente dos semanas a un mes en clima templado; en algunos casos, tanto en condiciones naturales como de laboratorio, la supervivencia puede ser de dos o tres meses (climas cálidos). Los machos tienen un promedio de vida de una a dos semanas (Christophers, 1960).

Cuando los mosquitos no se encuentran apareándose, alimentándose o desplazándose, reposan en lugares oscuros y tranquilos. Sus sitios preferidos se encuentran en el interior de las viviendas, especialmente en los dormitorios, baños y cocinas, posándose en la superficie de muebles oscuros, tras las cortinas o la ropa colgada (OPS, 1995).

## 1.6 El canal alimentario del mosquito vector

El canal alimentario de los insectos es un tubo que se extiende desde la boca hasta el ano y se divide en tres regiones principales: el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior (Figura 19) (Clements, 1992). Cada una de las principales regiones se especializa en funciones particulares. El intestino anterior está involucrado principalmente con la ingestión, conducción y el almacenamiento de la comida; el intestino medio con la digestión y la absorción de la comida y el intestino posterior con la regulación de la composición de la hemolinfa, la excreción y el egreso de los materiales de desecho provenientes del intestino medio y de los tubos de Malpighi (Marquardt, 2005).

El **intestino anterior** comprende la boca verdadera, los apéndices bucales, la bomba faríngea, el esófago, el divertículo ventral (buche) y dos divertículos dorsales (Clements, 1992; Marquardt, 2005).

La cavidad formada por los apéndices bucales está subdividida en dos regiones: la cavidad (preoral) cibarial (dentro de la cual la boca verdadera se abre) y el *salivarium* (dentro del cual, el conducto salival se abre) (Marquardt, 2005).

El esófago es un conducto que se encuentra entre la faringe y el divertículo ventral (Marquardt, 2005). Las células epiteliales del esófago pueden ser columnares o cúbicas dependiendo del grado de distensión que sufra el esófago. El epitelio está cubierto por la cutícula y se encuentra delimitado por células musculares, de las cuales la mayoría son circulares siendo solo unas cuantas longitudinales, especialmente hacia la región posterior (Clements, 1992).

Asimismo, la parte posterior del intestino anterior se extiende en un divertículo ventral y dos divertículos dorsales. Los pequeños divertículos dorsales ocupan un espacio en la parte anterior del tórax entre los músculos indirectos del vuelo. El divertículo ventral, el cual es un saco ciego de tamaño grande, está situado entre el intestino medio y el cordón nervioso ventral, se une al esófago mediante un largo conducto, y se extiende dentro del abdomen, está rodeado por un conjunto de células musculares, las cuales probablemente funcionen como un esfínter. Existen válvulas entre el esófago y cada uno de los tres

divertículos. El divertículo ventral es altamente elástico y cuando se encuentra vacío se puede observar plegado (Clements, 1992).

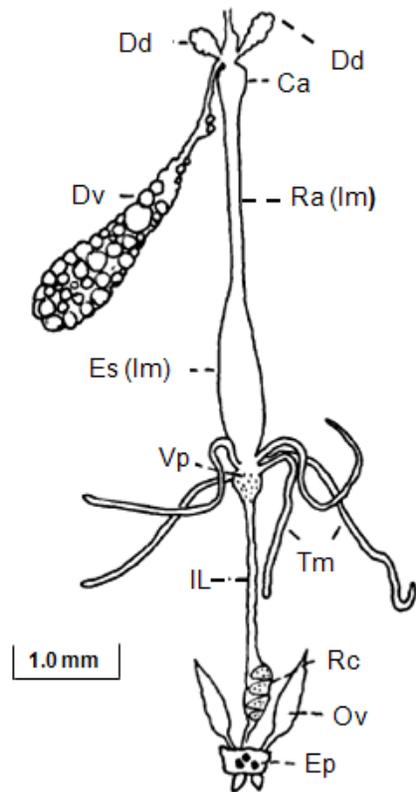


Figura 19. Estructura del canal alimentario del mosquito hembra *Ae. aegypti*. Ca, cardia; Dd, divertículo dorsal; Dv, divertículo ventral; Ep, espermateca; Es, estómago; IL, íleo; Im, intestino medio; Ov, ovario; Ra, región anterior; Rc, recto; Tm, tubos de Malpighi; Vp, válvula pilórica. Imagen adaptada de Christophers, 1960.

La unión entre el intestino anterior y el intestino medio está localizada en una estructura compleja denominada *cardia* (proventrículo). El proventrículo está formado por tejido del intestino anterior y el intestino medio. Los músculos dentro de los pliegues del proventrículo actúan como esfínteres mientras que las capas del epitelio del intestino anterior producen un efecto de válvula. El proventrículo regula el paso de materiales del intestino anterior al intestino medio y previene el refluo de materiales provenientes del intestino medio al intestino anterior. Por ejemplo, la regulación del paso de soluciones

azucaradas (néctar) del divertículo de los dípteros dentro del intestino medio es mediada por el proventrículo. El movimiento de la solución azucarada desde el divertículo hacia el intestino medio está regulado probablemente en relación a los requerimientos fisiológicos de la hemolinfa. El néctar ingerido tiene una concentración osmótica superior a la concentración osmótica que posee la hemolinfa. Así, el almacenamiento del néctar en el divertículo impermeable y la subsecuente liberación (la cual se da en forma lenta) para su posterior absorción, protege probablemente al insecto de un choque osmótico y hace posible que el insecto posea una fuente concentrada de energía (Marquardt, 2005).

El **intestino medio** se divide en dos regiones: la región anterior y el estómago (Figura 20). La región anterior es un tubo angosto por el cual pasa la sangre, mientras que el estómago, el cual tiene forma de botella, almacena la sangre y es capaz de una gran distensión (Clements, 1992).

La membrana basal rodea al epitelio del intestino medio. Una delicada red de células musculares inervadas circulares y longitudinales rodea a la membrana basal. El final de la región posterior del estómago se encuentra muy constreñido y la rodea un esfínter, formando en conjunto la válvula pilórica. El estómago está ricamente provisto de tráqueas, las cuales se encuentran enrolladas estrechamente, previo a la distensión del estómago cuando el mosquito hembra ingiere sangre. Asimismo, el estómago posee pliegues longitudinales que se extienden a lo largo de esta región. La monocapa de células epiteliales del intestino medio está formada por tres tipos celulares. La mayoría son células columnares, las cuales pueden ser altas o planas dependiendo del grado de distensión del intestino, dentro de las células columnares se encuentran distribuidas un número pequeño de células indiferenciadas llamadas células regenerativas y aproximadamente 500 células endocrinas (Clements, 1992).

Las células epiteliales del intestino medio de los mosquitos hembra cumplen con tres funciones, además de su papel endocrino: contribuyen a la diuresis; son el sitio de síntesis y secreción de las enzimas digestivas y de la membrana peritrófica; y son el sitio de la absorción de nutrientes y agua (Clements, 1992; Marquardt, 2005).

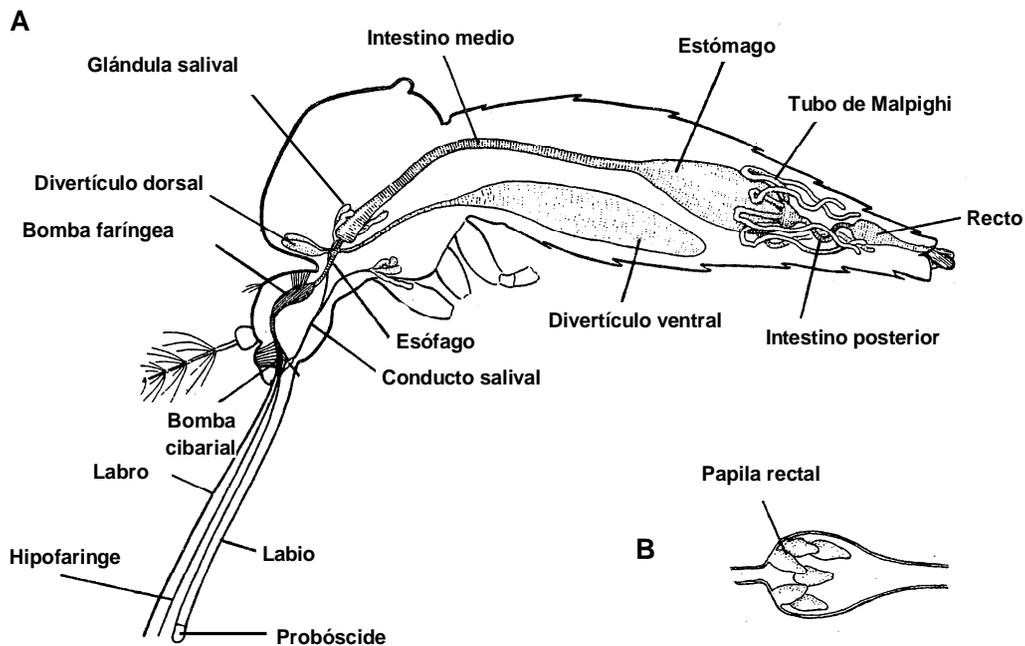


Figura 20. Esquema del canal alimentario del mosquito hembra *Ae. aegypti*. A, cuerpo completo de la hembra mostrando las partes que conforman el canal alimentario; B, recto de la hembra mostrando las papilas rectales. Imagen adaptada de Clements, 1992.

Las células columnares que se orientan hacia el lumen poseen microvellosidades, las cuales proporcionan una enorme superficie para la absorción de materiales que provienen del lumen (Marquardt, 2005). Las microvellosidades se encuentran revestidas por un mucopolisacárido, formando el glicocáliz, el cual atrapa y concentra las enzimas y los productos generados durante la digestión. Experimentos realizados con lectinas revelaron que el glicocáliz de *Ae. aegypti* contiene N-acetil-D-glucosamina. Las microvellosidades de *Ae. aegypti* miden 4-5  $\mu\text{m}$  de longitud y 110-140 nm de diámetro (Clements, 1992). En el lado del hemocele, la membrana plasmática forma una red compleja de invaginaciones denominada el laberinto basal (Figura 23). Las mitocondrias son encontradas en varias de las regiones del citoplasma asociadas con el laberinto basal. Así como las microvellosidades, el laberinto basal proporciona una superficie grande a través de la cual los materiales pueden ser transportados (Marquardt, 2005). La lámina basal puede tener una

forma granular o de trama, por debajo de ésta se encuentra la membrana plasmática basal. Lateralmente, las células epiteliales del intestino medio están unidas mediante uniones intercelulares llamadas *zonula continua* (Figura 21). Una quitinosa y acelular matriz peritrófica es formada alrededor del bolo alimentario y adquiere la forma y el tamaño de éste. La matriz peritrófica previene a las células epiteliales del intestino medio de una acción abrasiva de las partículas de comida y está involucrada en el proceso de digestión. En los mosquitos, el epitelio del intestino medio secreta la matriz peritrófica alrededor del bolo alimentario y se forma un tapón del material que constituye a la matriz peritrófica, separando de esta manera el lumen de la región anterior y el lumen de la región posterior del intestino medio, la cual contiene la sangre ingerida. Probablemente, la separación del estómago de la región anterior del intestino medio, provista por el tapón de matriz peritrófica, permite que se lleve a cabo al mismo tiempo la digestión y absorción de la sangre en el estómago y del néctar en la región anterior (Marquardt, 2005).

Las células columnares de la región anterior y posterior del intestino medio son activas en la síntesis de proteínas (evidente, debido a la presencia del retículo endoplásmico y ribosomas) y en el transporte de sustancias (debido a la presencia de las microvellosidades de la membrana apical y el laberinto basal). Existen diferencias en la ultraestructura de las dos regiones del intestino medio. En la región anterior, las células columnares poseen más microvellosidades, el retículo endoplásmico liso es abundante mientras que el retículo endoplásmico rugoso es escaso, y el laberinto basal se extiende en mayor proporción. Las células columnares de la región anterior del intestino medio no tienen una función de almacenamiento y contienen muy pocos depósitos de lípidos o glucógeno (Clements, 1992).

Las células columnares del estómago contienen abundante retículo endoplásmico rugoso. En *Ae. aegypti* el retículo endoplásmico rugoso tiene forma de cisterna y está agrupado de manera ajustada en formaciones concéntricas denominadas *whorls*. Existen depósitos transitorios en el estómago durante la digestión de sangre. En *Ae. aegypti* estos depósitos son de lípidos (Clements, 1992).

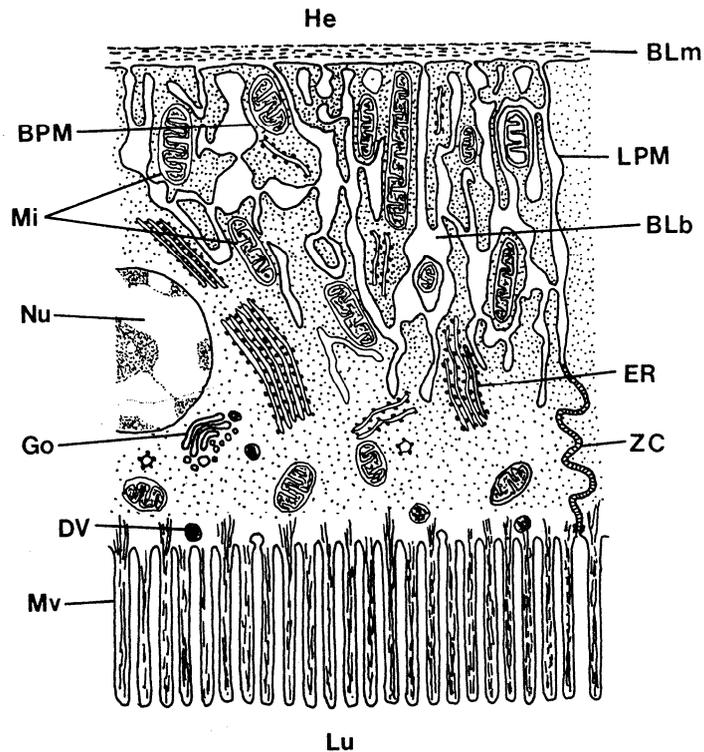


Figura 21. Ultraestructura generalizada de la célula epitelial del intestino medio de un insecto. BLb, laberinto basal; BLm, lámina basal; BPM, membrana basal; DV, vesícula densa; ER, retículo endoplásmico; Go, aparato de Golgi; He, hemocele; LPM, membrana lateral; Lu, lumen; Mi, mitocondria; Mv, microvellosidad; Nu, núcleo; Zc, zonula continua. Imagen adaptada de Marquardt, 2005.

El estómago de los culícidos puede resistir una distensión considerable, lo cual se debe probablemente a las regiones especializadas de unión entre las células adyacentes; a la lámina basal; y a la capa de células musculares que rodean a la lámina basal. En el mosquito *Ae. aegypti* la lámina basal consiste de 4-7 capas (Clements, 1992).

Las células regenerativas se encuentran tanto en la región anterior del intestino medio como en el estómago, su citoplasma presenta grandes acumulaciones de ribosomas libres, muy poco retículo endoplásmico y pocas mitocondrias (Clements, 1992).

Las células endocrinas se encuentran distribuidas a lo largo de las células columnares del intestino medio. Estas células se caracterizan por ser más estrechas (2-6  $\mu\text{m}$  de ancho)

que las células columnares (8-10  $\mu\text{m}$  de ancho), además no poseen laberinto basal y presentan vesículas secretoras (con un centro denso) en el citoplasma basal (Clements, 1992).

El procesamiento de la sangre en los insectos hematófagos involucra cuatro pasos principales: 1) La remoción del exceso de agua proveniente de la sangre ingerida, 2) la lisis de las células sanguíneas, 3) la degradación hidrolítica de las macromoléculas en la sangre (digestión) y 4) la absorción de pequeñas moléculas producidas por la digestión dentro de las células epiteliales del intestino medio y el subsecuente ingreso de éstas moléculas al hemocele (Marquardt, 2005).

Se han descrito cambios estructurales en el epitelio del intestino medio que están asociados con la ingestión de sangre, para un gran número de insectos hematófagos (Marquardt, 2005). El cambio estructural principal asociado con la presencia de sangre en el intestino medio es el profundo estiramiento que sufre el epitelio, el cual resulta en la distensión de la lámina basal. La regulación de la cantidad ingerida de sangre está mediada por receptores que responden a la distensión. Tales receptores están asociados con los músculos que se encuentran a lo largo del canal alimentario y/o la pared elástica del abdomen. Otros cambios estructurales incluyen un incremento en el volumen citoplásmico de las células epiteliales del intestino medio, un incremento en el área de superficie del retículo endoplásmico rugoso y liso, así como la presencia de vesículas secretoras que contienen tripsina (Rudin y Hecker, 1979). Estos cambios están directamente asociados con la gran síntesis de proteínas (enzimas) que se da en respuesta de la presencia de la sangre ingerida (Marquardt, 2005).

Existe una correlación entre la absorción del agua proveniente de la sangre ingerida y un incremento en el volumen del espacio extracelular del laberinto basal. Al mismo tiempo, un incremento significativo en el flujo de orina, que se lleva a cabo en los tubos de Malpighi (diuresis), permite que el agua salga rápidamente al intestino posterior favoreciendo de esta manera el proceso de eliminación del agua. La diuresis, probablemente se encuentra bajo el control hormonal, en todos los insectos hematófagos. Al removerse el agua de la sangre ingerida permite que el bolo alimentario se concentre y se solidifique, lo cual ayuda al proceso de digestión (Marquardt, 2005).

Incluyendo células y fluidos biológicos, la sangre de los vertebrados está conformada por aproximadamente un 80% de agua. Asimismo la sangre está constituida aproximadamente por 55% de plasma (la fracción líquida) y 45% de células. El agua contenida en la sangre ingerida por un insecto hematófago es removida mediante un gradiente osmótico entre el lumen del intestino medio, las células epiteliales del intestino medio y la hemolinfa. Este gradiente es producido probablemente por el transporte activo de iones, tales como sodio y potasio, lo cual facilita la difusión pasiva del agua (Marquardt, 2005).

La mayoría de las proteínas y otros nutrientes contenidos en la sangre de los vertebrados se encuentran inmersos en las células sanguíneas, así la lisis de estas células (hemólisis) libera las macromoléculas, haciéndolas de esta forma accesibles a las enzimas digestivas. La hemólisis puede ser realizada mecánicamente o bioquímicamente. Por ejemplo, en los mosquitos, existe una correlación entre la presencia y el desarrollo de la armadura cibarial y el grado de células lisadas. La enzima proteolítica tripsina probablemente es el principal factor hemolítico en los mosquitos. Otros factores hemolíticos como pequeños péptidos y ácidos grasos han sido reconocidos en insectos hematófagos (Marquardt, 2005).

Los insectos hematófagos poseen muchos componentes que procesan las macromoléculas de la sangre en unidades absorbibles, entre los cuales se encuentran las enzimas hidrolíticas, proteasas, carbohidrasas y esterasas. Debido a que la sangre de los vertebrados consiste principalmente de proteínas, las proteasas juegan un papel importante en la digestión de la sangre (Marquardt, 2005).

Lehane (1991) describió dos estrategias básicas de digestión/absorción: la digestión/absorción continua y la digestión/absorción colectiva. El proceso colectivo se presenta en los piojos, las pulgas y los dípteros. El bolo alimentario es digerido a través de su completa superficie, y aparentemente las mismas células están involucradas en la síntesis y secreción de las enzimas digestivas, así como también en la absorción de los productos de la digestión. Durante el proceso continuo, presente en los hemípteros hematófagos y en la

mosca tse tse, la sangre pasa gradualmente de la región de almacenamiento del intestino medio, hacia regiones posteriores más especializadas donde se lleva a cabo la digestión y la absorción (revisado en Marquardt, 2005).

Sin embargo, no se han observado cambios estructurales asociados con la absorción, la aparición transitoria de varias sustancias en las células epiteliales del intestino medio, como gránulos de lípidos se considera como una indicación de la actividad de absorción. Existen adaptaciones estructurales que facilitan el movimiento de las moléculas a través de las membranas celulares, las cuales son evidentes en las microvellosidades y en el laberinto basal de las células epiteliales del intestino medio (Marquardt, 2005).

Los procesos involucrados en la absorción de los nutrientes van desde una simple difusión al transporte activo en el cual se utiliza energía. Por ejemplo, la absorción del azúcar dentro de la hemolinfa desde el lumen del intestino medio es mediante difusión simple. El gradiente de concentración de la glucosa que existe entre el lumen del intestino medio y la hemolinfa se mantiene por la síntesis del disacárido trehalosa. Los aminoácidos provenientes del lumen del intestino medio viajan hacia la hemolinfa mediante transporte activo. Asimismo, poco se sabe acerca de la absorción de los lípidos, vitaminas y minerales en los insectos hematófagos (Marquardt, 2005).

La unión del intestino medio y el intestino posterior, está señalada por la inserción, justo por detrás de la válvula pilórica de los tubos de Malpighi. El **intestino posterior o íleo** consiste de la cámara pilórica, el recto y el ano. En todas las regiones del epitelio del intestino posterior existe una capa de músculo sobre la superficie exterior. La cámara pilórica, es pequeña y posee una pared delgada y una estructura en forma de bulbo donde los tubos de Malpighi se drenan (Clements, 1992).

El intestino posterior es un tubo muy angosto en forma de lazo, su epitelio es grueso y está conformado por células cúbicas las cuales se ciñen en pliegues longitudinales. La papila rectal está constituida por una sola capa de epitelio grueso, el cual rodea un canal central que es confluyente con el hemocele. Dentro del canal central se encuentra una

tráquea, la cual desemboca en el hemocele. A lo largo de la papila rectal se ramifican numerosas traqueolas (Clements, 1992).

Los tubos de Malpighi se encuentran en la unión entre el intestino medio y el intestino posterior. Cada tubo de Malpighi posee dos tipos de células: la célula principal y la célula estelar. La mayoría de las funciones fisiológicas de los tubos de Malpighi han sido atribuidas a la célula principal, sin embargo, el papel de las células estelares es poco entendido. No más del 20% de las células que conforman los tubos de Malpighi son células estelares. Las células que se encuentran en la cara del lumen poseen muchas microvellosidades, las cuales a menudo presentan bombas de iones ( $\text{Na/K}$ ,  $\text{V-H}^+$ ) y mitocondrias. Estas mitocondrias proporcionan ATP, el cual es esencial para el funcionamiento de las bombas de iones (Marquardt, 2005).

El intestino anterior, el recto y los tubos de Malpighi funcionan como el principal sistema de excreción de los insectos. Ciertos iones, el nitrógeno y otros desechos son secretados dentro del lumen de los tubos de Malpighi y pasan a través del lumen del intestino posterior, junto con los desechos no digeridos del intestino medio. Agua, iones y otras pequeñas moléculas, que son necesarios para el insecto, son reabsorbidos en el intestino posterior, particularmente en el recto. La absorción rectal es comúnmente facilitada por proyecciones en forma de lóbulo que se encuentran dentro del lumen, y por las papilas rectales (Marquardt, 2005).

La musculatura del canal alimentario de los artrópodos está constituida por fibras extrínsecas e intrínsecas. Los músculos intrínsecos circulares o longitudinales alrededor del intestino proveen de ondas alternadas de contracción y relajación (peristaltismo) que propulsan la comida a lo largo del intestino. El recto es particularmente rico en fibras musculares. Como en todos los músculos de los artrópodos, las fibras musculares viscerales son estriadas (Marquardt, 2005).

Una red bien desarrollada de tráqueas y traqueolas facilita el movimiento de oxígeno a las células epiteliales del intestino y a sus músculos asociados, además ayuda a mantener las estructuras en un lugar determinado, similar al mesenterio de los vertebrados (Marquardt, 2005).

Los factores extrínsecos e intrínsecos determinan la capacidad que posee un vector artrópodo de tolerar las actividades involucradas en el ciclo de vida de un patógeno. Dentro del canal alimentario, un patógeno (inmerso dentro de la sangre), se enfrenta con una multitud de características estructurales y fisiológicas/bioquímicas que pueden influenciar su supervivencia. Algunos ejemplos de estas características son las enzimas hidrolíticas secretadas en respuesta de la sangre ingerida, cambios en la osmolaridad del contenido del intestino medio y el recto, debido a que pequeñas moléculas, agua y iones dentro del hemocele o cuando los materiales (provenientes de los tubos de Malpighi) de desecho son expulsados dentro del lumen del intestino posterior; y variaciones en la concentración del contenido luminal (Marquardt, 2005).

