



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

IDENTIFICACIÓN DE PROTEINAS (POSIBLES RECEPTORES) DE  
RECONOCIMIENTO AL VIRUS DEL DENGUE (DENV) EN  
GLANDULAS SALIVALES DE *Aedes aegypti*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
M. EN C. JORGE ARMANDO CIME CASTILLO

TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. BLANCA HAYDÉ RUIZ ORDAZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:  
DR. EDGAR ZENTENO GALINDO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, FACULTAD DE MEDICINA

DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. DICIEMBRE 2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCION	
Generalidades virus dengue	3
Síndrome clínico del dengue	6
Receptores descritos para el virus dengue	10
Agente etiológico	11
Ciclo de transmisión del virus dengue	13
Estructura de las glándulas salivales de <i>Aedes aegypti</i>	15
Proteínas presentes en las glándulas salivales de <i>Aedes</i>	17
Importancia de los carbohidratos en el reconocimiento a patógenos virales	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA y JUSTIFICACION	23
HIPÓTESIS y OBJETIVOS	23
METODOS	25
RESULTADOS	
Identificación de carbohidratos en glándulas salivales de <i>Aedes aegypti</i>	35
Identificación de genes de la vía de síntesis del ácido siálico en tejidos de <i>A. aegypti</i>	35
Clonación, análisis de la secuencia de CMP-sintasa y evaluación de su función	37
Interacción ácido siálico-virus dengue en <i>Ae. Aegypti</i>	40
Identificación de glicoproteínas de unión al DENV	46
Identificación y caracterización de la glicoproteína D7 de <i>Ae. aegypti</i>	52
Infección viral de células de mamífero en presencia de HGS de <i>Ae. aegypti</i>	55
DISCUSION	58
CONCLUSIONES	65
PERSPECTIVAS	66
REFERENCIAS	67
APENDICES	75
PUBLICACIONES	95

Este proyecto de investigación fue realizado bajo la asesoría de la Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de becario 18249

## **Agradecimientos**

Con un profundo agradecimiento y compromiso con la Universidad Nacional Autónoma de México, Patrimonio de la Humanidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM; por permitirme continuar con mi preparación a través de los programas de becas nacionales.

A la Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio de investigación, permitirme plantear a su lado este proyecto, investigar y crecer este tema, gracias por enseñarme a ser autocrítico, a crecer como alumno y sobre todo a ser mejor persona.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr Alejandro García Carrancá y el Dr Edgar Zenteno Galindo, por las opiniones, sugerencias, críticas y análisis hechos a mi trabajo y mi desempeño como alumno, especial agradecimiento al Dr. Zenteno por la oportunidad de trabajar con sus colaboradores el Dr. Jorge Guevara, el Dr. Philippe Delanoy y la Dra. Anne Harduin a quienes agradezco profundamente todos sus comentarios y apoyo incondicional.

A la Dra Veronica Monrroy, por su valiosa colaboración en los aislamientos virales, así como en los ensayos de marcaje e infección viral en células de mamíferos, por supuesto por todo el apoyo que me ha dado a lo largo de mi formación académica.

Al Dr. Carlos Cabello, por sus valiosos comentarios y análisis de resultados en el laboratorio y por hacer que la investigación sea mas divertida.

Agradezco profundamente al CONACYT y al Posgrado en Investigaciones Biomédicas por darme el apoyo y financiamiento para poder asistir a la Universidad de Lille Francia.

Al Dr. Humberto Lanz Mendoza y al Dr Fidel de la Cruz Hernandez Hernandez, por su generosas donaciones de material biológico para este proyecto, pero sobre todo por enseñarme lo mejor de los mosquitos y las múltiples investigaciones que se puede hacer con estos, gracias por proyectarme su pasión por este tema.

A los miembros del jurado de obtención de grado: Dr. Luis Padilla Noriega, Dr Humberto Lanz Mendoza, Dr Celso Ramos García, Dr Jorge Guevara Fonseca.

## ABREVIATURAS

C	Cápside
ConA	<i>Canavalia enciformis</i>
CSAS	CMP/Acido Sialico Sintasa
DAPI	4´6-Diamidino-2-Fenilindole
DENV	Virus Dengue
DENVE-GS	Interacción Virus Dengue Glándula Salival
E	Proteína de Envoltura
FD	Fiebre por Dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica por Dengue
FITC	Isotiocianato de Fluoresceina
GAGs	Glicosaminoglicanos
Gal	Galactosa
GC	Cromatografía de Gases
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GS	Glándula Salival
Hex	Hexosa
HGS	Homogenado de Glándulas Salivales
HPLC	Cromatografía Liquida de Alta Resolución
HS	Heparan Sulfato
KDN	Acido Ketodeoxi Nonulosonico
Lch	<i>Lens culinaris</i>
LPA	<i>Limulus poly phemus</i>
MAA	<i>Maackia amurensis</i> aglutinina
MALDI-Tof	Espectroscopia de Masas asistido por Laser
Neu 5 Ac	Acido N-acetilneuraminico (Acido Sialico)
Neu Gc	Acido N-glicolineuraminico
NC	Nucleocápside
Pent	Pentosa
PGs	Proteoglicanos
Prm	Premembrana
SCHD	Síndrome de Choque por Dengue
Sia	Acido Sialico
SNA	<i>Sambucus nigra</i> aglutinina
ST	Sialil Transferasa
VOPBA	Virus Overlay Protein Binding Assay

## RESUMEN

El dengue es la enfermedad transmitida por vector que afecta a humanos de mayor prevalencia. La OMS estima que a nivel mundial se infectan más de 100 millones de personas anualmente y que una tercera parte de la población total vive en áreas de riesgo de contraer al virus dengue (DENV). Actualmente no existe una vacuna segura contra el dengue ni un modelo animal o tratamiento específico contra el virus, por lo que el control del mosquito vector es muy importante en el control de la enfermedad. Los mosquitos del género *Aedes* juegan un papel central en la interacción y competencia virus-vector, la cual se refiere a la permisividad intrínseca del mosquito a la infección, replicación y transmisión del agente patógeno al humano. La saliva del vector tiene una participación central en la transmisión virus- vector-hospedero. En el presente trabajo demostramos por primera vez la presencia de ácido siálico en el mosquito *Aedes aegypti*, el cual tiene una participación clave en la interacción DENV-mosquito.

La expresión de ácido siálico en artrópodos ha sido difícil de demostrar. Sin embargo, en el presente estudio logramos amplificar, clonar y detectar la expresión funcional de A. CMP ácido siálico sintasa, mediante la complementación de células CHO deficientes en CMP-sintasa. Por otro lado, se demostró la presencia de genes de la enzima Sialiltransferasa