En una forma más pasiva, el ambiente del canal alimentario puede ser inadecuado ya que puede carecer de requerimientos particulares necesarios para la supervivencia de un patógeno. Por ejemplo, los receptores de superficie necesarios para la unión exitosa del virus a la célula hospedera (por ejemplo, una célula epitelial del intestino medio), pueden estar ausentes o encontrarse ocluidos en alguna forma, previniendo así la internalización a la célula hospedera y su posterior replicación. También puede suceder que el canal alimentario no provea de los nutrientes esenciales o que carezca de las señales químicas requeridas para estimular la multiplicación de un patógeno (Marquardt, 2005).

## **1.7 El sistema reproductivo del mosquito hembra**

El sistema reproductivo de la hembra, consta de un par de ovarios, los cuales están situados dorsolateralmente en la región posterior del abdomen y se conectan con un par de oviductos laterales que se unen para formar el oviducto común, el cual se abre para dar lugar a la vagina. Dentro de la vagina se encuentra la espermateca (almacena el esperma) y la glándula accesoria (Figura 22) (Christophers, 1960; Chapman, 1998).

Los **ovarios**, son estructuras fusiformes situadas en los segmentos abdominales quinto y sexto cuando aún no se han desarrollado, sin embargo, cuando los ovarios se encuentran

completamente desarrollados, es decir, con folículos maduros ocupan la mayor parte del estómago distendido. Anteriormente, cada ovario presenta una estructura denominada **ligamento suspensorio**, el cual en *Ae. aegypti* se encuentra unido a la pared del cuerpo en la región posterior del cuarto segmento abdominal. Cada ovario presenta una pared que lo rodea externamente, dicha estructura posee núcleos pequeños. Dentro de cada ovario se encuentran de 100-200 **ovariolas** o tubos foliculares (Christophers, 1960). Cada ovariola posee una pared, que está constituida de tejido conectivo muy delgado (Figuras 23 y 24), al interior de esta pared se encuentra la **túnica propia** la cual es una lámina basal con propiedades elásticas que rodea toda la superficie de la ovariola. Durante las primeras fases del desarrollo de los ovarios, la túnica propia incrementa su tamaño, no obstante, durante el periodo de acumulación del vitelo, cuando los oocitos crecen rápidamente, se vuelve elástica y muy delgada. La túnica propia tiene una función de soporte, manteniendo la forma de la ovariola, además debido a su elasticidad está involucrada en la ovulación (Chapman, 1998; Clements, 1992).

Los **oviductos**, son estructuras tubulares que consisten en un epitelio y músculos que los rodean. El epitelio de los oviductos laterales es cúbico, mientras que el epitelio del oviducto común es columnar, ambos epitelios descansan en la lámina basal. El oviducto común presenta músculos circulares y longitudinales que usualmente se encuentran en mayor proporción que en los oviductos laterales (Figura 24) (Chapman, 1998; Clements, 1992).

La **espermateca**, es una estructura en la que se almacena el esperma hasta que los huevos son fertilizados, contiene secreciones que están constituidas por varias proteínas y complejos carbohidrato-proteína. Estas secreciones probablemente proveen de nutrientes al esperma durante su almacenamiento, o pueden estar involucrados en la activación del esperma (Chapman, 1998).

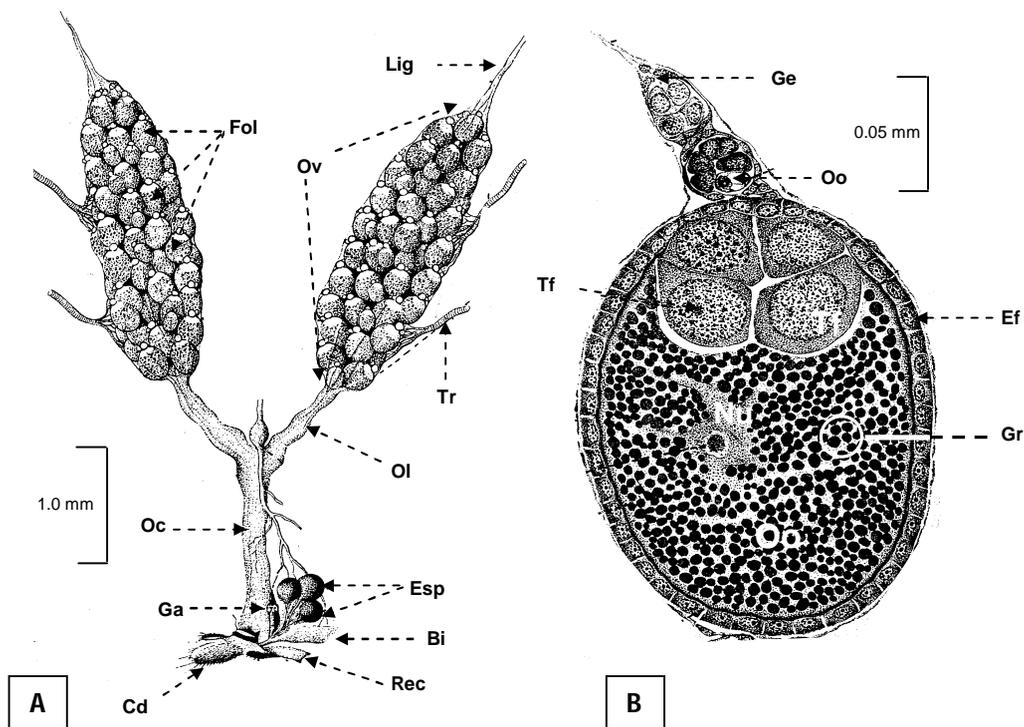


Figura 22. Estructura de los ovarios (A) y del folículo (B) de *Ae. aegypti*. **Ovarios:** Bi, bursa inseminalis; Cd, cercos dorsales; Esp, espermateca; Fol, folículos; Ga, glándula accesoria; Lig, ligamento suspensorio; Oc, oviducto común; Ol, oviducto lateral; Ov, ovario; Rec, recto; Tr, tráquea. **Folículo:** Ef, epitelio del folículo; Ge, germario; Gr, gránulos de vitelo; Nu, núcleo; Oo, oocito; Tf, trofocito. Imagen adaptada de Marquardt, 2005.

La **glándula accesoria** es una estructura globular situada dorsolateralmente al recto y posterior a la espermateca (Figura 22). La glándula accesoria de *Ae. aegypti* está compuesta de 15-20 células secretoras, cada una de ellas rodea un espacio, el cual está lleno de secreción. El diámetro de la glándula accesoria de *Ae. aegypti* es de 38  $\mu\text{m}$  cuando inicia la oogénesis, sin embargo cuando los oocitos están completamente maduros el diámetro incrementa hasta 45  $\mu\text{m}$  (Clements, 1992). Usualmente produce una sustancia que permitirá que los huevos se adhieran a la superficie del criadero que la hembra elija para la oviposición (Chapman, 1998).

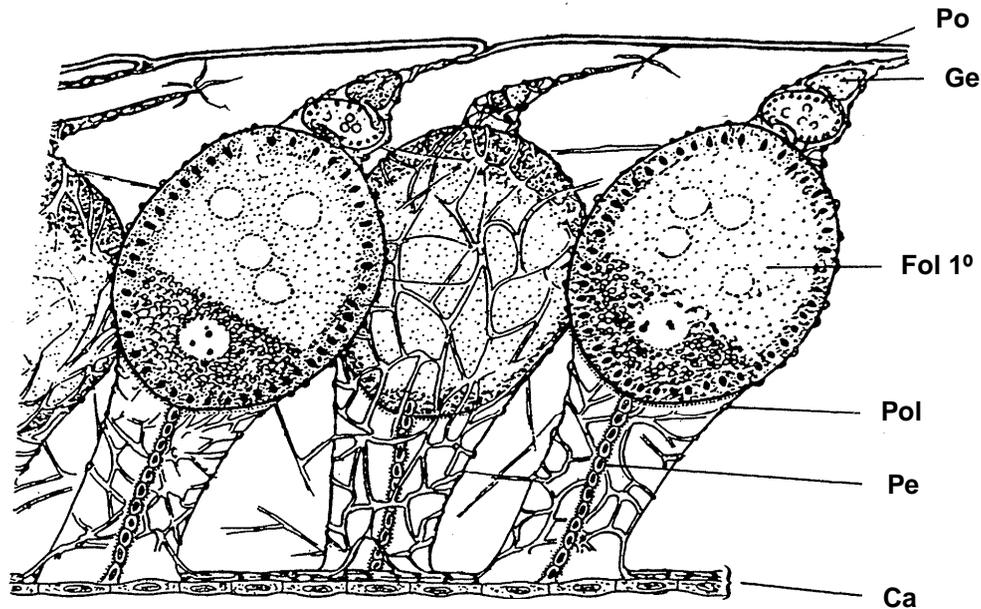


Figura 23. Diagrama de las ovariolas de la hembra nulípara *Anopheles melas*. Ca, cáliz; Ge, germario; Fol 1°, folículo primario; Pe, pedicelo; Pol, pared de la ovariola; Po, pared del ovario. Imagen adaptada de Clements, 1992.

Los ovarios se abastecen de aire mediante unos tubos denominados tráqueas, que son los órganos respiratorios de los insectos (Figura 22). El conjunto de tráqueas forma el sistema traqueal el cual está constituido por una red de tubos vacíos, progresivamente de menor diámetro (de 0.8 mm a pocos micrómetros), que penetra en los tejidos y aporta oxígeno directamente a las células, sin necesidad de la intervención del aparato circulatorio. Las tráqueas se ramifican y se hacen más estrechas para originar las traqueolas que transportan los gases metabólicos desde y hacia los tejidos. Las traqueolas, penetran en las células y actúan como puntos de intercambio de agua, oxígeno y dióxido de carbono (Christophers, 1960; (Marquardt, 2005).

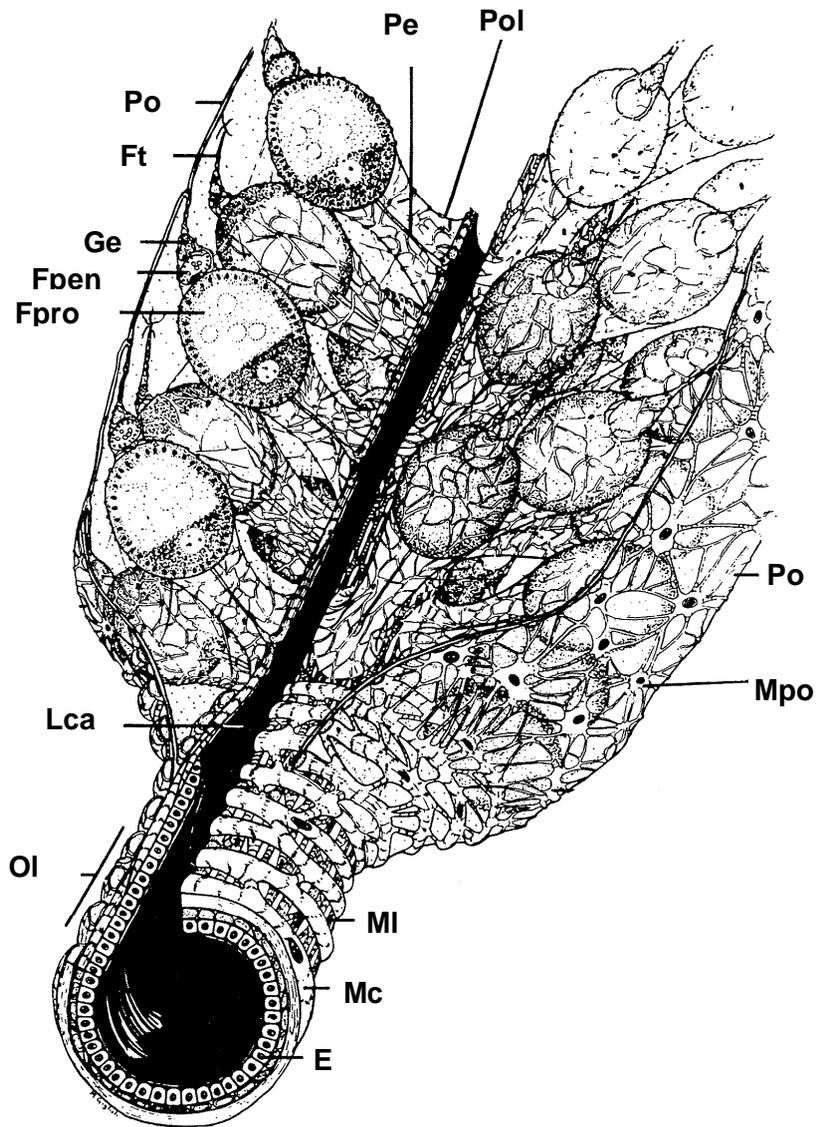


Figura 24. Estructura del ovario y el oviducto lateral de la hembra nulípara *Anopheles melas*. E, epitelio; Fpen, folículo penpróximo; Fpro, folículo próximo; Ft, filamento terminal; Ge, germario; Lca, lumen del cáliz; Mc, músculo circular; MI, músculo longitudinal; Mpo, músculo de la pared del ovario; Ol, oviducto lateral; Pe, pedicelo; Pol, pared de la ovariola; Po, pared del ovario. Imagen adaptada de Clements, 1992.

## *Oogénesis*

Las fases que conllevan a la transformación del conjunto de folículos en un conjunto de oocitos maduros constituye la oogénesis (Clements, 1992).

Cada ovariola está compuesta por un germario apical, un solo folículo primario y el vitelario. El germario contiene tejido prefolicular y células primordiales germinales, es el sitio en el cual los oocitos son producidos a partir de la oogonia (Figuras 22 y 23), mientras que el vitelario es el sitio donde el vitelo es depositado en los oocitos. El folículo está constituido por un solo oocito y ocho trofocitos, los cuales están interconectados mediante puentes citoplasmáticos. El oocito se encuentra rodeado por el epitelio somático folicular (Figura 22). El folículo primario, que es el primero en brotar del germario, está conectado al cáliz mediante una estructura denominada pedicelo, el cual es un bastón de células, usualmente de no más de una célula de grosor (Figura 23). El cáliz es una cámara central que penetra longitudinalmente a cada ovario y del cual las ovariolas radian (Figura 24), posee un epitelio con fibras musculares y se encuentra en el lado opuesto del germario (Chapman, 1998; Clements, 1992).

El germario y el vitelario reflejan dos fases del crecimiento del oocito: el primero es regulado directamente por el genoma del oocito y contiene información especie específica (todas las sustancias que están reguladas por el ADN de las células primordiales germinales son conocidas como euplasma), el segundo es regulado principalmente por los genes que se encuentran en el exterior del oocito (Chapman, 1998).

El desarrollo de los ovarios se divide en cuatro fases: fase previtelogénica, fase de iniciación, fase trófica y fase post-trófica (Clements, 1992).

La **fase previtelogénica**, se caracteriza por la división de las células primordiales del germario, una de las células permanece funcionalmente como célula primordial germinal mientras que la otra célula se convierte en la oogonia la cual se desarrollará hasta convertirse en un oocito. En el momento en que los oocitos dejan el germario, estos son rodeados por el tejido prefolicular el cual se divide para dar lugar al epitelio folicular. (Chapman, 1998). Cada ovariola contiene típicamente una serie de oocitos en diferentes

fases de desarrollo, los oocitos que poseen un desarrollo más avanzado se encuentran más alejados del germario y próximos al cáliz y se denominan folículos próximos, mientras que los oocitos más inmaduros que se encuentran más cercanos al germario se denominan folículos penpróximos (Figura 24) (Clements, 1992). Un oocito que está rodeado por el epitelio folicular se denomina folículo. Los folículos sucesivos están separados por tejido interfolicular derivado del tejido prefolicular (Chapman, 1998). Durante esta fase los folículos miden aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro (Clements, 1992).

En la fase previtelogénica, los oocitos se vuelven competentes para incorporar las proteínas del vitelo. Esta capacidad la adquieren gracias a la hormona juvenil. Si la hembra no se ha alimentado de sangre, el crecimiento de los oocitos se detiene y permanecen en un estado de reposo (Clements, 1992).

Durante la **fase de iniciación**, pocas horas después de que el mosquito hembra ha ingerido sangre, el crecimiento del oocito se activa hasta ocupar el 50% del espacio en el folículo y la síntesis de vitelo comienza, de manera que el núcleo del oocito se oscurece debido a la acumulación de vitelo (Clements, 1992).

La **fase trófica**, es el principal periodo de síntesis del vitelo. Asimismo, los trofocitos transfieren todo su contenido citoplasmático a los oocitos. La incorporación de vitelo y la transferencia de contenido citoplasmático proveniente de los trofocitos, al interior del oocito dan como consecuencia el rápido aumento de tamaño del oocito. Después de que cesa la síntesis de vitelo, se empieza a formar el corion (Chapman, 1998; Clements, 1992).

El género *Aedes* presenta ovarios meroísticos politróficos en las cuales están presentes los trofocitos que están asociados cercanamente con cada uno de los oocitos. Los trofocitos se encuentran dentro del folículo y son células hermanas de los oocitos debido a que poseen el mismo genoma. Cuando los trofocitos colapsan todo el contenido citoplasmático (ARN, ribonucleoproteínas) es transferido al citoplasma de los oocitos. Este contenido citoplasmático es necesario para el desarrollo del embrión. La transferencia de contenido citoplasmático promueve que el oocito incremente al doble su volumen, en menos de 30 minutos (Chapman, 1998).

La meiosis comienza temprano en el desarrollo del oocito, no obstante las divisiones meióticas no son completadas en el ovario, y los oocitos usualmente dejan las ovariolas en metafase (Chapman, 1998).

El euplasma en los oocitos de los insectos usualmente constituye menos del 10% de contenido total del oocito. El 90% restante lo constituye el vitelo, el cual está formado por lípidos y proteínas. El vitelo es necesario para el desarrollo del embrión. La cantidad de las proteínas contenidas en el vitelo es aproximadamente igual a la cantidad de lípidos. Del 60-90% de las proteínas del vitelo son derivadas de las vitelogeninas, estas proteínas son producidas en el exterior del oocito, y son incorporadas a él a través de la endocitosis mediada por receptor. Las vitelogeninas son fosfolipoglicoproteínas en las que pueden estar presentes los lípidos (7-15% de la masa total) y los carbohidratos (oligosacáridos o manosas) del 1-14% de la masa total. La lipoporina también es un constituyente del vitelo (Chapman, 1998).

La acumulación del vitelo en los oocitos ocurre en el vitelario lo que ocasiona que el oocito incremente rápidamente su tamaño. En los insectos que pertenecen al Orden Diptera la acumulación del vitelo ocurre simultáneamente en varios oocitos dentro de cada ovariola. Posterior a este proceso los oocitos son almacenados hasta que llega el momento de la oviposición (Chapman, 1998).

La nutrición es un factor muy importante en la acumulación cíclica del vitelo por lo que, el número de huevos producidos es proporcional a la cantidad de sangre ingerida por un mosquito hembra (Chapman, 1998).

La mayoría de las proteínas del vitelo son producidas por el cuerpo graso independientemente de los ovarios. El cuerpo graso de *Ae. aegypti* también produce proenzimas que están involucradas probablemente en el metabolismo del vitelo durante el desarrollo del oocito. Estas proenzimas se almacenan en los gránulos de vitelo ubicados en el exterior de los oocitos. Las células foliculares también contribuyen a la producción de las proteínas que constituyen el vitelo, solo que en menor cantidad, igualmente producen algunas enzimas que están involucradas en el procesamiento del vitelo (Chapman, 1998).

En los insectos que pertenecen al Orden Diptera la síntesis de la vitelogenina es regulada por la ecdisona. En el mosquito hembra *Aedes* la síntesis de ecdisona es regulada por la hormona ecdisteroidogénica del ovario, producida por las células del cerebro. La liberación de esta hormona es desencadenada por la ingesta de sangre. En el cuerpo graso la ecdisona cambia a su forma activa, la 20-hidroxiectdisona. La ecdisona o su precursor es sintetizada por las células foliculares (Chapman, 1998; Marquardt, 2005).

El oocito está rodeado por el epitelio folicular, sin embargo, cuando el oocito comienza a acumular vitelogenina, se forman espacios intercelulares entre las células foliculares, los cuales permiten el acceso directo de la hemolinfa a la superficie del oocito. La vitelogenina es adquirida selectivamente de la hemolinfa, este proceso se realiza a través de la endocitosis mediada por receptor, los receptores específicos que se unen a la vitelogenina están presentes en la membrana del oocito. Después de que la vitelogenina se internalizó en el oocito es acumulado en vesículas o gránulos mientras que los receptores son reciclados y enviados a la superficie de la membrana. En este momento el oocito asume la forma de una estructura madura. La adquisición de las proteínas de la hemolinfa por el oocito está regulada por la hormona juvenil (Chapman, 1998).

La mayoría de los lípidos que se acumulan en el oocito son sintetizados por el cuerpo graso, mientras que el 1% es sintetizado por el oocito *per se*. Muchos de estos fosfolípidos son transportados por la lipoporina al interior del oocito (Chapman, 1998).

En el momento en que la incorporación de vitelogenina al interior del oocito ha cesado y cuando los trofocitos han degenerado se empieza a formar el corion, el cual cubrirá al oocito maduro (Clements, 1992).

La **fase post-trófica**, se caracteriza por la formación completa del corion. El corion es producido por las células foliculares. El 90% de esta estructura lo constituyen proteínas. Durante la formación del corion, algunas células degeneran para formar poros. Cuando el corion está completamente formado, el epitelio folicular degenera. Los oocitos que se han desarrollado hasta esta fase, se consideran maduros y están listos para la ovulación, sin embargo sus cromosomas se encuentran en metafase. La meiosis culmina solo después de que los oocitos han sido fertilizados por el esperma y ha ocurrido la oviposición. El corion

de los mosquitos se endurece y oscurece después de la oviposición. Si el mosquito hembra es incapaz de ovipositar, los oocitos de la fase post-trófica pueden permanecer viables dentro de los ovarios durante 15 días o más (Clements, 1992).

Los oocitos dentro de las ovarias pueden ser destruidos y su contenido reabsorbido por el insecto. La reabsorción puede ocurrir cuando un oocito se encuentra en cualquier fase de su desarrollo, no obstante es más común que se presente en los oocitos que se encuentran acumulando vitelo. En los casos más extremos, todos los oocitos pueden ser reabsorbidos, mientras que en los casos menos desafortunados, solo algunos son destruidos y los demás oocitos continúan normalmente con su desarrollo (Chapman, 1998).

Durante la reabsorción, los gránulos de vitelo se rompen y por lo tanto las proteínas y lípidos que los constituyen desaparecen del oocito. Es probable que las vitelogeninas sean liberadas de los gránulos de vitelo y regresen a la hemolinfa como una consecuencia del incremento en la permeabilidad de la membrana del oocito. Finalmente el epitelio folicular colapsa formando así un cuerpo de reabsorción, el cual persiste en la base de la ovaria (Chapman, 1998).

Los niveles más extremos de reabsorción son a menudo una consecuencia de la carencia de nutrientes en el adulto. En los mosquitos hematófagos el número de oocitos que se desarrollan completamente, es proporcional a la cantidad de sangre ingerida por el mosquito, mientras que los oocitos que no completaron su desarrollo son reabsorbidos (Chapman, 1998).

La inhabilidad para producir u ovipositar huevos fértiles también es causa de la reabsorción de los oocitos. La carencia de sitios de oviposición adecuados provoca que los mosquitos hembra reabsorban los oocitos que no están desarrollados completamente y retiene aquellos oocitos que poseen un corion (Chapman, 1998).

La hormona juvenil esta generalmente involucrada en el control de la acumulación de vitelo en el oocito y la ausencia de esta hormona está asociada con la reabsorción, al menos cuando todos los oocitos en desarrollo son afectados (Chapman, 1998).

Se considera que las insuficiencias nutricionales de la sangre ingerida por un mosquito hembra son compensadas con la permanencia de algunos oocitos en un estado de reposo, y con la reabsorción de algunos oocitos que se encuentran en la fase trófica (Clements, 1992).

Se conoce muy poco de la naturaleza del mecanismo que causa que algunos folículos degeneren mientras que otros alcanzan la madurez, no obstante existe evidencia de que la competencia entre folículos juega un papel importante en el proceso (Clements, 1992).

Una vez que el corion se ha formado completamente puede ocurrir la ovulación, que en los insectos es definida como la extrusión de los oocitos maduros desde los folículos del ovario atravesando el lumen del cáliz, hasta llegar a los oviductos. Los oocitos ovulados entran en la vagina y son fertilizados por el esperma, el cual fue liberado de la espermateca. Posteriormente los oocitos fertilizados son extruidos a través de la gonotrema durante la oviposición. Poco tiempo después de que sucedió la oviposición los cromosomas completan la meiosis, en esta fase se considera que el oocito se ha transformado en un huevo (Clements, 1992).

En los mosquitos hematófagos, el desarrollo de los ovarios ocurre comúnmente después de que la hembra se ha alimentado. Las proteínas que se encuentra en la sangre, son el único ingrediente esencial para la formación de los huevos, lo cual se ha confirmado con experimentos en los que la producción de huevos se ha estimulado con dietas que solo consisten en aminoácidos. El mosquito hembra *Ae. aegypti* necesita diez aminoácidos esenciales para la producción de sus huevos: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Cuando alguno de estos diez aminoácidos es omitido de la dieta, la hembra no produce huevos. Sin embargo, la omisión de cisteína y ácido glutámico en la dieta disminuye el número de huevos desarrollados. Las vitaminas, los ácidos nucleicos y los esteroides no son esenciales para la producción de los huevos, al menos en el primer ciclo gonotrófico (Clements, 1992).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Receptores descritos para el virus Dengue en células de mamífero

El virus Dengue inicialmente interacciona a nivel de la superficie de las células permisivas en el hospedero vertebrado e invertebrado antes de iniciar la infección (internalización, replicación y diseminación) mediante receptores superficiales. La proteína de envoltura viral o E está expuesta en la superficie de la membrana viral y contiene, los elementos estructurales (sitio de unión al receptor) y funcionales que le permiten interactuar con la célula diana, por lo que se ha propuesto como la proteína de unión al receptor (Clyde *et al*, 2006). Se ha reportado que el dominio de unión al receptor de la proteína E se localiza entre los aminoácidos 281 y 423 (Cabrera-Hernández y Smith, 2005). Se ha descrito que la internalización del DENV se lleva a cabo mediante endocitosis del complejo virus-receptor. Los receptores virales se encuentran sólo en ciertos tipos celulares, por lo que la distribución de los mismos juega un papel importante en la determinación del tropismo viral. Se ha propuesto que durante la infección por el DENV participan dos tipos de receptores: Los de baja afinidad, que capturan inicialmente al virus en la superficie celular, incrementando la concentración local del mismo y un receptor de alta afinidad, que internaliza al virión (Clyde *et al*, 2006). El virus Dengue es capaz de infectar selectivamente diferentes poblaciones celulares en un órgano en particular. Estudios *in vitro*, demostraron que el DENV infecta diversos tipos celulares humanos, entre los que se incluyen las células dendríticas, monocitos, macrófagos, células B, células T, células endoteliales, hepatocitos y células neuronales así como algunas líneas celulares útiles en la propagación viral (Clyde *et al*, 2006). Actualmente se han aislado y caracterizado diferentes moléculas involucradas en las interacciones tempranas del DENV con distintas células blanco (Cabrera-Hernández y Smith, 2005).

En 1997, Chen y colaboradores propusieron al glicosaminoglicano, heparán sulfato, como co-receptor responsable de la unión del DENV en diferentes líneas celulares. El heparán sulfato se expresa en casi todos los tipos celulares y está compuesto de ácido

hexurónico/disacáridos D-glucosamina, los cuales contienen diferentes grados y patrones de sulfatación, formando una cadena lineal con una diversidad en tamaño y complejidad estructural; su diversidad estructural le confiere la habilidad para reconocer un múltiples ligandos. La contribución del heparán sulfato ha sido demostrada con base a: 1) un decremento significativo en la capacidad de unión al virus Dengue después de la remoción enzimática del heparán sulfato, 2) bloqueo dosis-dependiente mediante la heparina y 3) ensayos de unión al virus Dengue en células deficientes que no expresan heparán sulfato. Asimismo, Chen y colaboradores evaluaron la participación de la proteína E (dominio III) identificando dos motivos potenciales de unión al heparán sulfato (aminoácidos 284-310 y los aminoácidos 386-411). Estas observaciones fueron corroboradas mediante ensayos de inhibición de la unión e internalización del DENV con anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína E. Adicionalmente, mediante ensayos enzimáticos se determinó que la presencia de residuos de glucosa, galactosa y ácido siálico, son necesarios para que se lleve a cabo la interacción del DENV en diferentes células huésped (Thaisomboonsuk *et al*, 2005). Ensayos de interacción en líneas celulares de hígado (HuH-7 carcinoma hepatocelular humano y HepG2) mostraron que la unión del DENV a los hepatocitos se presenta de una manera no saturable (Hilgard y Stockert, 2000).

En contraste, la unión del DENV a las células VERO (células epiteliales de riñón extraídas del mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) y a las células LLC-MK (células de riñón del mono *Rhesus*) se presenta de una manera saturable, asimismo la unión con el virus puede ser bloqueada en forma dosis-dependiente a través del tratamiento con heparina, la cual es un homólogo estructural del heparán sulfato (Thaisomboonsuk *et al*, 2005). Interesantemente, la heparina no inhibe la unión de la proteína E recombinante o la unión del virus Dengue a las líneas celulares de tejidos de insecto, sugiriendo que el tipo de célula huésped puede influenciar la unión entre el heparán sulfato y el virus Dengue (Thaisomboonsuk *et al*, 2005).

Con base a la ubicuidad de la expresión del heparán sulfato en la superficie celular de casi todos los órganos, así como la diferencia entre la cinética de unión e internalización del virus Dengue y la observación de que la eliminación/reducción del heparán sulfato disminuye significativamente pero no bloquea completamente la unión y la internalización

del virus, diferentes grupos han propuesto la existencia de receptores adicionales que participen en conjunto durante el proceso de internalización. Se ha propuesto por lo tanto que el heparán sulfato concentra al virus Dengue en la superficie de la membrana de la célula hospedera facilitando de esta manera la interacción del virus con un segundo receptor de alta afinidad (Cabrera-Hernández y Smith, 2005).

Para la mayoría de los receptores descritos hasta la fecha, únicamente se conoce su peso molecular, el cual varía considerablemente de una línea celular a otra. Esto ha generado controversia con respecto tanto a las características como la especificidad de los receptores putativos identificados (Cabrera-Hernández y Smith, 2005).

### *Receptores descritos para el virus Dengue en el linaje mieloide*

Los monocitos (MO) /macrófagos ( $\Phi$ ) son una población heterogénea y compleja de células que se derivan de un progenitor común, que se encuentra en la médula ósea. En una infección primaria con el virus Dengue, sólo del 1-2% de MO/ $\Phi$  se infectan, mientras que las células dendríticas son altamente susceptibles y se infectan productivamente con el DENV. Por el contrario, las células de Von-Kupffer (macrófagos del hígado) y las células de Langerhans (macrófagos de la piel) pueden ser infectadas con el virus Dengue, sin embargo esta infección no es productiva (Cabrera-Hernández y Smith, 2005).

De acuerdo a Halstead y Kurane (Halstead, 2007; Kurane, 2007;), durante una infección secundaria con un serotipo viral diferente al de la primoinfección, los anticuerpos de memoria (anticuerpos heterotípicos no neutralizantes) que se producen durante la infección primaria no tienen un efecto neutralizante hacia el nuevo serotipo viral, pero sí lo reconocen, formándose de esta manera complejos virus-anticuerpos los cuales se unirán a los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII, que se expresan en macrófagos y monocitos con lo que aumentará la internalización e infección viral de las células del linaje mononuclear que expresen el receptor. A este proceso se le denomina facilitación mediada por anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés *antibody dependent enhancement*). Sin embargo, durante el mecanismo de ADE, los receptores Fc no son los únicos receptores que se unen al virus Dengue. Daughaday y colaboradores (1981) revelaron la existencia de receptores sensibles

a la tripsina y receptores Fc no sensibles a la tripsina en monocitos humanos. Bielefeldt-Ohmann (1998) mediante ensayos de VOPBA (por sus siglas en inglés *virus overlay protein-binding assay*) encontró en la línea mielomonocítica HL60, dos proteínas de unión al virus Dengue no-Fc de 40/45 y 70/75 kDa.

Reyes del Valle y colaboradores (2005) mediante cromatografía de afinidad, espectroscopía de masas y ensayos de Western blot con anticuerpos anti-HSP90 y HSP70 identificaron dos proteínas de choque térmico de 84 kDa y 74 kDa en las células U937 (línea celular derivada de monocitos humanos) y en las células del neuroblastoma (KK-SY-5Y) las cuales son componentes del complejo receptor del virus Dengue.

La idea de que los MO/ $\Phi$  son la principal célula blanco durante la infección por el virus Dengue, se modificó después de que varios grupos reportaron que las células dendríticas (CD) eran altamente susceptibles a la infección por el DENV. Este hallazgo, llevó a la identificación de DC-SIGN (por sus siglas en inglés, *dendritic cell specific intercellular adhesion molecule grabbing*) en las células dendríticas inmaduras humanas. DC-SIGN es un receptor de baja afinidad que media la infección de los cuatro serotipos del virus Dengue y la expresión ectópica de este receptor confiere permisividad a la infección en células normalmente no permisivas (Tassaneetrithep *et al*, 2003; Cabrera-Hernández y Smith, 2005).

La participación del receptor DC-SIGN durante la infección por el virus Dengue se ha demostrado mediante ensayos de competencia, utilizando anticuerpos monoclonales contra DC-SIGN y utilizando DC-SIGN en forma soluble para inhibir la infección por el DENV. Se sabe que DC-SIGN actúa como correceptor (Tassaneetrithep *et al*, 2003).

DC-SIGN es una proteína integral de membrana tipo II, que posee 404 aminoácidos. La proteína está organizada en cuatro dominios distintos, un dominio citoplasmático N-terminal, un dominio transmembranal hidrofóbico, una región  $\alpha$ -helicoidal y un carbohidrato carboxilo terminal como dominio de reconocimiento (Su *et al*, 2003). DC-SIGN es expresada sólo por células dendríticas localizadas en sitios de exposición a antígenos como tejidos mucosos del intestino (duodeno y colon), vesícula biliar, cérvix,

vagina, endometrio, bronquios pulmonares, esófago y mucosa bucal, además de sangre periférica (Van Kooyk y Geijtenbeek, 2003).

Las lectinas calcio dependientes, como DC-SIGN, son proteínas de membrana que actúan como receptores de adhesión a la célula y están involucradas en la regulación de las vías de señalización, además de reconocer estructuras específicas de carbohidratos presentes en patógenos. Esta proteína de membrana, funciona como receptor de muchos virus, por ejemplo el virus del Ébola, citomegalovirus, virus de hepatitis C, lentivirus de primates, el virus de la inmunodeficiencia humana, entre otros; además de bacterias, levaduras y otros parásitos (Van Kooyk y Geijtenbeek, 2003).

#### *Receptores descritos para el virus Dengue en células del hígado*

Mediante análisis inmunohistoquímicos de muestras de hígado provenientes de casos fatales de la infección por Dengue se demostró la presencia de antígenos del DENV en hepatocitos, células de Kupffer y en células endoteliales sinusoidales. Asimismo, se detectó la presencia de ARN viral en hepatocitos y/o en las células de Kupffer, mediante RT-PCR e hibridación *in situ*. A pesar de que se ha reportado el daño al hígado en las manifestaciones más severas de la enfermedad, no es claro si son las células blanco iniciales y qué es lo que media el contacto inicial entre el virus y la célula hepática. En ausencia de un modelo animal que reproduzca la enfermedad del Dengue y dadas las dificultades asociadas con el manejo de las células primarias humanas, los estudios de la infección por el DENV se han llevado a cabo utilizando líneas celulares de hepatoma humano (Cabrera-Hernández y Smith, 2005).

Thepparit y Smith (2004) mediante ensayos de VOPBA y espectroscopía de masas identificaron en las células HepG2, el receptor de la laminina 37/67 kDa. Utilizando una combinación del ligando natural para este receptor (laminina soluble) y anticuerpos contra este receptor, los autores observaron que era específico solo para el DENV-1.

Se propone que la proteína de 37 kDa es un precursor que genera la proteína madura de 67 kDa. Este proceso de maduración involucra la dimerización y la acilación del

precursor, sin embargo, la relación de las dos formas no está totalmente entendida. El receptor de la laminina de 37/67 kDa es expresado en los hepatocitos humanos y en las células del hepatoma (Cabrera-Hernández y Smith, 2005).

Adicionalmente, Jindadamrongwech y Smith (2004) mediante ensayos de VOPBA en extractos de membranas de la línea celular HepG2 identificaron proteínas de unión al DENV de aproximadamente 78-80, 90, 98 y 102 kDa para DENV-2, 130 y 182 kDa para DENV-3, mientras que para DENV-4 90 y 130 kDa. Posteriormente mediante ensayos de VOPBA y espectroscopía de masas, estos autores identificaron a la proteína de 70 kDa como una proteína relacionada a la glucosa, GRP78 (BiP). El tratamiento con anticuerpos anti-GRP78 resultó en la inhibición parcial de la infección con DENV-2 sugiriendo que se necesita un receptor adicional. La proteína GRP78 es homóloga a la proteína de choque térmico y se encuentra principalmente en el retículo endoplásmico, donde puede asistir en el plegamiento correcto de las proteínas.

## **2.2 Receptores descritos para el virus Dengue en células de insecto**

Además de los posibles receptores en células de mamífero, Salas-Benito y Del Ángel (1997) reportaron mediante ensayos de unión, que el DENV-4 (cepa H-241), marcado radioactivamente con  $^{35}\text{S}$ [Metionina], se une específicamente a la monocapa de células C6/36 (línea celular derivada de las larvas de *Ae. albopictus*) de manera dosis-dependiente y saturable, lo cual es característico de las interacciones específicas entre un receptor y su ligando, sugiriendo la presencia de un receptor específico para el DENV, en células C6/36.

Asimismo, identificaron mediante ensayos de unión al virus (VOPBA), la presencia de dos receptores putativos de 40 y 45 kDa en las células C6/36. Además, observaron bajo condiciones isotónicas, una proteína de aproximadamente 30-35 kDa en la membrana celular la cual se une al DENV-4 (Cuadro 2).

Para analizar el posible papel de los carbohidratos en la unión del DENV, las células C6/36 fueron preincubadas con peryodato de sodio y con neuraminidasa, sin embargo no se

presentó una inhibición de la unión del DENV, sugiriendo que los carbohidratos no son esenciales para la unión con el virus. Además los autores efectuaron ensayos de VOPBA utilizando proteínas totales obtenidas después del tratamiento con tripsina, neuraminidasa y peryodato de sodio. Ninguna banda fue detectada por el virus Dengue en el extracto de proteínas totales tratadas con tripsina, sin embargo, las proteínas de 40 y 45 kDa fueron observadas después del tratamiento con neuraminidasa, sugiriendo que: a) el ácido siálico no es esencial en la unión con el virus, b) que estas proteínas carecen de ácido siálico. Cuando las proteínas totales de las células C6/36 fueron incubadas con peryodato de sodio la unión al virus marcado radioactivamente no se alteró, sin embargo los pesos moleculares de las proteínas de 40 y 45 kDa que se unen al virus fueron modificadas (38 kDa) sugiriendo que las proteínas de 40 y 45 kDa son glicoproteínas, sin embargo los carbohidratos no son esenciales en la unión con el DENV-4. Para corroborar que las proteínas de 40 y 45 kDa localizadas en las membranas de las células C6/36 son glicoproteínas, elaboraron ensayos de Western blot con la lectina Aglutinina I, la cual reconoce a las proteínas de 40 y 45 kDa sugiriendo la presencia de  $\beta$ -galactosa en estas proteínas.

La preincubación de la monocapa de las células C6/36 con las proteínas de 40 y 45 kDa electroeluidas inhibió en un 90% la unión del DENV-4 marcado a las células C6/36.

Los anticuerpos policlonales contra las proteínas de 40 y 45 kDa obtenidas después de la inmunización de ratones Balb/c con las proteínas electroeluidas, fueron capaces de detectar principalmente la proteína de 45 kDa y en menor proporción a las proteínas 40, 32, 28 y 20 kDa en los ensayos de Western blot.

La localización de las proteínas de 40 y 45 kDa se evaluó mediante ensayos de inmunofluorescencia. Los anticuerpos policlonales contra ambas proteínas fueron capaces de reaccionar con la superficie de las células C6/36 no permeabilizadas, y en menor proporción reaccionaron con el citoplasma de estas células. Los resultados indican que las proteínas de 40 y 45 kDa se encuentran en la superficie de las células C6/36.

La presencia de las proteínas de 40 y 45 kDa en la superficie de las células C6/36 y el hecho de que las proteínas electroeluidas y los anticuerpos anti-p40/45 inhiben la unión con

el virus apoya la hipótesis de que los posibles receptores de 40 y 45 kDa forman parte del complejo receptor para el virus Dengue.

Mendoza y colaboradores (2002) examinaron el papel de las proteínas de 40 y 45 kDa durante la infección con el DENV-4 purificado (cepa H-241). Observaron que los anticuerpos anti-p40/45 son capaces de bloquear el efecto citopático (ECP) inducido por el DENV-4 a los cinco días posteriores a la infección.

Además, mediante ensayos de VOPBA identificaron que el DENV-4 interactúa con las proteínas de 40 y 45 kDa en el extracto total de los huevos de *Ae. aegypti*. Asimismo determinaron que la proteína de 45 kDa del extracto total de larvas, pupas, cabeza, tórax y abdomen de *Ae. aegypti* interactúa con el DENV-4. Encontraron que la proteína de 40 kDa localizada solo en el abdomen interactúa con el DENV-4. Por otra parte, reportaron que el DENV-4 es capaz de unirse a las proteínas de 45 y 30-35 kDa presentes en el extracto total de glándulas salivales, intestino medio y ovarios (Cuadro 2).

El DENV-4 se une con mayor eficiencia a la proteína de 30-35 kDa ubicada en el intestino medio y los ovarios que a la proteína de 30-35 kDa de las glándulas salivales. Sin embargo, ninguna proteína fue reconocida por el DENV-4 en el extracto total de los tubos de Malpighi. Los autores propusieron que el patrón de distribución de los receptores putativos en los diferentes tejidos correlacionaba con el tropismo de tejidos en la infección por el DENV en el mosquito *Ae. aegypti*. Por otra parte, observaron mediante VOPBA que ninguna proteína presente en los extractos totales de huevos, larvas, pupas y tejidos de hembras y machos: glándulas salivales, intestino medio y ovarios de *Anopheles albimanus* (vector de la malaria, e insecto no susceptible a la infección por el DENV) fue reconocida por el DENV-4, indicando la especificidad de los receptores putativos en las células del mosquito *Ae. aegypti*.

Los autores sugieren que las proteínas de unión al DENV-4 presentes en huevos, larvas, pupas, cabeza, tórax, abdomen, glándulas salivales, intestino medio y ovarios están relacionadas con las glicoproteínas de 40 y 45 kDa reportadas anteriormente por Salas-

Benito y Del Ángel (1997) debido a que son reconocidas por el anticuerpo policlonal anti-p40/45.

Por otra parte, Mendoza y colaboradores reportaron que el anti-p40/45 reconoce a dos proteínas la de 40 kDa ubicada en el abdomen del mosquito macho y la proteína de 45 kDa encontrada en el extracto total de cabeza, tórax y abdomen del mosquito macho *Ae. aegypti*. Asimismo el anti-p40/45 reconoce a la proteína de 80 kDa presente en el tórax del mosquito macho.

Salas-Benito y colaboradores (2007) obtuvieron mediante cromatografía de afinidad, al receptor putativo de 45 kDa (de las proteínas de la fracción eluida) presente en las células C6/36, el cual interactúa con la proteína E recombinante del virus Dengue. Mediante espectroscopía de masas (MALDI-ToF) y secuenciación aminoterminal (degradación química de Edman), reportaron que ocho de 16 aminoácidos (aminoterminales) están presentes y altamente conservados en la secuencia aminoterminal de varias proteínas G de nematodos. Asimismo, cuatro péptidos obtenidos con el análisis MALDI-ToF corresponden al dominio de unión GTP presente en la proteína G del artrópodo *Lithophane hemina*. Sugiriendo que la glicoproteína de 45 kDa es una proteína G.

Igualmente, para caracterizar a las otras proteínas de la fracción eluida que interactúan con la proteína E del virus Dengue, obtenidas mediante cromatografía de afinidad, los autores llevaron a cabo ensayos de Western blot, utilizando anticuerpos monoclonales contra las proteínas de choque térmico: anti-HSP90 y anti-HSP70. El anticuerpo monoclonal anti-HSP90 detectó dos proteínas en la fracción eluida, la glicoproteína de 45 kDa (gp45) y una proteína adicional de 74 kDa (p74), con lo cual, sugieren que ambas proteínas comparten un epítotope con la proteína de choque térmico humana de 90 kDa. Por el contrario, el anticuerpo anti-HSP70 no detectó ninguna proteína en la fracción eluida. Para corroborar que la gp45 y la p74 interactúan con el virus se realizó un ensayo de VOPBA. El DENV-2 se une a la gp45, así como también a las proteínas de 60, 74 y 80 kDa.

Asimismo mediante la inmunoprecipitación de las proteínas biotiniladas los autores observaron un incremento en la cantidad de la gp45 y la p74 después del tratamiento de choque térmico. Las células C6/36 sin tratamiento y tratadas con choque térmico fueron marcadas en su superficie con biotina y los extractos de éstas células fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo policlonal anti-gp45. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas mediante SDS-PAGE e incubadas con estreptavidina acoplada a peroxidasa. Se observó la presencia de ambas moléculas en la superficie de las células sin tratamiento. Además una cantidad mayor de ambas proteínas fue identificada en la superficie de las células tratadas con choque térmico, lo que apoya la conclusión de que la gp45 y la p74 se encuentran en la superficie de las células C6/36 en condiciones normales y que su presencia en la superficie de las células es exacerbada después del tratamiento de choque térmico. Por otra parte analizaron mediante citometría de flujo, la unión del DENV a las células no permeabilizadas sin tratamiento y con tratamiento de choque térmico durante una hora. Los resultados muestran que el DENV-2 se une a la superficie de las células de manera más eficiente después del tratamiento de choque térmico. También, analizaron mediante ensayo de placa lítica en células BHK-21, el efecto de choque térmico en la infección viral. Sin embargo, la cantidad de virus presente en las células C6/36 sin tratamiento y con tratamiento de choque térmico no fue alterada.

Muñoz y colaboradores (1998) identificaron mediante VOPBA cinco polipéptidos de 80 kDa, 67 kDa, 79 kDa, 65 kDa y 19 kDa provenientes de las proteínas de membrana de células C6/36 los cuales se unen al DENV-2 (NGC: cepa de Nueva Guinea) biotinilado.

La unión del virus Dengue a la monocapa de células C6/36 fue inhibida mediante anticuerpos anti-membrana de las células C6/36. Asimismo, las preparaciones de membranas purificadas redujeron significativamente el ECP en las células C6/36.

Para determinar la naturaleza bioquímica de los receptores putativos para el DENV-2 se incubaron las células C6/36 con neuraminidasa y se analizaron mediante VOPBA, el reconocimiento de los polipéptidos por el virus Dengue no fue afectado, lo cual sugirió que el ácido siálico no es un componente de los receptores putativos. Por otra parte, la monocapa de células C6/36 fue tratada con tripsina previo a la infección con el DENV-2.

Los resultados demuestran que el tratamiento con tripsina inhibe la infección viral, lo que sugiere fuertemente que los receptores putativos presentes en las células C6/36 que interactúan con el DENV-2 involucran proteínas. De esta manera los autores proponen que los polipéptidos identificados forman parte del complejo receptor para el DENV-2.

Mercado-Curiel y colaboradores (2006) identificaron mediante VOPBA dos polipéptidos de 67 kDa y 80 kDa en el intestino medio del mosquito vector *Ae. aegypti* los cuales se unen al DENV-2 (NGC) biotinilado (Cuadro 2). Asimismo, para purificar los receptores putativos mediante cromatografía de afinidad, pasaron las proteínas del intestino medio de *Ae. aegypti* y las proteínas de membrana de las células C6/36 a través de una columna de sefarosa 4B acoplada al DENV-2, e identificaron dos proteínas de 67 kDa y 80 kDa en el intestino medio de *Ae. aegypti*.

Para determinar que los receptores putativos presentes en el intestino medio de *Ae. aegypti* son similares a los receptores putativos de las células C6/36 de *Ae. albopictus*, la superficie apical de las células C6/36 fue marcada radioactivamente con  $^{125}\text{I}$  e inmunoprecipitada con los anticuerpos anti-membrana C6/36 y anti-intestino medio (anti-MG), y se identificaron dos proteínas de 67 kDa y 80 kDa.

Además, para evaluar si los cuatro serotipos del virus Dengue reconocen los mismos receptores putativos, las proteínas de membrana de las células C6/36 marcadas radioactivamente se incubaron con DENV-1 (cepa de Hawái), DENV-2 (NGC), DENV-3 (cepa H-87) y DENV-4 (cepa H-341) y se precipitaron con los anticuerpos monoclonales contra cada serotipo. Los cuatro serotipos de virus Dengue reconocieron las proteínas de 67 kDa y 80 kDa.

La especificidad de los anticuerpos anti-R80 (anti-proteína de 80 kDa), anti-R67 (anti-proteína de 67 kDa), anti-MG y anti-membranas C6/36, utilizados en los ensayos de inhibición de la infección y la unión del DENV-2 a las células C6/36 fue analizada mediante Western blot e inmunofluorescencia. Los anti-R80 y anti-R67 reconocieron las proteínas de 80 y 67 kDa, respectivamente. Mediante ensayos de inmunofluorescencia, los anticuerpos anti-R80, anti-R67, anti-MG y anti-membranas C6/36 reconocieron proteínas

presentes en las membranas de las monocapas de células C6/36. Asimismo, el anti-R80 reconoció proteínas presentes en el citoplasma.

El artículo, documenta que las proteínas de 67 kDa y 80 kDa son receptores putativos para el DENV en el intestino medio de *Ae. aegypti* y en las células C6/36 de *Ae. albopictus*, debido a que anticuerpos específicos contra estas proteínas inhiben la unión y el efecto citopático del virus. Además, estos receptores putativos son específicos para los cuatro serotipos del virus Dengue. Estos resultados corroboran que el DENV utiliza múltiples moléculas de la superficie celular para unirse e infectar a la célula hospedera, algunas de las cuales pueden ser comunes para diferentes tipos celulares y que pueden ser compartidos entre los diferentes serotipos del virus Dengue.

Chee y AbuBakar (2004) mediante VOPBA identificaron una proteína de 48 kDa presente tanto en las proteínas totales como en las proteínas citosólicas de las células C6/36 la cual se une al DENV-2 (NGC) (Cuadro 2). La proteína de unión al DENV-2 de 48 kDa presente en la fracción citosólica fue detectada bajo condiciones reductoras y no reductoras en los ensayos de VOPBA. Por el contrario, dicha proteína no fue detectada en la fracción membranal.

La proteína de 48 kDa que se une específicamente al DENV-2 fue caracterizada mediante espectroscopía de masas (Maldi-ToF), encontrando 13 péptidos los cuales correspondían con  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina de diferentes especies incluyendo *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta de la Familia *Drosophilidae*),  $\beta$ -tubulina de *Caenorhabditis elegans* (nematodo de la Familia *Rhabditidae*) y *Rattus norvegicus* (rata parda de la Familia *Muridae*) y  $\alpha$ -tubulina de *Mus musculus* (ratón común de la Familia *Muridae*). Asimismo, mediante LC-MS/MS (cromatografía líquida/espectroscopía de masas) encontraron dos secuencias peptídicas correspondientes a  $\beta$ -tubulina/proteína parecida a la tubulina de diferentes especies de insectos como *Schistosoma japonicum* (gusano platelminto de la Clase Trematoda que causa esquistosomiasis), *Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori* (mariposa de seda de la Familia *Bombycidae*). Estos datos destacan la importancia de la tubulina en la infección por el DENV-2 en las células de mosquito C6/36.

Los autores sugieren que la unión inicial del DENV-2 con las células C6/36 probablemente se realiza mediante una interacción no proteica (por ejemplo mediante el heparán sulfato) y que los cambios celulares subsecuentes permiten el contacto entre la proteína E del DENV-2 y la proteína tubulina lo cual facilita la internalización del DENV-2 a las células del mosquito.

Cao-Lormeau (2009) identificó mediante ensayos de VOPBA en condiciones no reductoras, cuatro proteínas de extractos de glándulas salivales de *Ae. aegypti*, de 77 kDa, 58 kDa, 54 kDa y 37 kDa las cuales se unen a los cuatro serotipos del virus Dengue: DENV-1(Hawai 1944) DENV-2 (NGC, Hawai 1944) DENV-3 (H-87, Filipinas 1956) y DENV-4 (H-241, Filipinas 1956, Polinesia francesa 1979). Estas cuatro proteínas se detectaron con un anticuerpo policlonal anti-DENV. Asimismo, se identificó una proteína adicional de 67 kDa la cual se une al DENV-1 (Hawai 1944) y al DENV-4 (H-241, Filipinas 1956) cuando se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-proteína E del DENV.

El mismo autor, identificó mediante ensayos de VOPBA en condiciones no reductoras, cinco proteínas de extractos de glándulas salivales de *Ae. polynesiensis* de 67 kDa, 56 kDa, 54 kDa, 50 kDa y 48 kDa, que se unen al DENV-1(Hawai 1944) y al DENV-4 (H-241, Filipinas 1956), las cuales fueron detectadas con un anticuerpo monoclonal anti-proteína E del virus Dengue.

La infección de las glándulas salivales y la subsecuente inyección de la saliva infecciosa dentro del hospedero humano, son eventos clave en el ciclo de transmisión del virus Dengue. Por lo que la identificación de las diez proteínas de unión a los cuatro serotipos del DENV presentes en el extracto de las glándulas salivales de *Ae. aegypti* y *Ae. polynesiensis* es un precedente para la caracterización de a) las proteínas involucradas en la unión y la entrada del DENV a las glándulas salivales del mosquito y b) las proteínas secretoras de la saliva que pueden unirse al virus y ser depositadas en el humano cuando la hembra se alimenta de sangre.

**Cuadro 2. Receptores descritos para el virus Dengue en células de insecto**

LÍNEA CELULAR/ ESPECIES	TIPO CELULAR	SEROTIPO	CARACTERÍSTICAS DEL RECEPTOR	ENSAYOS UTILIZADOS	REFERENCIAS
C6/36	Línea celular de <i>Aedes albopictus</i>	DENV-4 cepa H-241	Dos glicoproteínas: 40 y 45 kDa; una proteína de 30-35 kDa	VOPBA, ensayos de bloqueo, ensayos de inmunofluorescencia	Salas-Benito y Del Ángel (1997)
C6/36	Línea celular de <i>Aedes albopictus</i> y extracto celular de huevos de <i>Ae. aegypti</i>	DENV-4 cepa H-241	Glicoproteína de 40 y 45 kDa	VOPBA	Mendoza <i>et al</i> (2002)
<i>Aedes aegypti</i>	Larvas, pupas, cabeza, tórax, glándulas salivales, intestino medio y ovarios		Glicoproteína de 45 kDa; proteína de 30-35 kDa		
C6/36	Línea celular de <i>Aedes albopictus</i>	DENV-2	Glicoproteína de 45 kDa, proteína de 74 kDa relacionada con HSP90	Cromatografía de afinidad, espectroscopia de masas, secuenciación amino-terminal, Western blot, inmunoprecipitación	Salas-Benito <i>et al</i> (2007)
C6/36	Línea celular de <i>Aedes albopictus</i>	DENV-2 NGC	Proteína tubulina de 48 kDa	VOPBA, espectroscopia de masas	Chee y AbuBakar (2004)
C6/36	Línea celular de <i>Aedes albopictus</i>	DENV-2 NGC	Proteínas de 80, 67, 79, 65 y 19 kDa	VOPBA, ensayos de bloqueo	Muñoz <i>et al</i> (1998)
C6/36, <i>Aedes aegypti</i>	Línea celular de <i>Aedes albopictus</i> e intestino medio	DENV-1 cepa Hawai, DENV-2 NGC, DENV-3 cepa H-87 y DENV-4 cepa H-341	Proteínas de 80 y 67 kDa	Cromatografía de afinidad, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de bloqueo	Mercado-Curiel <i>et al</i> (2006)
<i>Aedes aegypti</i>	Glándulas salivales	DENV-1 cepa Hawai 1944; DENV-2 NGC y cepa Hawai 1944; DENV-3 cepa H-87 y Filipinas 1956; DENV-4 cepa H-241	Proteínas de 77, 58, 54 y 37 kDa	VOPBA	Cao-Lormeau (2009)
<i>Aedes polynesiensis</i>	Glándulas salivales	DENV-1 cepa Hawai 1944; DENV-4 cepa H-241 y Filipinas 1956	Proteínas de 67, 56, 54, 50 y 48 kDa		

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las interacciones tempranas que se llevan a cabo entre el DENV y la superficie de las células del mosquito vector, son esenciales tanto para la internalización como para la generación de una infección productiva en la célula diana, por lo que el éxito de estos eventos depende del reconocimiento de receptores específicos en la superficie celular por el virus.

El virus Dengue utiliza por lo menos dos tipos de receptores diferentes para interactuar con la célula huésped, un receptor de baja afinidad o molécula de unión, el cual concentra al virus en la superficie celular y permite la interacción del mismo con un receptor de alta afinidad que posibilita su internalización, a través de endocitosis dependiente de clatrina.

En condiciones naturales, el DENV infecta primero a los tejidos del mosquito vector y después al humano el cual adquiere al virus a través de la picadura del mosquito durante la ingesta de sangre. Debido a que el intestino de *Aedes aegypti* es considerado como el mejor candidato para interrumpir el ciclo replicativo del virus ya que constituye la interacción más temprana entre el insecto y el virus, nos propusimos identificar y caracterizar las moléculas de unión (posibles receptores) al DENV-2 presentes en las células epiteliales de los intestinos en el mosquito hembra *Ae. aegypti*.

Por otra parte, se ha reportado la presencia del DENV durante periodos interepidémicos, por lo que se sugiere que la transmisión transovárica del virus en el vector, puede jugar un papel importante en el mantenimiento del virus en la naturaleza. Igualmente, este puede ser el mecanismo por el cual, el DENV sobrevive en estaciones frías y secas, durante la ausencia temporal de hospederos vertebrados infectados. Asimismo poco se conoce acerca de las moléculas de interacción con el DENV presentes en los ovarios ó del mecanismo de infección de este tejido. Por lo tanto, nos propusimos identificar y caracterizar las moléculas de unión al DENV presentes en los ovarios del mosquito hembra *Ae. aegypti*.

La identificación y caracterización de las moléculas de interacción con el DENV en estos tejidos, representan un paso crucial en el entendimiento del tropismo viral y la

patogenia. Asimismo, para el diseño de estrategias antivirales efectivas, el entendimiento de los pasos fundamentales del ciclo replicativo del DENV, que incluye las interacciones tempranas entre el virus y su mosquito vector, es esencial.

#### **IV. HIPÓTESIS**

◆ Existen moléculas de unión (posibles receptores) en los intestinos y en los ovarios del mosquito hembra *Aedes aegypti* que reconocen al DENV, serotipo 2.

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

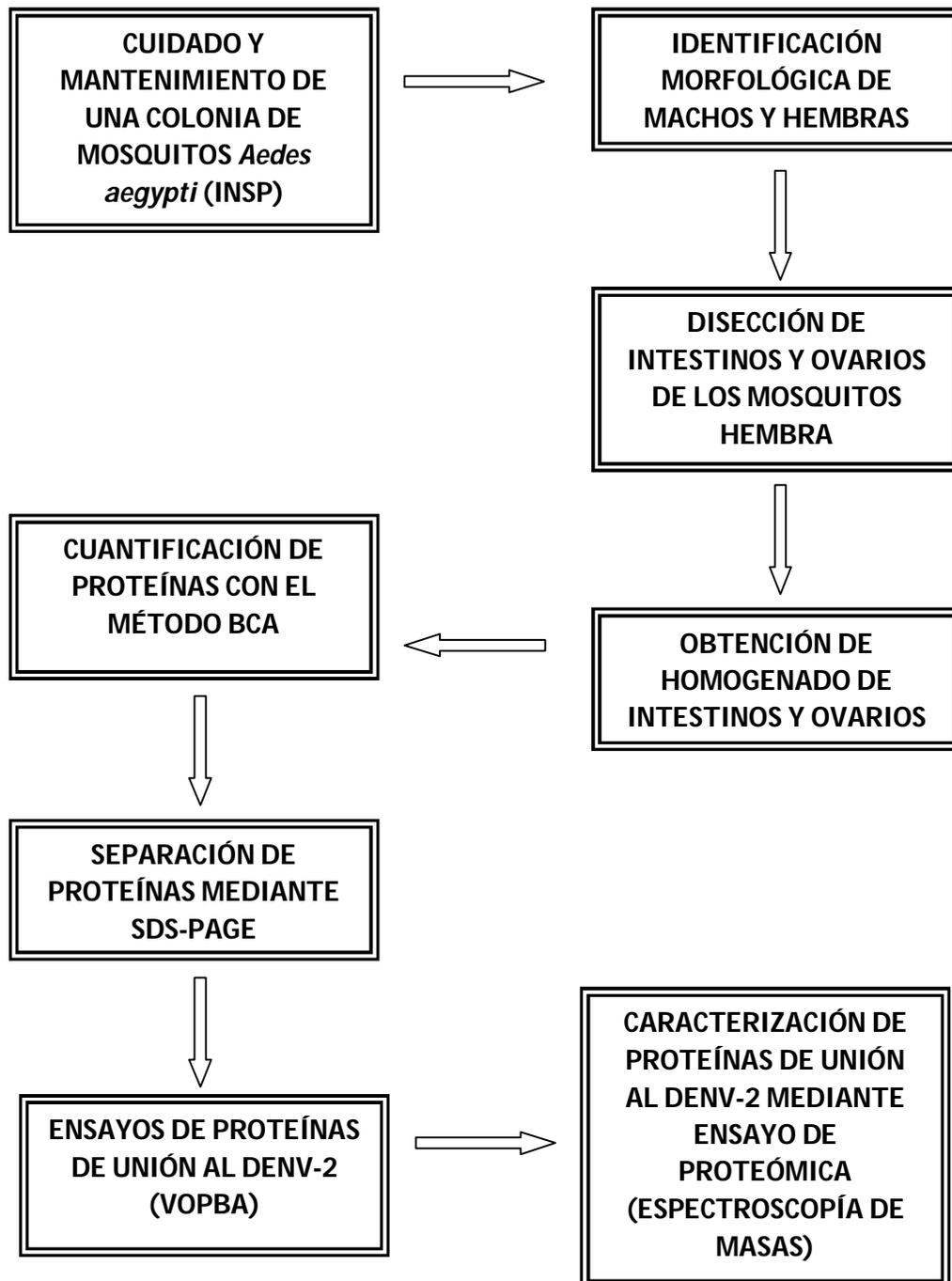
◆ El objetivo general del presente trabajo es identificar y caracterizar las moléculas involucradas en la unión (posibles receptores) del virus Dengue serotipo 2 presentes tanto en los intestinos como en los ovarios del mosquito hembra *Aedes aegypti*.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ◆ Obtención de tejidos (intestinos y ovarios) del mosquito hembra *Aedes aegypti*.
- ◆ Identificación de las posibles moléculas de interacción con el DENV-2 (NGC) en los intestinos y ovarios, mediante VOPBA.
- ◆ Caracterización de las posibles moléculas de interacción con el DENV-2 (NGC) en los intestinos y ovarios, mediante análisis proteómico.

## VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con base en los objetivos planteados se llevó a cabo el siguiente diseño experimental:



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Mantenimiento de la colonia de mosquitos *Aedes aegypti*

Los mosquitos de la especie *Aedes aegypti* fueron obtenidos del Insectario del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en Cuernavaca, Morelos. La colonia de mosquitos (~250 adultos) permaneció en un contenedor cilíndrico de plástico (21 cm de diámetro x 15 cm de alto), en el que la pared y el techo fueron reemplazados con una malla cuadrículada de plástico (Figura 25). Para la alimentación de los mosquitos, se dispusieron sobre la malla del techo del contenedor, algodones embebidos en una solución de sacarosa al 10% los cuales eran renovados cada dos días. La colonia se mantuvo a una temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , con un porcentaje de humedad relativa del 70 al 80% y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.



Figura 25. Contenedor entomológico. Imagen capturada con la cámara digital Fujifilm A850.

## 7.2 Identificación del sexo en el mosquito *Aedes aegypti*

Los mosquitos se retiraron del contenedor mediante un aspirador entomológico manual, el cual se colocó en el congelador a -18°C durante ~60 segundos, posteriormente se depositaron en una caja Petri sobre hielo. En seguida, cada mosquito hembra y macho se colocó en un portaobjetos y se observó al microscopio estereoscópico 4x (National 431TBL) para identificar el sexo de cada individuo de acuerdo a las características morfológicas correspondientes al cuadro 1.

**Cuadro 2. Características morfológicas para la determinación del sexo en *Ae. aegypti***

	<b>Hembra</b>	<b>Macho</b>
<b>Palpos maxilares largos</b>	Ausencia	Presencia
<b>Antenas plumosas</b>	Ausencia	Presencia
<b>Palpos maxilares cortos</b>	Presencia	Ausencia
<b>Antenas simples</b>	Presencia	Ausencia

## 7.3 Disección de los tejidos del mosquito *Aedes aegypti*

Posterior a la identificación del sexo de los mosquitos, se seleccionaron sólo a las hembras de por lo menos 3 días después de emerger de la pupa (d.p.e), para llevar a cabo la disección de los intestinos y los ovarios. Se retiraron (manualmente) del tórax del mosquito las seis patas, para facilitar la disección y se colocó el mosquito en un portaobjetos que contenía 100 µl de buffer fosfato salino (10 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl a pH 7.0), para observarlo al microscopio estereoscópico 4x (National 431TBL), en seguida se retiró la cabeza con una microaguja entomológica de disección (8 mm de largo x 31G de grosor), posteriormente se introdujo la microaguja en el área de sujeción (en el mesonoto) y se

colocó otra microaguja (13 mm de largo x 30G de grosor) en el segmento abdominal VII (Figura 26) jalándolo lentamente (hacia la derecha) hasta obtener los ovarios y los intestinos. En seguida se retiraron del intestino los siguientes tejidos: el divertículo ventral, los dos divertículos dorsales, los cinco tubos de Malpighi y el recto (Figura 27), posteriormente se colocó la microaguja (20 mm de largo x 31G de grosor) por debajo del estómago y se levantó para depositarse en un tubo estéril de 0.2 ml (Costar 6571), que contenía 20  $\mu$ l de buffer fosfato salino y 20  $\mu$ l de inhibidores de proteasas (Roche 11245300).

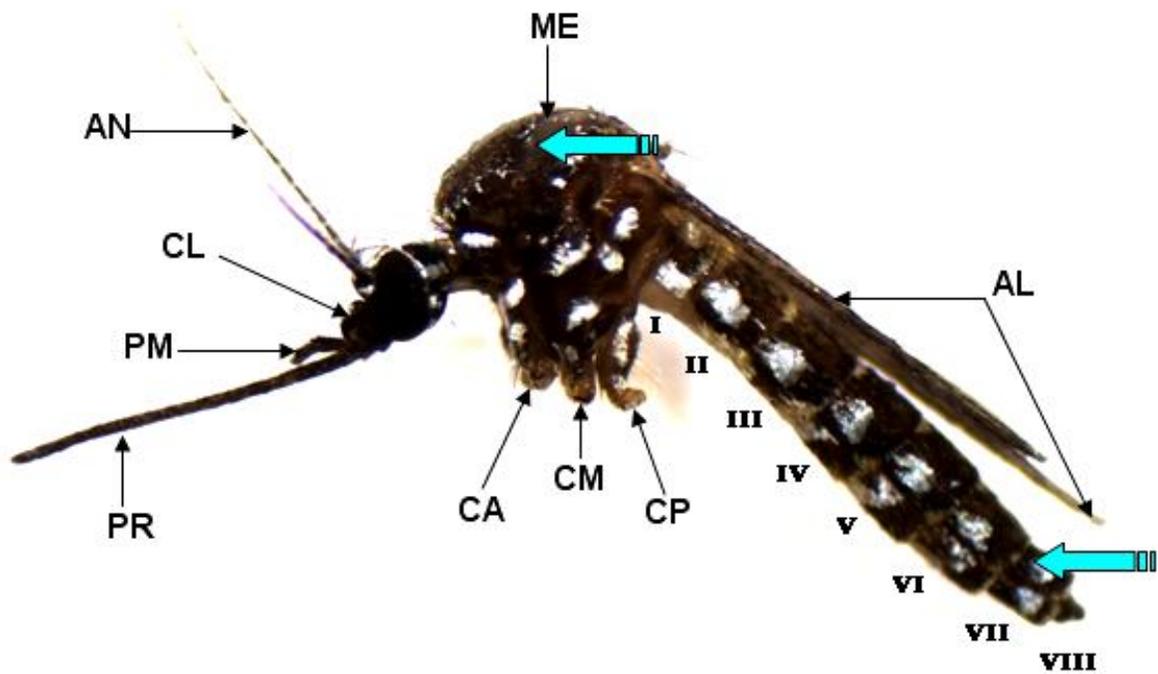


Figura 26. Vista lateral del cuerpo del mosquito hembra *Ae. aegypti*, donde se muestran las partes utilizadas en la disección de tejidos: el área de sujeción y el segmento abdominal VII (señalados con las flechas azules). AL, alas; AN, antena; CA, coxa anterior; CL, clípeo; CM, coxa media; CP, coxa posterior; ME, mesonoto; PM, palpo maxilar; PR, probóscide; I-VIII, segmentos abdominales. Imagen capturada con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 25x.

Asimismo, se colocó la microaguja (20 mm de largo x 31G de grosor) por debajo de los ovarios y se depositaron en un tubo estéril de 0.2 ml (Costar 6571), que contenía 20  $\mu$ l de buffer fosfato salino y 15  $\mu$ l de inhibidores de proteasas (Roche 11245300). Los intestinos se disectaron en grupos de 12, mientras que los ovarios se obtuvieron en grupos de 20 pares. Los tejidos se mantuvieron a  $-18^{\circ}$  C hasta su uso.

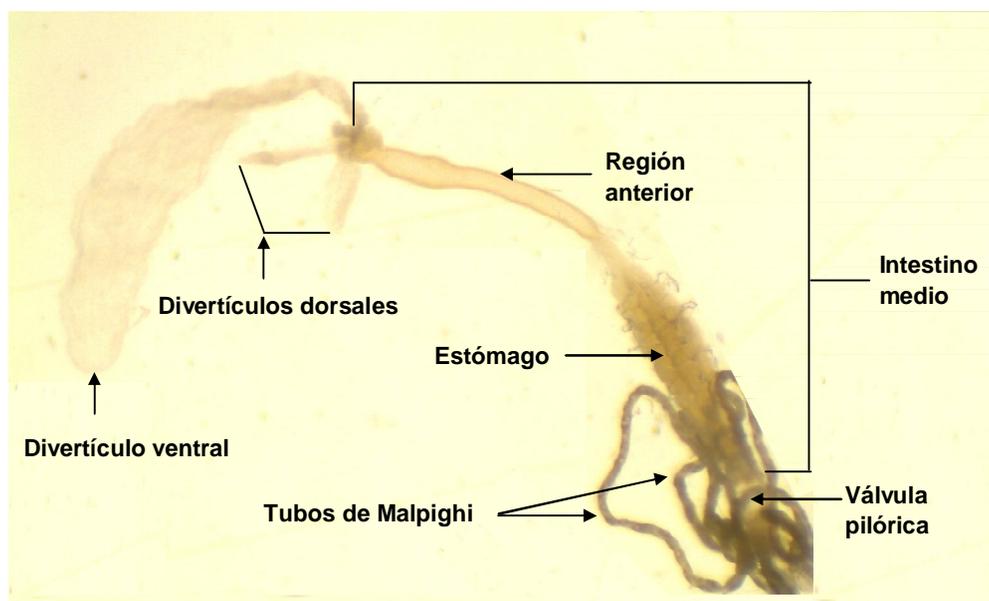


Figura 27. Canal alimentario del mosquito hembra *Ae. aegypti*, donde se muestran los tejidos que fueron seccionados con microagujas entomológicas: divertículos dorsales, divertículo ventral y tubos de Malpighi. Imagen capturada con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 25x.

#### 7.4 Obtención del homogenado de tejidos de *Aedes aegypti*

Para fraccionar gentilmente las células de los tejidos disectados, cada una de las alícuotas de los intestinos y los ovarios (Figura 28) se sometieron a un tratamiento de congelación (sumergiéndolas en nitrógeno líquido, a  $-196^{\circ}$  C) y descongelación (sumergiéndolas en agua bidestilada tibia, a  $35^{\circ}$  C) en siete ocasiones. Posteriormente, los tejidos disectados se

agitaron y se fraccionaron mediante sonicación (ultrasonic Cole-Parmer 8849-00), durante 10 minutos.

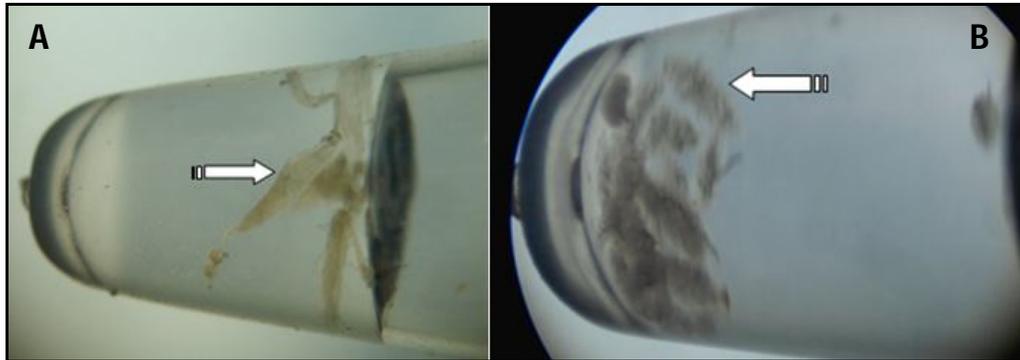


Figura 28. Se muestran los intestinos (A) y los ovarios (B) disectados y colocados en tubos costar (señalados con las flechas blancas). Imagen capturada con el microscopio estereoscópico National, acoplado a una cámara digital Fujifilm A850. A, objetivo 2x; B, objetivo 4x.

### 7.5 Cuantificación de proteínas mediante micro BCA

La determinación de la concentración de proteínas del Homogenado de Intestinos (HIN) y del Homogenado de Ovarios (HOV) se llevó a cabo mediante micro BCA (Ácido bicinconínico). Este método utiliza BCA el cual forma un complejo púrpura intenso con iones  $\text{Cu}^{1+}$  que se forma cuando el  $\text{Cu}^{2+}$  es reducido por una proteína en un medio alcalino. El color púrpura característico de esta reacción se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión de cobre ( $\text{Cu}^{1+}$ ). Este complejo que es soluble en agua, presenta una absorbancia a 540 nm y es proporcional con el incremento de la concentración de la proteína. La estructura macromolecular de la proteína, el número de enlaces peptídicos y la presencia de tres aminoácidos (cisteína, triptófano y tirosina) son responsables de la formación del color en presencia de BCA (Smith *et al*, 1985).

Se llevó a cabo una curva patrón de BSA (albúmina sérica bovina; Thermo Scientific 23209) partiendo de una concentración de 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , se colocaron las muestras del HIN y

del HOV por triplicado en una placa de 96 pozos y se les agregó BCA como a continuación se detalla:

**CURVA PATRÓN**

		1			2			3			4			5			6			7		
A	BCA	AGUA	BSA	BCA	AGUA	BSA	BCA	AGUA	BSA	BCA	AGUA	BSA	BCA	AGUA	BSA	BCA	AGUA	BSA	BCA	AGUA	BSA	
		150 µl	50 µl	—	150 µl	49 µl	1 µl	150 µl	48 µl	2 µl	150 µl	46 µl	4 µl	150 µl	42 µl	8 µl	150 µl	34 µl	16 µl	150 µl	18 µl	32 µl
B	BLANCO	150 µl	50 µl	—	150 µl	49 µl	1 µl	150 µl	48 µl	2 µl	150 µl	46 µl	4 µl	150 µl	42 µl	8 µl	150 µl	34 µl	16 µl	150 µl	18 µl	32 µl
C	BLANCO	150 µl	50 µl	—	150 µl	49 µl	1 µl	150 µl	48 µl	2 µl	150 µl	46 µl	4 µl	150 µl	42 µl	8 µl	150 µl	34 µl	16 µl	150 µl	18 µl	32 µl

		1			2		
		BCA	AGUA	HIN	BCA	AGUA	HOV
E		150 µl	48 µl	2 µl	150 µl	48 µl	2 µl
F		150 µl	48 µl	2 µl	150 µl	48 µl	2 µl
G		150 µl	48 µl	2 µl	150 µl	48 µl	2 µl

La placa se cubrió de la luz con papel aluminio y se depositó en una cámara húmeda (para evitar la evaporación), posteriormente se incubó a 37°C, durante 1:30 minutos, y se estimó la concentración de proteínas tanto de la curva patrón como del HIN y HOV a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (Thermo Lab system Multiskan Ascent, 54448307). Utilizando los valores obtenidos a partir del programa Multiskan Ascent, se realizó la curva patrón para determinar la concentración de proteínas del HIN y del HOV.

## 7.5 Ensayo de proteínas de unión al virus (VOPBA)

Para identificar las proteínas del HIN y del HOV que pudieran participar en la unión con el virus Dengue, se llevó a cabo un ensayo de proteínas de unión sobrelapadas al virus (VOPBA, por sus siglas en inglés *virus overlay protein-binding assay*). La separación de las proteínas totales del HIN y del HOV se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) utilizando un gel unidimensional de acuerdo a Sambrook y colaboradores (1989). Se elaboraron cuatro geles de poliacrilamida al 12%, asimismo se desnaturalizaron las proteínas del HIN y del HOV, hirviéndolas durante 5 minutos a 95°C en el buffer de carga (ver apéndice) que contiene dodecilsulfato sódico (SDS) y un agente reductor (2-mercaptoetanol), en cada pozo de los geles se cargaron 25 µg (concentración óptima de las proteínas) del HIN y del HOV. Para la estimación de los pesos moleculares de las proteínas del HIN y del HOV se incorporó a los cuatro geles un marcador de peso molecular, (Bio-Rad 161-0317) con un rango de 2.5 kda hasta 200 kda. Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis (Bio-Rad, mini-PROTEAN Tetra Cell 165-8025) con el buffer de corrimiento (ver apéndice) a 80 mV durante ~2 horas. Posteriormente, uno de los geles se tiñó con azul de coomassie G-250 (Bio-Rad 161-0406) y se retiró el exceso de colorante con solución desteñidora (ver apéndice), mientras que las proteínas de los otros tres geles se transfirieron a tres membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P Millipore IPVH00010) colocándose en dos cámaras de electrotransferencia (Bio-Rad Mini Trans-blot Cell 170-3989) con el buffer de transferencia (ver apéndice), a 96 mV, durante 2:40 hrs. Asimismo las cámaras de electrotransferencia se colocaron en dos cámaras frías para mejorar la calidad de la misma. Las membranas de PVDF con las proteínas transferidas del HIN y del HOV se tiñeron con rojo de Ponceau S (Sigma 0.1% Ponceau S p/v en 5% v/v de ácido acético; P7170-1L) durante 3 minutos para verificar la calidad de la transferencia, en seguida se cortaron los marcadores de peso molecular y se lavaron las membranas con las proteínas transferidas con agua Milli-Q (Millipore Biocel QTUM000IX) para retirar completamente el colorante, y se colocaron las membranas en PBS (buffer salino fosfato;

10 mM a pH 7.4) filtrado (ver apéndice) en tres cajas Petri estériles a 4°C, hasta el día siguiente. Posteriormente, se realizó un lavado de 5 minutos a las membranas con PBS filtrado, en agitación suave. Se bloquearon los sitios inespecíficos de unión en las membranas con TBST-BSA (BSA al 1% diluido en TBST pH 7.2) filtrado (ver apéndice), a temperatura ambiente durante 1:30 hrs., transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados en agitación suave con TBST (10 mM fosfato de sodio, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20 a pH 7.2) filtrado (ver apéndice) durante 10 minutos cada uno. Asimismo dos de las membranas se incubaron con 55 µl del DENV-2 (NGC;  $5.5 \times 10^4$  UFP) diluido en 1445 µl de TBST filtrado, a temperatura ambiente durante 35 minutos, mientras que la otra membrana (control negativo) se incubó con 1500 µl de TBST filtrado, al finalizar las tres membranas se lavaron en cuatro ocasiones con 15 ml de TBST filtrado, cada lavado duró 25 segundos, en seguida una de las membranas se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-proteína E del DENV (Millipore virus complex MAB8705) a una dilución 1:33 (diluido en TBST), durante 20 minutos a temperatura ambiente, mientras que las otras dos membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-DENV (producido en ratón Balb/c) a una dilución 1:33 (diluido en TBST), durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, todas las membranas se lavaron en cuatro ocasiones con 15 ml de TBST filtrado, cada lavado duró 25 segundos y se incubaron con el anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa (Millipore AP124P) a una dilución 1:1666 durante 16 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, las tres membranas se lavaron en cuatro ocasiones con 15 ml de TBST filtrado, cada lavado duró 25 segundos. La incubación con DENV-2 (ó TBST filtrado), primer y segundo anticuerpo, así como sus respectivos lavados se realizaron en el sistema Snap id (Millipore WBAVDATABASE). Al finalizar los lavados con el sistema Snap id, se agregó luminol (Santa Cruz Biothecnology, Western blotting reagent sc-2048 10109) a todas las membranas, y se colocaron entre los acetatos del cassette de revelado (ELK medical products), en seguida se depositó sobre las membranas una película negativa en blanco y negro (Kodak 604 0471), posteriormente la película se sumergió en solución reveladora (Kodak GBX 190 0943) durante 1 minuto; en agua durante 1 minuto (para detener la reacción), en solución fijadora (Kodak GBX 190 1875) durante 1 minuto y finalmente en agua durante 1 minuto. Al finalizar se secaron las películas (en posición inclinada) sobre recipientes de plástico.

## 7.6 Espectroscopía de masas

La caracterización de las proteínas de unión al DENV-2 en el HIN y en el HOV fue llevada a cabo mediante espectroscopía de masas (LC/ESI-MS/MS) en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, en colaboración con el Dr. Guillermo Mendoza Hernández del Departamento de Bioquímica.

Las proteínas del homogenado de intestinos de 82 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 31 kDa y 15 kDa, así como las proteínas del homogenado de ovarios de 67 kDa, 36 kDa, 31 kDa, 21 kDa y 17 kDa que interactuaron con el DENV-2 se cortaron a partir de un gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de coomassie G-250 y se digirieron con tripsina, para obtener diferentes fragmentos peptídicos, a los cuales se les determinó la masa (en el espectrómetro de masas), mediante la volatilización de las muestras para su posterior ionización a través del bombardeo de electrones. Los péptidos ionizados fueron acelerados en un campo eléctrico, los cuales posteriormente se pasaron a un detector para analizar el patrón específico de los péptidos ionizados. El tiempo que tardan en llegar al detector depende tanto de la masa como de su carga: los péptidos mayores se desplazan más despacio mientras que las moléculas con mayor carga lo hacen más rápido. La identificación de las proteínas fue llevada a cabo mediante el programa Mascot (<http://www.matrixscience.com>) con el que se realizó una búsqueda de las correspondencias entre las secuencias de proteínas de la base genómica de datos NCBI y las masas teóricas calculadas de los iones peptídicos obtenidos a partir de la digestión con tripsina. El criterio utilizado para aceptar la identificación válida de una proteína fue: dos o más péptidos de la secuencia proteica que tuvieran un score total mayor a 45.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Identificación del sexo en el mosquito *Aedes aegypti*

Para identificar el sexo en los mosquitos adultos *Ae. aegypti* se observaron sus características morfológicas, mediante un microscopio estereoscópico 4x. La hembra se distingue del macho por presentar antenas simples y palpos maxilares cortos (Figuras 29, 31 y 32). Además posee dos pequeños cercos dorsales situados en el último segmento abdominal (Figura 32). La hembra es casi del doble del tamaño del macho, es mucho más robusta y corpulenta (Figura 31).



Figura 29. Vista lateral del mosquito hembra *Ae. aegypti* (INSP), vector del virus Dengue. Imagen capturada con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 20x.

Por el contrario, los machos presentan antenas plumosas y palpos maxilares más largos que las hembras, casi del mismo tamaño que la probóscide (Figuras 30, 31 y 32). Las antenas de los machos poseen flagelos más largos que las hembras (Figura 32). Además los machos presentan un hipopigio en forma de pinza; cada brazo de esta pinza se compone basalmente por una pieza lateral y distalmente por un cláster (Figura 32), esta estructura es utilizada para sujetar a la hembra durante la cópula.



Figura 30. Vista lateral del mosquito macho *Ae. aegypti* (INSP) Imagen capturada con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 20x.



Figura 31. Vista lateral del mosquito hembra y el mosquito macho *Ae. aegypti* (INSP), mostrando las diferencias morfológicas entre los sexos. Se aprecia la diferencia de tamaño corporal entre ambos sexos, así como la diferencia de tamaño de los palpos maxilares. Imagen capturada con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 12.5x.

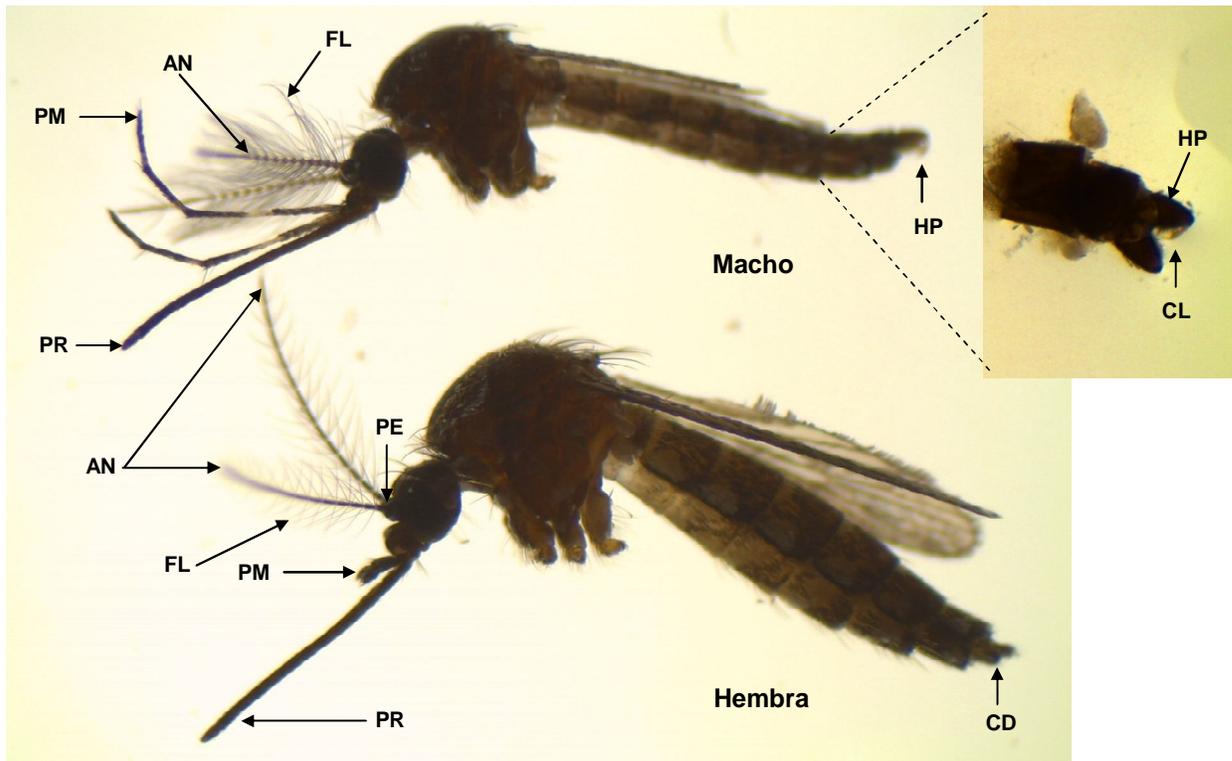


Figura 32. Dimorfismo sexual en *Ae. aegypti* (INSP). AN, antena; CD, cercos dorsales; CL, clásper; FL, flagelo; HP, hipopigio; PE, pedicelo; PM, palpo maxilar; PR, probóscide; Imagen capturada con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 16x.

## 8.2 Disección de los tejidos del mosquito *Aedes aegypti*

Al diseccionar los intestinos del mosquito hembra *Ae. aegypti* mediante un microscopio estereoscópico, se identificaron las regiones y estructuras que los conforman: a) el intestino medio, que se divide en región anterior y estómago, b) el intestino posterior (ó íleo). La región anterior del intestino medio permanece como una estructura tubular angosta bajo cualquier condición (en ayuno o después de la ingesta de sangre o solución azucarada). Cuando la hembra ingiere alimento, el estómago se distiende y adquiere la forma de un balón (Figura 33). Por el contrario, cuando el estómago se encuentra vacío (hembra en ayuno) es fusiforme, es decir, alargado y redondeado con las extremidades más estrechas

que el centro (Figura 34). El intestino posterior es un tubo angosto que muestra un activo peristaltismo al ser disectado en el buffer fosfato salino. Este se localiza entre la válvula pilórica (Figura 34) y el recto (no se observa en la Figura 34 ya que fue disectado). Se observaron los pliegues longitudinales mediante un microscopio invertido (Figura 35). Asimismo, se observaron las tráqueas y traqueolas viscerales ubicadas en el intestino medio y en el intestino posterior. Las traqueolas viscerales son tubos más estrechos que se originan de las tráqueas y proporcionan oxígeno a las células del intestino medio y posterior (Figuras 34 y 35).

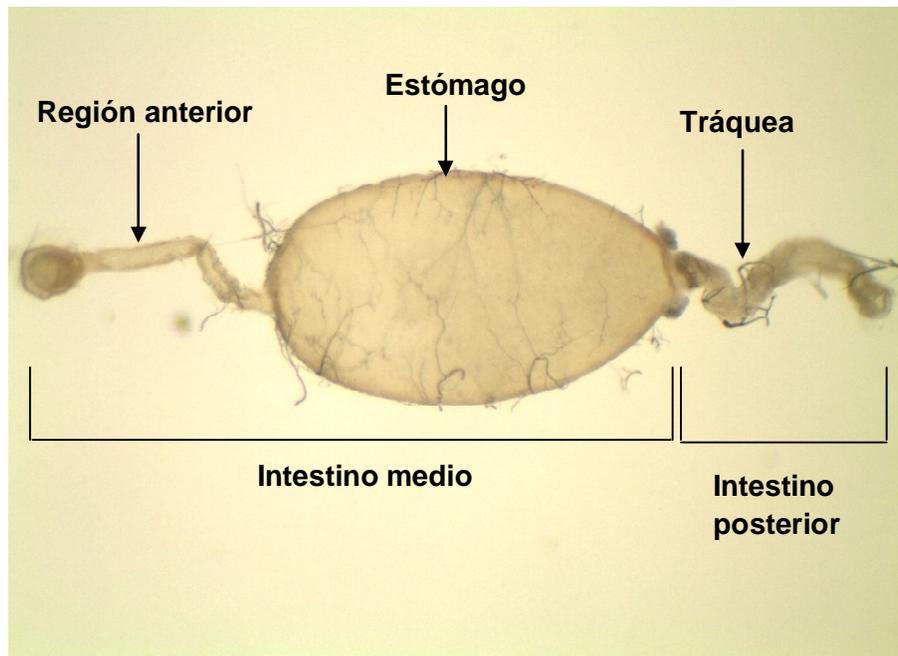


Figura 33. Vista lateral de los intestinos del mosquito hembra *Ae. aegypti*. Se puede apreciar que el estómago se encuentra muy distendido, de tal manera que no se pueden observar los pliegues longitudinales. Imagen capturada con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 20x.

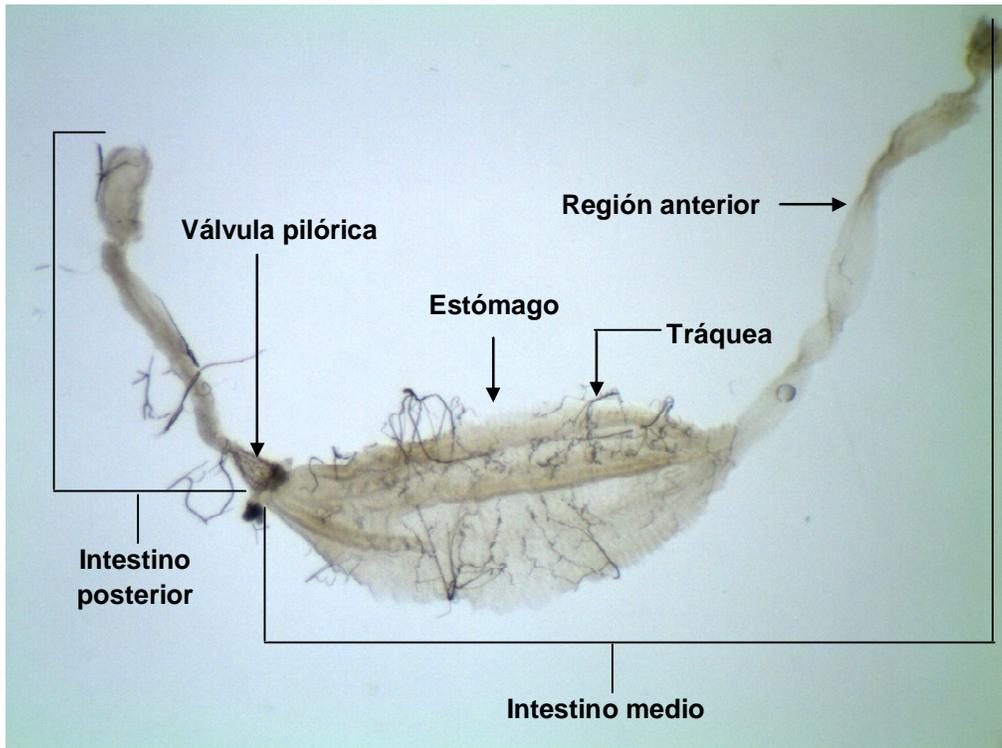


Figura 34. Vista lateral de los intestinos del mosquito hembra *Ae. aegypti* mostrando las regiones que los conforman. Imagen capturada con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 20x.

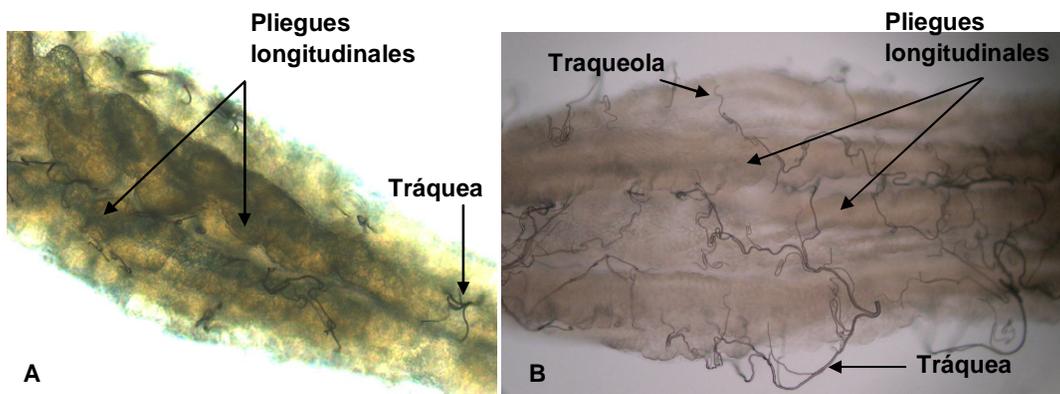


Figura 35. Vista lateral del estómago del mosquito hembra *Ae. aegypti*. A. Imagen capturada con el microscopio invertido Olympus IX71, filtro PH2 contraste de fases, objetivo 10x. B Imagen capturada con el microscopio óptico Nikon Optiphot 2, campo claro objetivo 10x.

Asimismo, se disectaron los ovarios del mosquito hembra *Ae. aegypti* mediante un microscopio estereoscópico y se identificaron las estructuras que los conforman: la pared del ovario que cubre a las ovariolas, el ligamento suspensorio, el oviducto lateral, el oviducto común, las tráqueas y las traqueolas (Figura 36 y 37). En la figura 36 se observa la espermateca, la cual es un reservorio para el esperma que es transferido a la hembra después de la cópula, esta estructura se encuentra colocada detrás del oviducto común y consiste de tres cápsulas espermatecales esclerotizadas (en la imagen solo se distinguen dos) que son de color café oscuro o vino. Además se identificó el folículo de una hembra nulípara con la ayuda de un microscopio invertido (Figura 38).

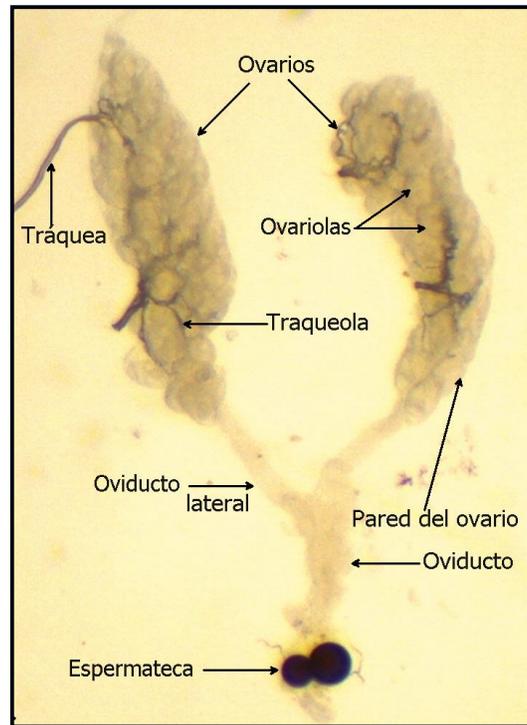


Figura 36. Vista dorsal de los órganos femeninos del mosquito *Aedes aegypti*. Imagen capturada con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 30x.

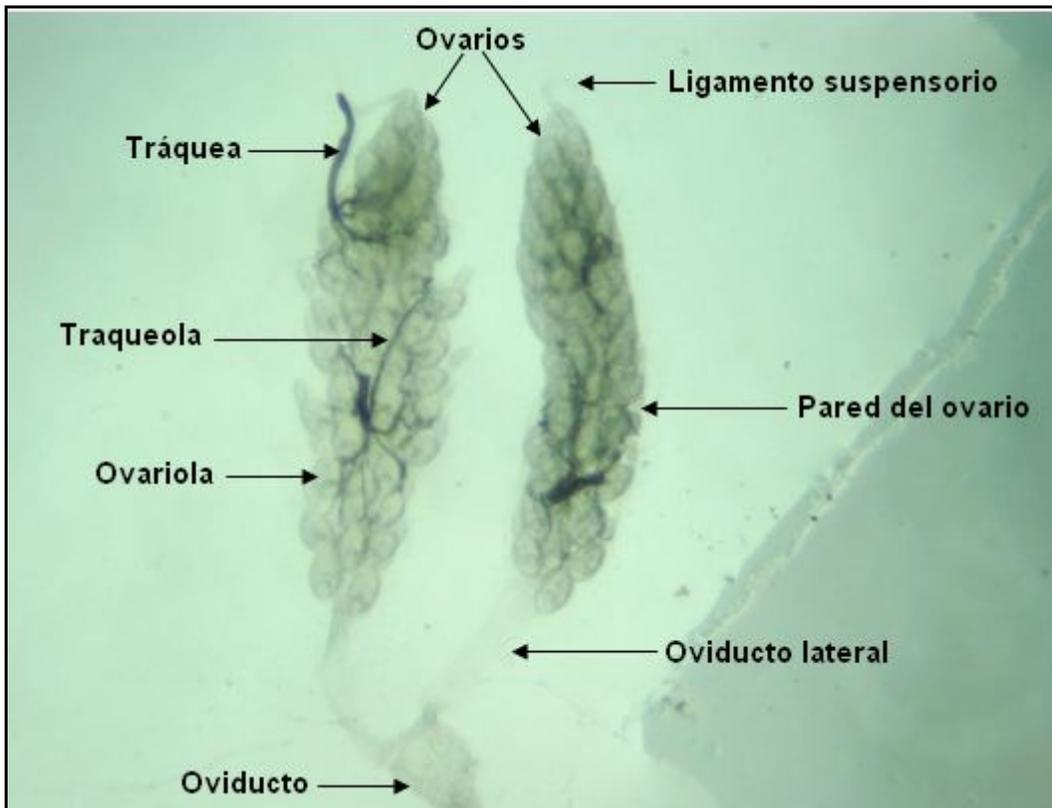


Figura 37. Órganos femeninos del mosquito *Aedes aegypti* (vista dorsal). Imagen capturada con el microscopio estereoscópico Leica EZ4D. Objetivo 25x.

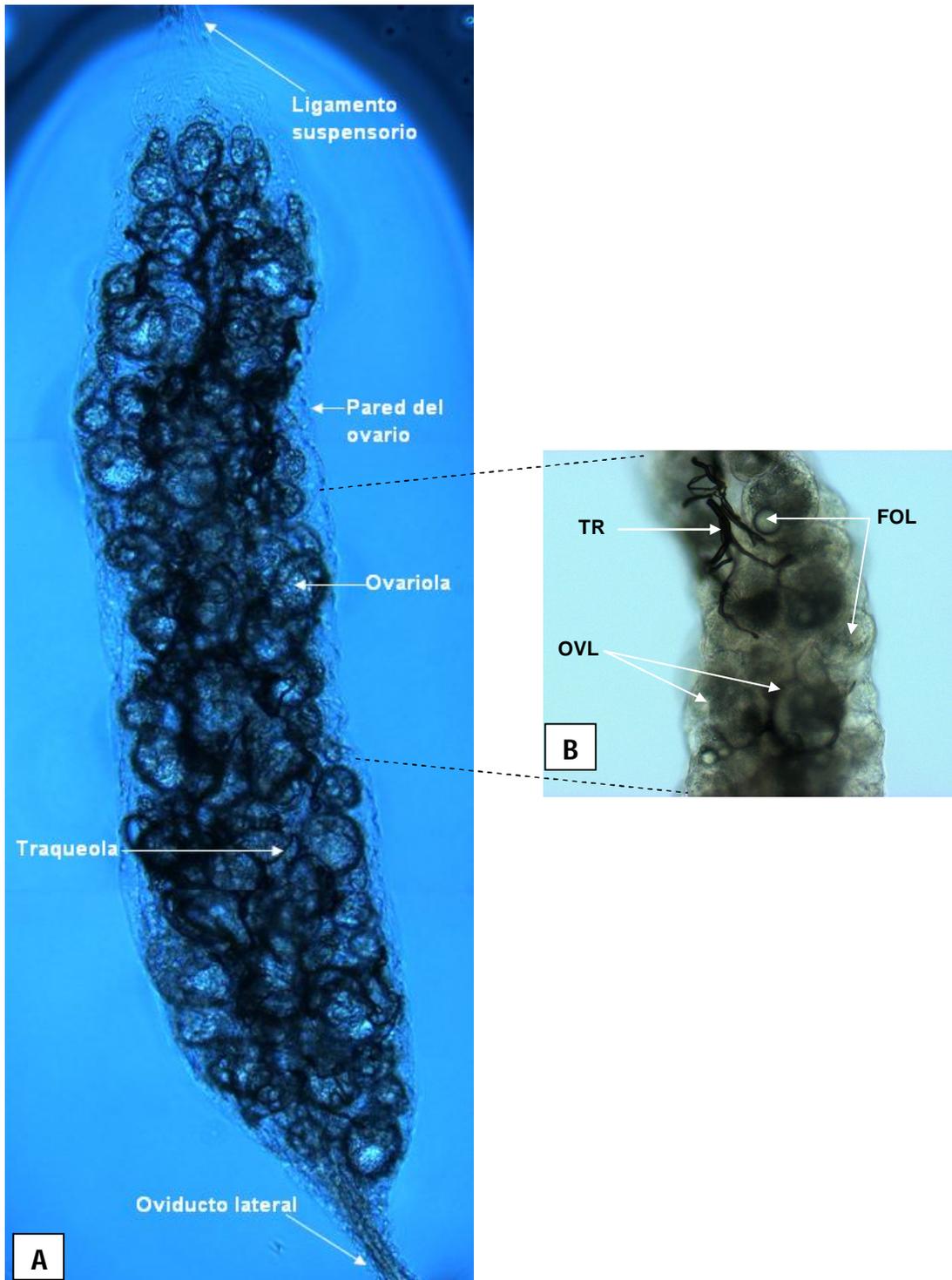


Figura 38. Estructura de los ovarios de la hembra nulípara *Ae. aegypti*. Imágenes capturadas con el microscopio invertido Olympus IX71. FOL, folículo; OVL, ovariolas; TR, tráquea. A, filtro PH2 contraste de fases; B, filtro BF campo claro sin contraste de fases. Objetivo 10x.

### 8.3 Cuantificación de proteínas del homogenado de tejidos mediante micro BCA

La determinación de la concentración de proteínas del Homogenado de Intestinos (HIN) y del Homogenado de Ovarios (HOV) se llevó a cabo por micro BCA (Ácido bicinconínico).

Se elaboró una curva patrón a partir de la cual se determinó la concentración de proteínas del HIN y el HOV (Figura 39). La curva se realizó con una concentración conocida de BSA. Se calculó la concentración de proteínas de los intestinos a partir de 80  $\mu\text{l}$  del HIN (2 alícuotas con 12 intestinos cada una) y se obtuvieron 3.551  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , con una cantidad total de 284.080  $\mu\text{g}$ . Asimismo se calculó la concentración de proteínas de los ovarios a partir de 70  $\mu\text{l}$  del HOV (3 alícuotas con 20 pares de ovarios cada una) y se obtuvieron 2.164  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , con una cantidad total de 151.480  $\mu\text{g}$ .

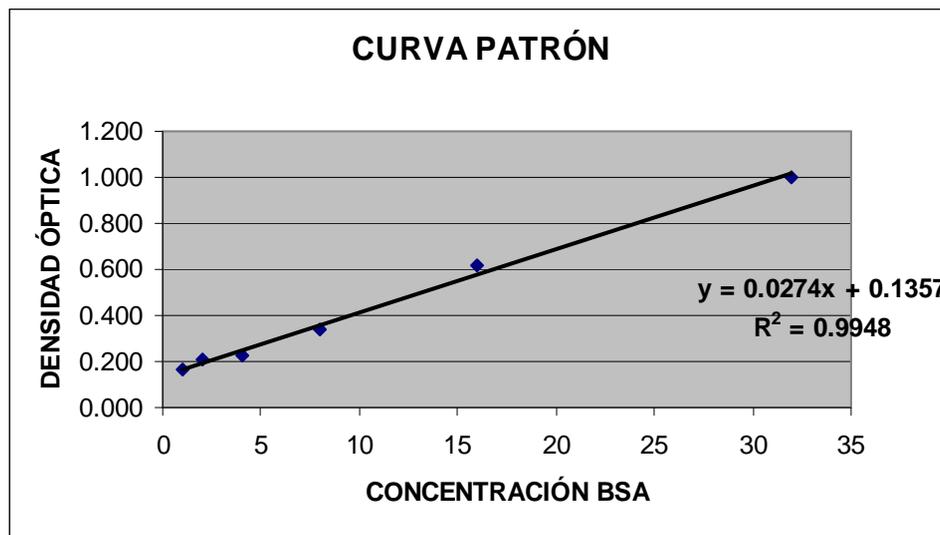


Figura 39. Curva patrón para la determinación de la concentración de proteínas del HIN y el HOV.

#### 8.4 Ensayo de unión de proteínas al virus (VOPBA)

Para identificar las proteínas de interacción del HIN y HOV con el DENV y que pudieran formar parte del complejo receptor del virus, se llevaron a cabo cinco repeticiones del ensayo de VOPBA. Cuando las proteínas del HIN se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con el DENV-2 se identificaron cinco bandas de unión al DENV-2 (Figura 40), con pesos moleculares correspondientes a 82 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 31 kDa y 15 kDa. Asimismo, cuando las proteínas del HOV se transfirieron a una membrana de PVDF se identificaron cinco bandas de unión al DENV-2 (Figura 41), con pesos moleculares correspondientes a 67 kDa, 36 kDa, 31 kDa, 21 kDa y 17 kDa.

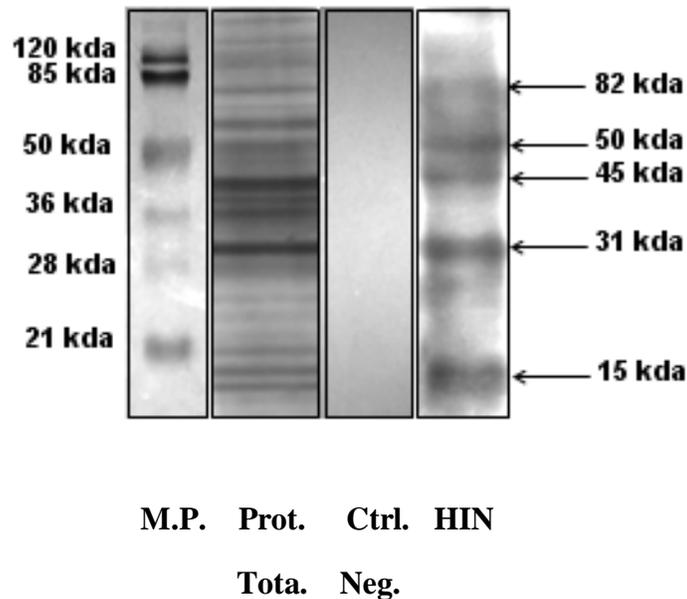


Figura 40. Proteínas de unión al DENV-2 presentes en el homogenado de intestinos. **M.P.**, marcador de peso molecular; **Prot. Tota.**, proteínas totales del HIN separadas en un gel de poliacrilamida al 12% y teñidas con azul de coomassie; **Ctrl. Neg.**, control negativo: HIN incubado sin DENV-2; **HIN**, homogenado de intestinos (VOBPA). Imagen representativa de cinco ensayos individuales, la cual fue capturada con el transiluminador Gel Logic 1500.

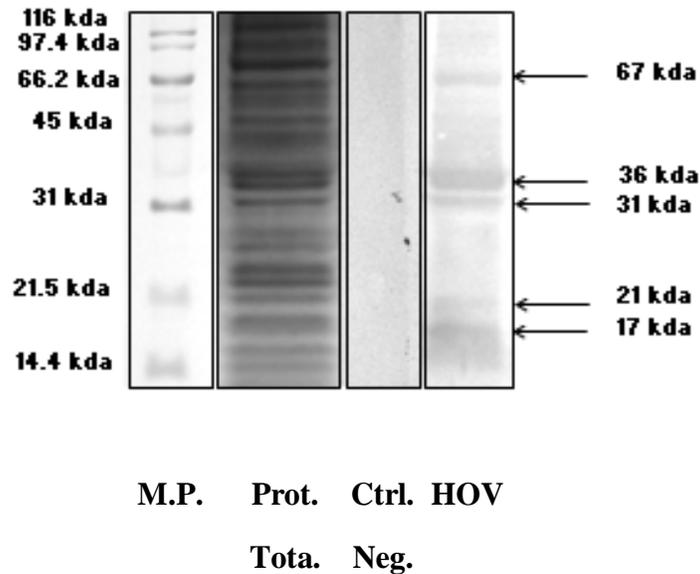


Figura 41. Proteínas de unión al DENV-2 presentes en el homogenado de ovarios. **M.P.**, marcador de peso molecular; **Prot. Tota.**, proteínas totales del HOV separadas en un gel de poliacrilamida al 12% y teñidas con azul de coomassie; **Ctrl. Neg.**, control negativo: HOV incubado sin DENV-2; **HOV**, homogenado de ovarios (VOBPA). Imagen representativa de cinco ensayos individuales, la cual fue capturada con el transiluminador Gel Logic 1500.

Para demostrar la especificidad de los ensayos de VOPBA, las proteínas del HIN y del HOV transferidas a membranas de PVDF fueron incubadas en ausencia del DENV-2 por lo que solo fueron incubadas con los anticuerpos: monoclonal y policlonal anti-DENV y con el anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa. De esta manera, el segundo anticuerpo fue incapaz de reaccionar con proteínas en el HIN y en el HOV (Figura 40 y 41). Este resultado demuestra que el ensayo realizado es específico para detectar las proteínas del HIN y del HOV de interacción al DENV-2.

## 8.5 Espectroscopía de masas

En el cuadro 3 se muestran las proteínas presentes en el homogenado de tejido intestinal del mosquito hembra *Ae. aegypti* que presentaron capacidad de reconocimiento al virus Dengue (identificadas mediante VOPBA). La caracterización de las mismas se llevó a cabo mediante análisis proteómico (espectroscopía de masas). Se encontró que:

- a) La proteína de 82 kDa corresponde al precursor de la gelsolina de *Ae. aegypti*.
- b) La proteína de 50 kDa fue identificada como la subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa de *Ae. aegypti*, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina de *Ae. aegypti*, así como la cadena  $\beta$  de la tubulina de *Culex pipiens pipiens* (mosquito vector de la Encefalitis Japonesa y el virus del Oeste del Nilo ó VON).
- c) La proteína de 45 kDa corresponde a la actina 5 y 6 de *Ae. aegypti*, actina 2 de *Culex quinquefasciatus* (mosquito vector de la filariasis causada por el nematodo *Wuchereria bancrofti*), actina de *Culex pipiens pipiens* y carboxipeptidasa B de *Ae. aegypti*.
- d) La proteína de 31 kDa se identificó como la subunidad  $\gamma$  de la ATP sintasa de *Ae. aegypti*, subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa de *Culex tarsalis* (vector del VON y del virus de la encefalomiелitis equina), la prohibitina de *Ae. aegypti*, la proteína rack 1 de *Ae. aegypti*, la prohibitina de *Bombyx mori* (mariposa de la seda) y la metaloproteinasa de *Ae. aegypti*.
- e) La proteína de 15 kDa presentó iones masa de la cadena ligera 1 de la miosina de *Ae. aegypti* y la actina de *Ixodes scapularis* (ácaro hematófago vector de la enfermedad de Lyme).

Cuadro 3. Caracterización de las proteínas de unión al DENV-2 en los intestinos del mosquito hembra *Aedes aegypti* mediante espectroscopía de masas.

Nombre de la proteína	Masa (Kda)		No. de acceso a NCBI	Score total	emPAI
	Gel	Base de datos			
Precursor de la Gelsolina [ <i>Aedes aegypti</i> ]	82	83.413	gi 157112188	49	0.07
ATP sintasa subunidad Beta [ <i>Aedes aegypti</i> ]	50	53.878	gi 157132308	942	0.92
Tubulina cadena beta [ <i>Culex pipiens pipiens</i> ]	50	49.610	gi 109290430	856	1.03
Tubulina cadena alfa [ <i>Aedes aegypti</i> ]	50	49.876	gi 157113931	715	0.67
Tubulina cadena beta [ <i>Aedes aegypti</i> ]	50	50.568	gi 157108656	451	0.66
Actina 5 [ <i>Aedes aegypti</i> ]	45	41.795	gi 67782283	784	2.93
Actina [ <i>Culex pipiens pipiens</i> ]	45	41.783	gi 68270850	765	2.94
Actina 2 [ <i>Culex quinquefasciatus</i> ]	45	41.627	gi 170038869	643	2.15
Actina 6 [ <i>Aedes aegypti</i> ]	45	41.778	gi 71383976	640	2.39
Carboxipeptidasa B [ <i>Aedes aegypti</i> ]	45	45.785	gi 47679577	85	0.07
ATP sintasa subunidad Gama [ <i>Aedes aegypti</i> ]	31	32.730	gi 157119969	423	0.62
ATP sintasa subunidad Gama [ <i>Aedes aegypti</i> ]	31	32.730	gi 157119969	329	0.79
ATP sintasa subunidad Beta [ <i>Culex tarsalis</i> ]	31	32.269	gi 215259815	310	0.48
Rack 1 [ <i>Aedes aegypti</i> ]	31	34.869	gi 157168005	322	0.44
Prohibitina [ <i>Aedes aegypti</i> ]	31	29.885	gi 157122974	290	0.70
Prohibitina [ <i>Bombyx mori</i> ]	31	30.063	gi 114053221	81	0.11
Metaloproteinasa putativa [ <i>Aedes aegypti</i> ]	31	29.129	gi 157105542	63	0.11
Actina [ <i>Ixodes scapularis</i> ]	15	14.985	gi 16902904	333	1.27
Miosina cadena ligera 1 putativa [ <i>Aedes aegypti</i> ]	15	16.778	gi 157116094	75	0.20

Asimismo en el cuadro 4 se muestran las proteínas presentes en el homogenado de ovarios del mosquito hembra *Ae. aegypti* que presentan capacidad de reconocimiento al virus Dengue (identificadas mediante VOPBA). La caracterización de estas proteínas se llevó a cabo mediante análisis proteómico (espectroscopía de masas). Se encontró que:

- a) La proteína de 67 kDa corresponde a la proteína del choque térmico (HSP) de 70 kDa de *Ae. aegypti* y a la HSP de 70 kDa de *Culex quinquefasciatus*.
- b) La proteína de 36kDa fue identificada como la anexina de *Ae. aegypti* y rack 1 de *Ae. aegypti*.
- c) La proteína de 31 kDa corresponde a la subunidad  $\gamma$  de la ATP sintasa de *Ae. aegypti*, la prohibitina de *Ae. aegypti* y la actina de *Ae. aegypti*.
- d) La proteína de 21 kDa presentó iones masa de la actina de *Anopheles vestitipennis* (vector probable de *Plasmodium vivax* en la Selva Lacandona de Chiapas), la actina de *Ae. aegypti* y la actina de *Culex pipiens pipiens*.
- e) La proteína de 17 kDa fue identificada como miosina cadena ligera 1 de *Ae. aegypti*.

En los análisis de identificación de iones masa válidos para las diferentes proteínas, el criterio de inclusión en la validación de los péptidos fue que en la secuencia proteica dos o más péptidos presentaran un score total que fuera mayor a 45. Los valores de score correspondientes a los péptidos de interacción tanto en el tejido intestinal como en los ovarios fueron de 49 a 942.

Asimismo se determinaron los valores de abundancia relativa de las proteínas o emPAI para cada muestra, observando que en el tejido intestinal el valor mayor de abundancia relativa fue para la actina en contraste con la gelsolina y la carboxipeptidasa B que mostraron el menor valor de emPAI. En los ovarios, la proteína con el valor mayor de abundancia relativa fue la actina y la que presentó el menor emPAI fue la miosina.

Cuadro 4. Caracterización de las proteínas de unión al DENV-2 en los ovarios del mosquito hembra *Aedes aegypti* mediante espectroscopía de masas.

Nombre de la proteína	Masa (Kda)		No. de acceso a NCBI	Score total	emPAI
	Gel	Base de datos			
HSP70 [ <i>Aedes aegypti</i> ]	67	72.242	gi 94468818	786	0.43
HSP70 [ <i>Aedes aegypti</i> ]	67	71.103	gi 94468966	75	0.09
HSP70 [ <i>Culex quinquefasciatus</i> ]	67	70.150	gi 170050716	368	0.44
Anexina [ <i>Aedes aegypti</i> ]	36	35.704	gi 157129006	81	0.30
Anexina [ <i>Aedes aegypti</i> ]	36	35.789	gi 94468790	78	0.09
Rack 1 [ <i>Aedes aegypti</i> ]	36	34.869	gi 157168005	270	0.89
ATP sintasa subunidad Gama [ <i>Aedes aegypti</i> ]	31	32.730	gi 157119969	147	0.47
Prohibitina [ <i>Aedes aegypti</i> ]	31	29.885	gi 157122974	52	0.24
Actina [ <i>Aedes aegypti</i> ]	31	31.452	gi 157106713	101	1.70
Actina [ <i>Anopheles vestitipennis</i> ]	21	23.984	gi 301641442	453	1.84
Actina [ <i>Aedes aegypti</i> ]	21	21.610	gi 207493855	109	1.36
Actina subunidad Beta [ <i>Culex pipiens pipiens</i> ]	21	25.376	gi 90811721	109	0.28
Miosina cadena ligera 1 putativa [ <i>Aedes aegypti</i> ]	17	18.125	gi 157167807	51	0.19

## IX. DISCUSIÓN

Los virus envueltos necesitan liberar su material genético en el citoplasma de la célula hospedera para lograr una infección productiva. La estrategia que utilizan estos virus para internalizarse en células blanco es compleja y depende en parte, de las interacciones iniciales mediadas tanto por receptores de baja afinidad (co-receptores) como por receptores específicos (de alta afinidad) (Clyde *et al*, 2006).

Los mecanismos de internalización del virus Dengue en células huésped tanto en el vector como en el humano se empiezan a conocer. Se ha reportado que la proteína E (dominio III) viral se une inicialmente a receptores de baja afinidad (glicosaminglicanos como el heparán sulfato) que concentran al DENV en la superficie celular (Chen *et al*, 1997) además de facilitar su interacción con el receptor de alta afinidad, favoreciendo la internalización viral mediante endocitosis dependiente de clatrina (Acosta *et al*, 2008; van der Schaar *et al*, 2008), posteriormente, el pH bajo del endosoma celular promueve la presencia de cambios conformacionales en la proteína E, que son importantes durante la fusión de la membrana de la vesícula endocítica con la membrana del virus, lo que permite la liberación de la nucleocápside (Clyde *et al*, 2006; Modis *et al*, 2003).

En el presente trabajo, mediante ensayos de proteínas de unión al virus (VOPBA), se identificaron once diferentes proteínas que reconocen al DENV, en los tejidos del mosquito hembra *Ae. aegypti*, que funcionan ya sea como sitio inicial de replicación viral (intestino) ó bien que posiblemente participe en la transmisión vertical del DENV (ovarios). Las proteínas que mostraron capacidad de interacción con el virus en estos tejidos, fueron caracterizadas mediante análisis proteómico (espectroscopía de masas). Este análisis mostró que los iones masa incluyen péptidos de las siguientes proteínas: HSP70, ATP sintasa, tubulina, actina, prohibitina, anexina, gelsolina, miosina, metaloproteinasa, carboxipeptidasa B y Rack-1. El peso molecular de las proteínas de unión al DENV-2 identificadas en el presente trabajo (En intestinos: 82 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 31 kDa y 15 kDa. En Ovarios: 67 kDa, 36 kDa, 31 kDa, 21 kDa y 17 kDa) correlacionan con los pesos moleculares de los posibles receptores previamente propuestos en la literatura (19 kDa, 30-

35 kDa, 45 kDa, 67 kDa y 80 kDa Salas-Benito y Del Ángel 1997; Muñoz y colaboradores 1998; Mendoza y colaboradores 2002; Mercado-Curiel 2006).

Muy recientemente Paingankar y colaboradores (2010) identificaron proteínas similares a las que reportamos en el presente estudio (HSP70, ATP sintasa y actina) como polipéptidos de interacción al DENV-2 presentes en la fracción membranal del intestino medio de las larvas del cuarto estadio y del mosquito hembra adulto *Ae. aegypti*, así como en las células A7 (derivadas de *Ae. aegypti*) y C6/36.

En el presente trabajo se encontró una proteína de interacción en el tejido intestinal del mosquito hembra de aproximadamente 31 kDa que en el análisis proteómico mostró iones masa de las proteínas prohibitina, metaloproteinasa, ATP sintasa y Rack-1. La banda de 45 kDa contiene péptidos de las proteínas actina y carboxipeptidasa B. Las bandas de 82 kDa y 50 kDa definen masas de la gelsolina y tubulina, respectivamente. Por otra parte, la banda de 15 kDa corresponde con iones masas de actina y miosina (Figura 40, Cuadro 3).

Asimismo, en el homogenado de ovarios encontramos un péptido de interacción con el DENV-2 de 36 kDa que en el estudio de proteómica, se determinó que corresponde a la anexina de *Ae. aegypti* (Figura 41, Cuadro 4). Las anexinas pertenecen a la familia de proteínas de unión a fosfolípidos en forma dependiente de  $Ca^{2+}$ . Estas proteínas presentan una estructura altamente conservada de 70 aminoácidos, denominada "repetición anexina", la cual presenta motivos de unión a calcio y a fosfolípidos. Entre las funciones propuestas para las anexinas se encuentran la modulación de flujos iónicos, endocitosis y exocitosis (Rescher y Gerke, 2004). Interesantemente, la anexina B11 (de *Drosophila melanogaster*) de 35-36 kDa se une selectivamente a los oocinetos de *Plasmodium berghei*. Esta anexina se ha descrito en el intestino medio, en extractos del mosquito adulto, en las proteínas de membrana y citosólicas de las células 4a-3A de *Anopheles gambiae* (vector de la malaria) (Kotsyfakis *et al*, 2005a). La interacción entre la anexina asociada a la membrana plasmática y *P. berghei* es independiente de la presencia de calcio. Asimismo, se observó que los anticuerpos policlonales contra la anexina presentes durante la alimentación sanguínea del mosquito, reducen el desarrollo de los ooquistes, sugiriendo que esta proteína

facilita la entrada de los ooquistes al epitelio del intestino medio, durante la infección del mosquito por *P. berghei* (Kotsyfakis *et al*, 2005a). Mediante ensayos de inmunohistoquímica, se ha podido localizar a la anexina en los folículos de los ovarios, en el epitelio y en el lumen del cáliz del mosquito hembra *A. gambiae* a las 48 horas posteriores a la alimentación sanguínea (Kotsyfakis *et al*, 2005b).

Por otra parte, se ha reportado que la anexina V de 34 kDa presente en la membrana plasmática del hígado humano interacciona con la proteína de envoltura del virus de la Hepatitis B (HBV). La unión de la proteína de envoltura de HBV a los cultivos de hepatocitos humanos fue significativamente inhibida por anexina V aislada de hepatocitos humanos, lo cual indica que esta proteína puede jugar un papel importante en el inicio de la infección de HBV (Hertogs *et al*, 1993). La glicoproteína B que es el principal componente de la envoltura del citomegalovirus humano (HCMV) interactúa con la anexina II de 34 kDa en una línea celular de fibroblastos humanos, lo cual sugiere su participación en las interacciones tempranas durante la infección de HCMV (Pietropaolo y Compton, 1997).

Asimismo, mediante VOPBA identificamos otra proteína de los Ovarios que reconoce al DENV y que tiene un peso de 67 kDa, la cual corresponde a la HSP de 70 kDa de *Ae. aegypti* y a la HSP70 de *Culex quinquefasciatus* (Figura 41, Cuadro 4). Las proteínas de choque térmico pertenecen a una familia que se encuentran, en su mayor parte, en forma constitutiva en todas las células procariontas y eucariotas. Las cuales en presencia de condiciones de estrés, se sobre-expresan favoreciendo la inducción de otras HSPs, que no son constitutivas. Su función es minimizar los daños producidos por estos cambios, mediante su interacción con las proteínas parcialmente desnaturalizadas, regulando el plegamiento y ensamblaje de las mismas. Las proteínas de choque térmico son inducidas por diferentes agentes estresantes, como la exposición a compuestos tóxicos, la presencia de infecciones virales, estados febriles o inflamatorios, entre otros. Interesantemente, las proteínas de 45 kDa y 74 kDa relacionadas con la HSP90 presentes en las células C6/36 interactúan con el DENV-2 (Salas-Benito *et al*, 2007). Asimismo, la HSP70 y HSP90 se han asociado con el complejo del receptor del DENV en las células U937 (línea celular derivada de monocitos humanos) y en las células del neuroblastoma (Reyes del Valle *et al*, 2004).

En el presente trabajo, se identificó también mediante VOPBA y espectroscopía de masas a la proteína ATP sintasa de 31 kDa tanto en el HOV, como en el HIN (Figura 40 y 41, Cuadro 3 y 4). La ATP sintasa es un complejo enzimático formado por dos sub-complejos definidos por su polaridad, uno anclado a la membrana (hidrofóbico) denominado  $F_0$  integrado y el otro que sobresale en la cara interna de la membrana (hidrofílico) denominado  $F_1$ . El complejo  $F_1F_0$  lleva a cabo dos reacciones acopladas:  $F_0$ , participa en el transporte de iones (protones o sodio) a nivel de membrana y el segmento  $F_1$  une el ADP y el fosfato para formar el ATP. La energía de este proceso proviene de la formación de un gradiente electroquímico de iones. Arispe y De Maio (2000), mostraron que la función de la proteína HSP70 está modulada por la presencia de ATP y ADP, por lo que la unión de ATP a la región N-terminal de la HSP70 produce cambios conformacionales en la proteína, los cuales son necesarios para que funcione de una manera adecuada.

En el análisis proteómico, encontramos que la proteína de unión al DENV de 31 kDa presente tanto en el HIN como en el HOV, del mosquito hembra *Ae. aegypti* corresponde a la proteína prohibitina de *Ae. aegypti* (Cuadro 3 y 4). La prohibitina (PHB) es una proteína ubicua y altamente conservada en las células eucariotas. Los estudios iniciales de la PHB mostraron que esta proteína actúa como inhibidor de la proliferación celular por lo que le dieron el nombre de prohibitina. El complejo prohibitina está compuesto de dos subunidades, PHB1 (30 kDa) y PHB2 (37 kDa), que forman una estructura en forma de anillo. El complejo PHB se localiza en diferentes compartimentos de la célula principalmente en la mitocondria, sin embargo, también se ha reportado en el citoplasma, en la membrana plasmática y en el núcleo (Mishra *et al*, 2006). Se conoce que, el antígeno Vi polisacárido capsular de *Salmonella typhi* puede interactuar con las células Caco-2 a través del reconocimiento específico del complejo molecular constituido por dos isoformas de la prohibitina (30 y 35 kDa) presentes tanto en la superficie de la membrana celular como asociado a las balsas lipídicas ó microdominios (lipid rafts) (Sharma y Qadri, 2004). Interesantemente, Kuadkitkan y colaboradores (2010) mediante ensayos de VOPBA identificaron una proteína de unión de 35 kDa en la membrana de células CCL-125 (células adherentes epiteliales derivadas de las larvas de *Ae. aegypti*), en células C6/36, y en el adulto *Ae. aegypti*. Mediante espectroscopía de masas identificaron la proteína de 35 kDa

como la prohibitina de *Ae. aegypti*. Asimismo, la preincubación de las células CCL-125 y las células C6/36 con anticuerpos monoclonales contra la prohibitina reducen significativamente los niveles de infección y la producción subsecuente de virus. En ensayos de microscopía confocal se observó la colocalización intracelular entre la prohibitina y la proteína E del DENV-2, mientras que la inmunoprecipitación confirmó que la prohibitina interactúa con la proteína E del virus.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran los estudios de Kuadkitkan y colaboradores (2010) ya que mediante espectroscopía de masas demostramos que las proteínas de 31 kDa presentes en los intestinos y ovarios corresponden a la prohibitina del mosquito *Ae. aegypti* y de *Bombyx mori* (Cuadro 3 y 4). Por lo que es posible que la prohibitina presente en el HIN y HOV a la cual se une el DENV-2, funcione como un receptor de alta afinidad el cual permita la internalización del DENV-2 a las células tanto intestinales como de ovarios del mosquito hembra *Ae. aegypti*.

Asimismo siguiendo la metodología empleada en el presente trabajo, referente a los ensayos de unión al virus y al análisis proteómico encontramos que el DENV-2 reconoce tres proteínas importantes durante la internalización viral. Estas proteínas son: la actina (45 kDa) localizada en los intestinos y ovarios, la tubulina (50 kDa) presente en el tejido intestinal y la miosina (15-17 kDa) localizada en ambos tejidos. La interacción del DENV-2 con tubulina y actina en el presente estudio, concuerda con evidencia reciente que muestra que el tratamiento de las células C6/36 con citocalasina D (impide la polimerización de los filamentos de actina) y con nocodazol (interfiere con la polimerización de los microtúbulos) inhiben significativamente la infección de DENV-2, lo cual sugiere fuertemente que el virus Dengue es capaz de interactuar con el citoesqueleto (filamentos de actina y microtúbulos) durante los eventos tempranos de la infección. Asimismo, se ha observado que durante la internalización del DENV-2 a las células C6/36 se inducen rearrreglos en el citoesqueleto de actina (Mosso *et al*, 2008). Acosta y colaboradores (2008) mostraron que el tratamiento de las células C6/36 con citocalasina D reduce significativamente los títulos virales. El requerimiento de la integridad del citoesqueleto de actina como un mediador de la internalización del DENV-2 en las células de mosquito está de acuerdo con evidencia reciente en la que se muestra que el citoesqueleto de actina junto con la miosina VI

favorecen tanto la formación de la vesícula endocítica, como el transporte de la vesícula de la membrana plasmática al citosol (Buss *et al*, 2001; Qualmann y Kessels, 2002).

Por otra parte, Chee y AbuBakar (2004) mediante ensayos de VOPBA identificaron una proteína de 48 kDa presente tanto en las proteínas totales como en las proteínas citosólicas de células C6/36 que se une específicamente al DENV-2, la cual identificaron como tubulina.

Se conoce que el citoesqueleto permite la invaginación de la membrana plasmática, durante la formación de la vesícula endocítica. La miosina VI también se ha asociado con la invaginación de la membrana celular, siendo capaz de moverse a lo largo de los filamentos de actina tensando la membrana plasmática hacia el interior de la célula, favoreciendo la curvatura de la membrana y promoviendo la invaginación de la misma (Buss *et al*, 2001; Šamaj *et al*, 2004). La fisión de la vesícula cubierta de clatrina es controlada por la actina y la miosina VI. Se ha propuesto que la polimerización de actina provee la fuerza necesaria para estrangular el cuello y escindir las vesículas de la membrana plasmática (Qualmann y Kessels, 2002). En las células Caco-2 (células intestinales humanas), la despolimerización de los filamentos de actina con citocalasina D incrementa el número de vesículas endocíticas incompletas en la base de las microvellosidades indicando que la actina puede participar en la liberación de las vesículas endocíticas (Buss *et al*, 2001). Asimismo, en las células MDCK (células epiteliales polarizadas, derivadas del riñón canino) el tratamiento con citocalasina D previene la estrangulación de las vesículas endocíticas indicando que la integridad de la actina es importante durante este proceso (Gottlieb *et al*, 1993).

La miosina VI pertenece a la superfamilia de mecano-enzimas activadoras de actina que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para generar fuerza y movimiento a lo largo de los filamentos de actina. Todas las miosinas poseen dos dominios funcionales: a) un dominio motor (500 aminoácidos) en la región N- terminal, el cual se compone de un dominio catalítico que se une a la actina y al ATP y b) un dominio C-terminal que puede transportar moléculas (Buss *et al*, 2001; Döhner y Sodeik, 2004). La miosina VI participa con los filamentos de actina para que se lleve a cabo la fisión de la membrana plasmática, promoviendo el movimiento de los filamentos de actina en el sitio de fisión y junto con la

actina empujan la membrana plasmática para estrangular el cuello de la vesícula endocítica (Buss *et al.*, 2001).

En el presente estudio, mediante VOPBA y espectroscopía de masas, identificamos otra proteína de interacción con el DENV-2 de aproximadamente 82 kDa presente en el HIN que de acuerdo a los iones masa corresponde al precursor de la gelsolina de *Ae. aegypti* (Cuadro 3). La gelsolina es una proteína clave en el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina. Estructuralmente es una proteína globular de 82 KDa con seis subdominios, denominados S1-S6. Pertenece a la superfamilia de la vinilina y se localiza comúnmente dentro de la célula, en el citosol y en la mitocondria. Sin embargo, también puede encontrarse en el plasma sanguíneo. La gelsolina es un factor que permite que la célula adopte su configuración fluida, proceso que realiza mediante la fragmentación de los microfilamentos de la corteza celular, en presencia de calcio, haciendo que la célula se vuelva plástica, propiedad necesaria para funciones tales como la endocitosis y la exocitosis (Sun *et al.*, 1999).

Asimismo, en los ensayos de VOPBA y proteómica, identificamos otras dos proteínas de 31 kDa y de 36 kDa presentes en el HIN y en el HOV, respectivamente. Las cuales corresponden a la proteína Rack-1 de *Ae. aegypti* (Figura 40 y 41, Cuadro 3 y 4). Interesantemente, Sedas y colaboradores (2004) reportaron que Rack-1 (35 kDa) y la actina (41 kDa), son proteínas asociadas a la membrana plasmática presentes en extractos de individuos enteros del afido adulto *Myzus persicae*, las cuales se unen específicamente al virus amarillo del oeste (BWYV), lo cual sugiere que Rack-1 y la actina están involucradas en la endocitosis mediada por receptor de las partículas de BWYV, a través de la interacción directa entre Rack-1, la actina y el virus, lo cual favorece la entrada del BWYV a las células epiteliales del intestino medio durante la infección en el insecto vector *Myzus persicae*, conocido comúnmente como pulgón verde del melocotonero, que constituye una seria plaga en la fruticultura, debido a los daños directos que provoca por su elevada capacidad para transmitir este virus en las plantas. Por otra parte, se ha reportado que Rack-1 está involucrada en la regulación de la organización del citoesqueleto ya que el incremento en su expresión en células CHO (ovario de hámster chino) altera la estructura del citoesqueleto e inhibe la migración celular (Buensuceso *et al.*, 2001).

Finalmente, utilizando la misma estrategia, caracterizamos dos proteínas de 45 kDa y de 31 kDa presentes en el HIN, las cuales se unen al DENV-2, estableciendo que corresponden a las proteínas carboxipeptidasa B y metaloproteínasa de *Ae. aegypti*, respectivamente (Figura 40, Cuadro 3). Estas enzimas presentan actividades biológicas importantes en el mosquito vector. La digestión de las proteínas de la sangre ingeridas durante la alimentación del mosquito hembra involucra dos pasos y dos clases de enzimas. Las proteínas son procesadas en péptidos largos mediante las endopeptidasas, asimismo los péptidos largos son procesados progresivamente por las exopeptidasas. Dentro del grupo de las exopeptidasas se encuentran las aminopeptidasas (que cortan el extremo N-terminal de la proteína) y las carboxipeptidasas (que cortan el extremo C-terminal de la proteína) (Clements, 1992). La carboxipeptidasa B es una enzima que hidroliza residuos de arginina y lisina en el extremo C-terminal (Isoe *et al*, 2009). En el grupo de las endopeptidasas se encuentran la tripsina temprana, la tripsina tardía y las metaloproteínasas. Las tripsinas del intestino medio juegan un papel central durante la digestión de la alimentación sanguínea en el mosquito *Ae. aegypti*. La actividad de la tripsina temprana regula la síntesis de la tripsina tardía (Clements, 1992).

Interesantemente, Molina-Cruz y colaboradores (2005) mostraron que la adición del inhibidor de la tripsina proveniente de la soya (STI) en la alimentación sanguínea de *Ae. aegypti* con el DENV-2 resulta en a) la disminución del número de copias de RNA de DENV-2 en el intestino medio del mosquito b) en una disminución de la expresión de la proteína E del DENV-2 y c) en la reducción de la diseminación viral del tórax a la cabeza. De acuerdo con este reporte, la digestión de la sangre y posiblemente el procesamiento proteolítico mediado por las tripsinas del intestino medio, puede participar durante la infección, replicación y diseminación viral en *Ae. aegypti*.

Budkowska y colaboradores (1997) identificaron a la metaloproteínasa de 50 kDa localizada en la membrana de los hepatocitos humanos la cual interactúa con la envoltura del virus de la Hepatitis B (HBV). Asimismo, los autores reportaron que esta proteína induce modificaciones estructurales en la envoltura del HBV lo que facilita la unión a la membrana celular y la internalización del virus en las células de los linfocitos T (línea

celular CEM del linfoblastoma humano). Ambos procesos son bloqueados por la 1,10 fenantrolina un inhibidor de la metaloproteinasa.

Por otra parte, Breiner y colaboradores (1998) mediante cromatografía de afinidad purificaron a la carboxipeptidasa D (180 kDa) receptor putativo del virus de la Hepatitis aviar (DHBV) localizado en los hepatocitos de pato. Asimismo llevaron a cabo ensayos de bloqueo en cultivos de hepatocitos de pato con la carboxipeptidasa recombinante y observaron que la inhibición de la infección ocurría de una manera dosis dependiente.

A pesar de que la carboxipeptidasa B y la metaloproteinasa son enzimas importantes durante la digestión de las proteínas de la sangre no sabemos si estas enzimas identificadas como proteínas de unión al DENV-2 en el presente trabajo, pueden activar proteolíticamente al virus Dengue (como en el caso de la Hepatitis B) y de esta manera permitir la internalización del virus en las células del mosquito, ó si las proteínas están involucradas en la replicación viral (como en el caso de la tripsina), por lo que se necesitan más estudios que puedan elucidar estas interrogantes.

Con base en los hallazgos experimentales del presente trabajo, y de acuerdo con la literatura previa, se propone un modelo para la entrada y el transporte del virus Dengue serotipo 2 durante la infección tanto de las células epiteliales de los intestinos (Figura 42) como en células de los ovarios del mosquito hembra *Ae. aegypti* (Figura 43).

Se propone que inicialmente el DENV-2 y las células epiteliales de los intestinos durante la infección intestinal se unan mediante co-receptores que concentren al DENV en la superficie celular y faciliten la interacción eficiente entre el virus y la prohibitina (Figura 42), un receptor de alta afinidad el cual permitirá la internalización del DENV-2 en las células epiteliales a través de la endocitosis dependiente de clatrina. Es probable que la

energía necesaria (ATP) para que se lleve a cabo la internalización del DENV-2 a las células epiteliales de los intestinos, la proporcione la ATP sintasa.

Asimismo, se propone que el DENV-2 pueda interactuar y favorecer la movilización de las proteínas: Rack-1, actina, misiona, gelsolina y tubulina, que en concierto permiten tanto la invaginación de la membrana plasmática, como la estrangulación, la liberación y el transporte de la vesícula endocítica de la membrana plasmática al citoplasma de la célula epitelial lo que favorece la internalización del virus en las células epiteliales de los intestinos (Figura 42). Posterior a la replicación y ensamblaje de nuevos viriones, el citoesqueleto celular podrá igualmente ser movilizado durante el transporte (exocitosis) viral fuera del intestino, con lo cual el DENV pudiera llegar al hemocele e infectar otros tejidos, como los ovarios y las glándulas salivales.

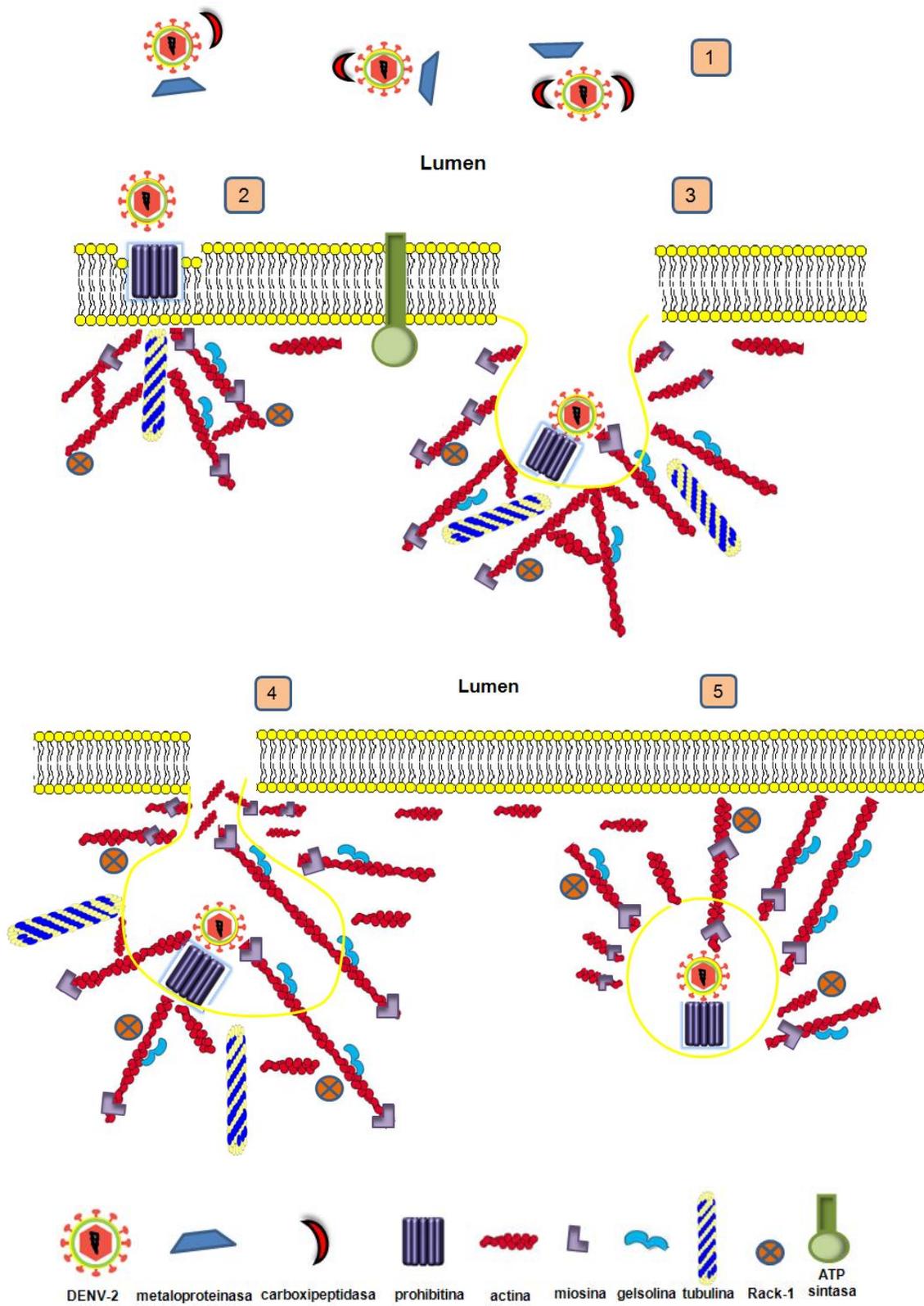


Figura 42. Modelo propuesto para la entrada y transporte del DENV-2 en las células epiteliales de los intestinos del mosquito hembra *Ae. aegypti*.

Asimismo, con base en los hallazgos experimentales del presente trabajo se propone que durante la infección de los ovarios del mosquito hembra *Ae. aegypti*, el DENV-2 puede interactuar inicialmente con un posible receptor o molécula de unión: la anexina, que posibilitará la concentración del virus en la superficie de los ovarios, con lo cual se facilitará la interacción eficiente entre el virus Dengue y la prohibitina un posible receptor de alta afinidad que permitirá la internalización del virus al interior de las células de los ovarios (Figura 43), mediante endocitosis dependiente de clatrina. En el endosoma, el pH bajo y el correcto plegamiento del dominio III de la proteína E mediante la HSP70 podrán facilitar la transición de la proteína E dimérica a la forma de trímero, estructura que permite la fusión de la membrana del virus con la membrana de la vesícula endocítica lo cual puede favorecer la liberación de la nucleocápside viral en el citoplasma de la célula infectada. Asimismo, durante la infección del DENV-2, la ATP sintasa puede proporcionar el ATP necesario para la producción del cambio conformacional de la HSP70 lo que puede favorecer tanto el funcionamiento óptimo de ésta proteína como el plegamiento correcto de la proteína E en el endosoma.

De manera análoga a lo que ocurre en la infección de las células epiteliales de los intestinos, se propone que durante la infección de los ovarios por el DENV-2, se lleve a cabo la movilización de las proteínas: Rack-1, actina y miosina que en conjunto faciliten tanto la invaginación de la membrana plasmática, como la estrangulación, la liberación y el transporte de la vesícula endocítica de la membrana plasmática al citoplasma de la célula lo que conllevará a la internalización viral en las células del ovario (Figura 43).

Asimismo, se propone que posterior a la internalización del DENV-2, la actina y la miosina participen durante la exocitosis para que el virus pueda ser transportado al exterior de la célula.

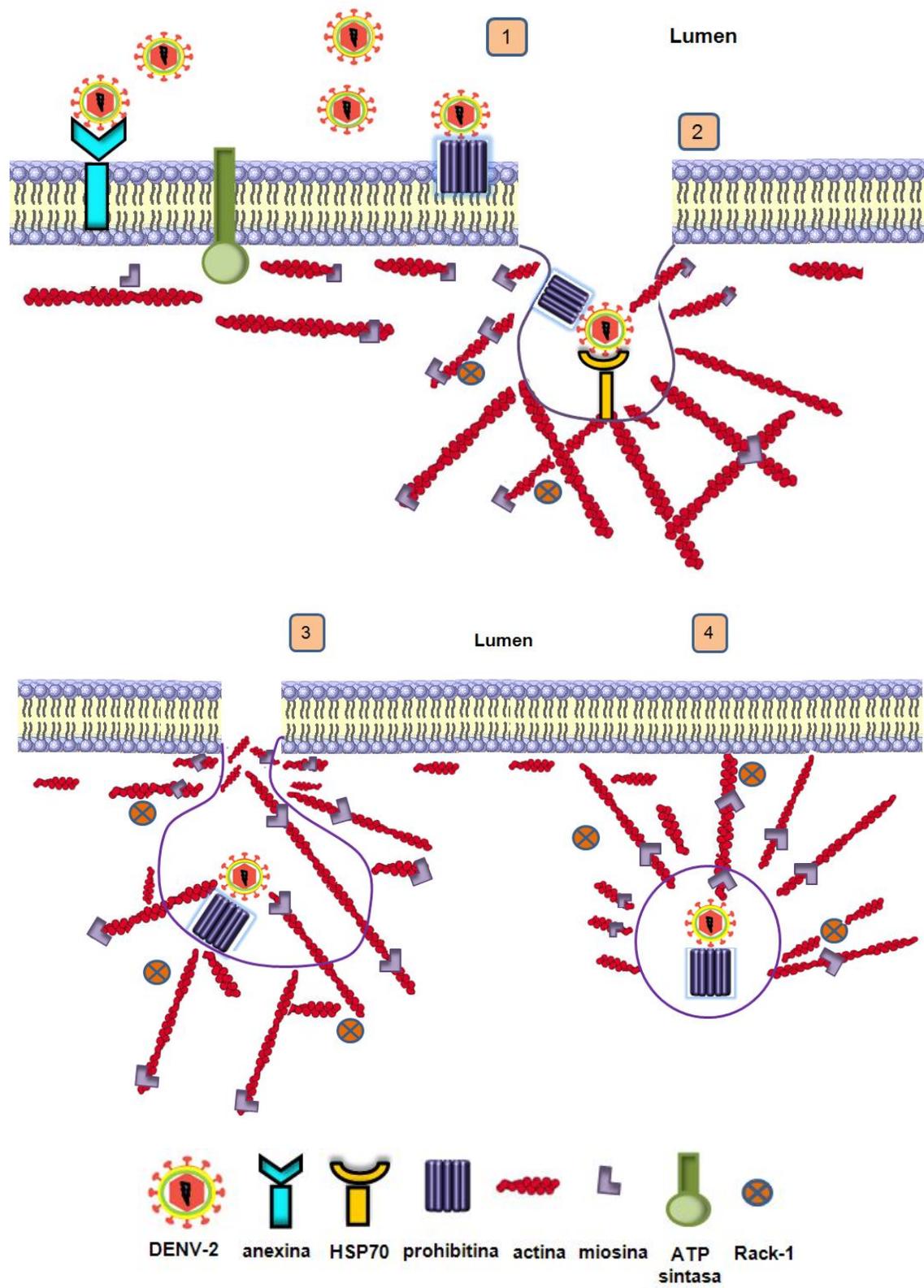


Figura 43. Modelo propuesto para la entrada y transporte de DENV-2 en las células de los ovarios del mosquito hembra *Ae. aegypti*.

## X. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, mediante ensayos de proteínas de unión al virus (VOPBA) identificamos, por primera vez, siete diferentes proteínas presentes en los ovarios del mosquito hembra *Ae. aegypti*, las cuales son reconocidas por el virus Dengue serotipo 2. Las proteínas que mostraron capacidad de interacción con el DENV, fueron caracterizadas por primera vez mediante análisis proteómico (espectroscopía de masas). Este análisis mostró que los iones masa incluyen péptidos de las siguientes proteínas: HSP70, anexina, Rack-1, ATP sintasa, prohibitina, actina y miosina.

Asimismo, mediante VOPBA identificamos nueve proteínas localizadas en los intestinos del mosquito hembra *Ae. aegypti*, las cuales son reconocidas por el DENV-2. Las proteínas que interactuaron con el virus Dengue, fueron caracterizadas mediante espectroscopía de masas, este análisis mostró que los iones masa incluyen péptidos de las siguientes proteínas: precursor de la gelsolina, tubulina, actina, carboxipeptidasa B, ATP sintasa, Rack-1, prohibitina, metaloproteinasa y miosina.

Con base tanto en los hallazgos experimentales del presente trabajo, como en la literatura previa, se propone un modelo para la entrada y el transporte del DENV-2 durante la infección tanto de las células epiteliales del intestino como en las células de los ovarios del mosquito hembra *Ae. aegypti*.

Proponemos que las proteínas: precursor de la gelsolina, tubulina, actina, carboxipeptidasa B, ATP sintasa, Rack-1, prohibitina, metaloproteinasa y miosina podrían formar parte del complejo de internalización del DENV-2 durante la infección de las células epiteliales del intestino, el cual es el primer tejido en el que se replica el virus Dengue.

Asimismo, de acuerdo al modelo propuesto en el presente estudio, las proteínas: HSP70, anexina, Rack-1, ATP sintasa, prohibitina, actina y miosina, podrían formar parte del complejo de internalización del DENV-2 durante la infección de los ovarios, el cual es un tejido esencial en la transmisión transovárica del DENV-2.

## XI. PERSPECTIVAS

La identificación y caracterización de las proteínas anexina, prohibitina, HSP70, ATP sintasa, actina, gelsolina, miosina, tubulina, Rack-1, metaloproteinasas y carboxipeptidasa B en los intestinos y los ovarios del mosquito hembra *Ae. aegypti* como moléculas de reconocimiento al virus Dengue, nos permite proponer diferentes objetivos que pudieran llevarse a cabo en un trabajo posterior.

Con base a que las proteínas de interacción con el DENV identificadas, puedan tener un papel importante durante la infección de los tejidos del mosquito hembra, inicialmente podríamos evaluar la participación de cada una de estas moléculas durante la internalización del DENV. Para evaluar esta posibilidad, podríamos llevar a cabo ensayos de inhibición de la infección viral de los tejidos analizados en el presente proyecto en presencia de anticuerpos monoclonales contra anexina, prohibitina, HSP70, ATP sintasa, actina, gelsolina, miosina, tubulina, Rack-1, metaloproteinasas y carboxipeptidasa B.

Asimismo, para evaluar la localización celular entre el DENV y las proteínas encontradas en el presente trabajo, podríamos llevar a cabo ensayos de colocalización en donde monocapas de células CCL-125, A7 y C6/36 serían infectadas con el virus, posteriormente serían incubadas con un anticuerpo anti-DENV y después con un anticuerpo monoclonal contra anexina, prohibitina, HSP70, ATP sintasa, actina, gelsolina, miosina, tubulina, Rack-1, metaloproteinasas y carboxipeptidasa B.

Por otra parte, sería interesante evaluar si los cuatro serotipos del virus Dengue reconocen las mismas proteínas identificadas y caracterizadas en el presente trabajo mediante ensayos de VOPBA y espectroscopía de masas, respectivamente. Asimismo, (entre muchas otras preguntas interesantes) se podría evaluar si las proteínas que tienen capacidad de interacción con el DENV encontradas en los mosquitos hembra, están presentes en los intestinos de los mosquitos macho *Ae. aegypti*.

## REFERENCIAS

- Acosta, E. G., Castilla, V. y Damonte, E. B. 2008. **Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis.** *Journal of General Virology*. Vol. 89, 474-484.
- Akbar, M. R., Agoes, R., Djatie, T. y Kodyat, S. 2008. **PCR detection of dengue transovarial transmissibility in *Aedes aegypti* in Bandung, Indonesia.** *Proc ASEAN Congr Trop Med Parasitol*. Vol. 3, 84-89.
- Arispe, N. y De Maio, A. 2000. **ATP and ADP modulate a cation channel formed by Hsc70 in acidic phospholipid membranes.** *The journal of biological Chemistry*. Vol. 275, No. 40, 30839-30843.
- Bielefeldt-Ohmann, H. 1998. **Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes.** *Virus Research*. Vol. 57, 63-79.
- Breiner, K. M., Urban, S. y Schaller, H. 1998. **Carboxypeptidase D (gp180), a golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses.** *Journal of Virology*. Vol. 72, No. 10, 8098-8104.
- Budkowska, A., Maillard, P., Theret, N., Groh, F., Possehl, C., Topilko, A. y Crainic, R. 1997. **Activation of the envelope proteins by a metalloproteinase enables attachment and entry of the hepatitis B virus into T-lymphocyte.** *Virology*. Vol. 237, 10-22.
- Buensuceso, C. S., Woodside, D., Huff, J. L., Plooper, G. E. y O'Toole, T. E. 2001. **The WD protein Rack-1 mediates protein kinase C and integrin-dependent cell migration.** *Journal of Cell Science*. Vol. 114, 1691-1698.
- Buss, F., Luzio, P. y Kendrick-Jones, J. 2001. **Myosin VI, a new force in clathrin mediated endocytosis.** *FEBS Letters*. Vol. 508, 295-299.
- Cabrera-Hernández, A. y Smith, D. R. 2005. **Mammalian dengue virus receptors.** *Dengue Bulletin*. Vol. 29, 119-135.
- Cao-Lormeau, V.-M. 2009. **Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands.** *Virology Journal*. Vol. 6, No. 35, 1-4.
- Chapman, R.F. 1998. **The insects. Structure and function.** Cambridge University Press. 770 pp.
- Chee, H.-Y. y AbuBakar, S. 2004. **Identification of a 48 kDa tubulin or tubulin like C6/36 mosquito cell protein that binds dengue virus 2 using mass spectrometry.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 320, 11-17.

Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., y Marks R.M. 1997. **Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate.** *Nature Medicine*. Vol. 3, 866-871.

Christophers, R. 1960. ***Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure.** Cambridge University Press. 739 pp.

Clements, A. N. 1992. **The Biology of Mosquitoes. Volume 1. Development, Nutrition and Reproduction.** London: Chapman & Hall. 509 pp.

Clyde, K., Kyle, J. y Harris, E. 2006. **Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis.** *Journal of Virology*. Vol, 80, No.23, 11418-11431.

Daughaday, C.C., Brandt, W.E. McCown, J.M. y Rusell, P.K. 1981. **Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors.** *Infection and Immunity*. Vol. 32, 469-473.

Döhner, K. y Sodeik, B. 2004. **The role of the actin cytoskeleton during viral infection.** *CTMI Springer-Verlag*. Vol. 285, 67-108.

Eiman, M., Introini, M. V. y Ripoll, C. 2008. **Directrices para la prevención y control de *Aedes aegypti*.** *Dirección de Enfermedades Transmisibles por Vectores - Ministerio de Salud de la Nación*. 77 pp.

Fernández, I. 1999. **Biología y control de *Aedes aegypti*. Manual de operaciones.** Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 80 pp.

Gottlieb, T. A., Ivanov, I. E., Adesnik, M. y Sabatini, D. D. 1993. **Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells.** *The Journal of Cell Biology*. Vol. 120, No. 3, 695-710.

Gubler, D.J. y Kuno, G.K. 1997. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.** CAB International, Nueva York. 478 pp.

Günther, J., Martínez-Muñoz, J. P., Pérez-Ishiwara, D.G. y Salas-Benito, J. **Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico.** *Intervirology*. Vol. 50, 347-352.

Halstead, S. 2007. **Dengue.** *Lancet*. Vol. 370, 1644–1652.

Hertogs, K., Leenders, W. P. J., Depla, E., De Bruin, W. C. C., Meheus, L., Raymackers, J., Moshage, H. y Yap, S.H. 1993. **Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein.** *Virology*. Vol. 197, 549-557.

Hilgard, P. y Stockert, R. 2000. **Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes.** *Hepatology*. Vol. 32, 1069-1077.

Isoe, J., Zamora, J. y Miesfeld, R. L. 2009. **Molecular analysis of the *Aedes aegypti* carboxypeptidase gene family.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 39, 68-73.

Jindadamrongwech, S. y Smith, D.R. 2004. **Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) reveals serotype specific heterogeneity of dengue virus binding proteins on HepG2 human liver cells.** *Intervirology*. Vol. 47, 370-373.

Kotsyfakis, M., Ehret-Sabatier, L., Siden-Kiamos, I., Mendoza, J., Sinden, R. E. y Louis, C. 2005a. ***Plasmodium berghei* ookinetes bind to *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster* annexins.** *Molecular Microbiology*. Vol. 57, No. 1, 171-179.

Kotsyfakis, M., Vontas, J., Siden-Kiamos, I. y Louis, C. 2005b. **The annexin gene family in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*.** *Insect Molecular Biology*. Vol. 14, No. 5, 555-562.

Kourí, G. P., Guzmán, M.G. y Bravo, J. R. 1987. **Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2: An integral analysis.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 81, No. 5, 821-823.

Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C. y Smith, D.R. 2010. **Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells.** *Virology*. Vol. 406, 149-161.

Kurane, I. 2007. **Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Vol. 30, 329-340.

Linthicum, K. J., Platt, K., Myint, K. S., Lerdtusnee, K., Innis, B. L. y Vaughn, D. W. 1996. **Dengue 3 virus distribution in the mosquito *Aedes aegypti* an immunocytochemical study.** *Medical and Veterinary Entomology*. Vol. 10, 87-92.

Marquardt, W.C. 2005. **Biology of Disease Vectors.** Elsevier Academic Press. E.U.A. 785 pp.

Mercado-Curiel, R. F., Esquinca-Áviles, H. A., Tovar, R., Díaz-Badillo, A., Camacho-Nuez M., y Muñoz, M. de L. 2006. **The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Aedes albopictus* cells.** *BMC Microbiology*. Vol. 6, 85-95.

Mendoza, M. Y., Salas-Benito, J.S., Lanz-Mendoza, H., Hernández-Martínez, S., y Del Ángel, R. M. 2002. **A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues:**

**localization of a 45-kDa glycoprotein.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* Vol. 67, 76-84.

Mishra, S., Murphy, L. C. y Murphy, L. J. 2006. **The prohibitins: emerging roles in diverse functions.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* Vol. 10 No. 2, 353-363.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. y 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.* Vol. 100, No. 12, 6986-6991.

Molina-Cruz, A., Gupta, L., Richardson, J., Bennett, K., Black, W. y Barillas-Mury, C. 2005. **Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* Vol. 72, No. 5, 631-637.

Mosso, C., Galván-Mendoza, I. J., Ludert, J.E. y Del Ángel, R.M. 2008. **Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36HT.** *Virology.* Vol. 378, 193-199.

Muñoz, M. L., Cisneros, A., Cruz, J. Das, P., Tovar, R., y Ortega, A. 1998. **Putative dengue virus receptors from mosquito cells.** *FEMS Microbiology Letters* Vol. 168, 251-258.

Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales (TDR). 2009. **Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control.** Programa Regional de Dengue, Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud San José, Costa Rica. 152 pp.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1995. **Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas: guías para la prevención y control.** Publicación Científica No. 548. Washington, D.C. 110 pp.

Pietropaolo, R. L. y Compton, T. 1997. **Direct interaction between human cytomegalovirus glycoprotein B and cellular annexin II.** *Journal of Virology.* Vol. 71, No. 12, 9803-9807

Paingankar, M. S., Gokhale, M. D. y Deobagkar, D. N. 2010. **Dengue-2-virus-interacting polypeptides involved in mosquito cell infection.** *Archives of Virology.* Vol. 155, 1453-1461.

Pastorino, B., Nougairède, A., Wurtz, N., Gould, E. y Lamballerie, X. 2010. **Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs.** *Antiviral Research.* Vol. 87, 281-294.

Perera, R. y Kuhn, R. J. 2008. **Structural proteomics of dengue virus.** *Current Opinion in Microbiology.* Vol. 11, No. 4, 369-377.

Qualmman, B. y Kessels, M. M. 2002. **Endocytosis and the cytoskeleton.** *International Review of Cytology.* Vol. 220, 93-144.

Rescher, U. y Gerke, V. 2004. **Annexins: unique membrane binding proteins with diverse functions.** *Journal of Cell Science.* Vol. 117, 2631-2639.

Reyes-Del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F. y Del Ángel, R. M. 2005. **Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells.** *Journal of Virology.* Vol. 79, No. 8, 4557-4567.

Rudin, W. y Hecker, H. 1979. **Functional morphology of the midgut of *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) during blood digestion.** *Cell and Tissue Research.* Vol. 200, 193-203.

Rueda, L. M. 2004. **Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission.** Zootaxa 589. Magnolia Press. 60 pp.

Salas-Benito, J. S., y Del Ángel, R. M. 1997. **Identification of two surface proteins form C6/36 cells that bind dengue 4 type virus.** *Journal of Virology.* Vol. 71, 7246-7252.

Salas-Benito, J., Reyes-Del Valle J., Salas-Benito, M., Ceballos-Olvera, I., Mosso, C. y Del Ángel, R. M. 2007. **Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock-related protein.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* Vol. 77, No. 2, 283-290.

Salazar, M. I., Richardson, J.H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E. y Beaty, B. J. 2007. **Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes.** *BMC Microbiology.* Vol. 7, No. 9, 1-13.

Šamaj, J., Baluška, F., Voigt, B., Schlicht, M., Volkmann, D. y Menzel, D. 2004. **Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling.** *Plant Physiology.* Vol. 135, 1150-1161.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning a Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. E.U.A.

Sharma, A. y Qadri, A. 2004. **Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppress early inflammatory responses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Vol. 101, No. 50, 17492-17497.

Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J.-M., Van Dorsselaer, A., Van Regenmortel, M. H. V. y Pattus, F. 2004. **Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially**

**involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid.** *Virology*. Vol. 325, 399-412.

Smith P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., y Klenk, D. C. 1985. **Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid.** *Analytical Biochemistry*. Vol. 150, 76-85.

Su, V. S., Gurney, K. B. y Lee, B. 2003 **Sugar and Spice: Viral Envelope-DC-SIGN Interactions in HIV Pathogenesis.** *Current HIV Research*. Vol. 1, 87-89.

Sun, H. Q., Yamamoto, M., Mejillano, M. y Yin, H. L. 1999. **Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein.** *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, No. 47, 33179-33182.

Tassaneetrithep, B., Burges, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D. L., Steinman, R.M. Schlesinger, S. y Marovich, M. A. 2003. **DC-SIGN mediates dengue virus infection of human dendritic cells.** *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 197, 823-829.

Thepparit, C. y Smith, D. R. 2004. **Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high affinity-laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor.** *Journal of Virology*. Vol. 78, 12647-12656.

Thaisomboonsuk, B. K., Clayson, E. T., Pantiwatana, S. Vaughn, D. W. y Endy, T.P. 2005. **Characterization of dengue-2 binding to surfaces of mammalian and insect cells.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 72, 375-383.

Tomlinson, S. M., Malmstrom, R. D. y Watowich, S. J. 2009. **New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors.** *Infectious Disorders-Drug Targets*. Vol. 9, No. 3, 1-17.

van der Schaar, H. M., Rust, M. J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X. y Smit, J. M. 2008. **Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells.** *PLoS Pathogens*. Vol. 4, No. 12, 1-9.

Van de Walle, G. R., Favoreel, H. W., Nauwynck, H. J., Oostveldt, P. V. y Pensaert, M. B. 2001. **Involvement of cellular cytoskeleton components in antibody-induced internalization of viral glycoproteins in pseudorabies virus-infected monocytes.** *Virology*. Vol. 288, 129-138.

Van Kooyk, Y. y Geijtenbeek, T. B. H. 2003. **DC-SIGN: Escape Mechanism for Pathogens.** *Nature reviews, Immunology*. Vol. 3, 697-709.

World Health Organization (WHO) y Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). 2009. **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** WHO Press. 1-147.

## APÉNDICE

### ■ Azul de coomassie G-250

Azul de coomassie G-250 Bio-Rad	0.25 g
Metanol	90 ml
Ácido acético	10 ml
Filtrar a través de un filtro Whatman No. 1	

### ■ Buffer de carga

2-mercaptoetanol	25 ml
Stock sample buffer	475 ml

### ■ Buffer de corrimiento 1X pH 8.3

Tris-base 25 mM	3.03 g
Glicina 192 mM	14.4 g
SDS al 1%	1 g
Agua Milli-Q c.b.p. Aforar a 1000 ml	

### ■ Buffer fosfato salino 1X pH 7.0

Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (dibásico) 10 mM	1.466 g
NaCl 150 mM	0.333 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (monobásico) 10 mM	4.38 g
Agua Milli-Q c.b.p. Aforar a 500 ml y se esteriliza por filtración (poro del filtro con un diámetro de 0.22 μm)	

### ■ Buffer de transferencia 1X pH 8.3

Tris-base 25 mM	3.03 g
Glicina 192 mM	14.4 g
Metanol al 20%	200 ml
Agua Milli-Q c.b.p. Aforar a 1000 ml	

### ■ PBS 1X 10 mM pH 7.4

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Agua Milli-Q c.b.p. Aforar a 1000 ml y se esteriliza por filtración (poro del filtro con un diámetro de 0.22 μm)	

## APÉNDICE

### Solución desteñidora 1X

Ácido acético al 10%	50 ml
Metanol al 10%	50 ml
Agua Milli-Q c.b.p. 400 ml	

### Solución fijadora 1X

Fijador Kodak GBX 190 1875	103 ml
Agua Milli-Q c.b.p. 370 ml	

### Solución reveladora 1X

Revelador Kodak GBX 190 0943	103 ml
Agua Milli-Q c.b.p. 370 ml	

### Stock sample buffer

Agua Milli-Q	4.8 ml
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.2 ml
Glicerol	1.0 ml
SDS al 10 %	2.0 ml
Azul de bromofenol al 0.1%	0.5 ml

### TBST-BSA 1X

BSA al 1% (USB 70195) 1 g  
TBST c.b.p. Aforar a 100 ml y se esteriliza por filtración (poro del filtro con diámetro de 0.22  $\mu$ m)

### TBST 1X pH 7.2

Tris-base 10 mM 1.2114 g  
NaCl al 0.9% 9 g  
Tween-20 al 0.1% 1 ml  
Agua Milli-Q c.b.p. Aforar a 1000 ml y se esteriliza por filtración (poro del filtro con un diámetro de 0.22  $\mu$ m)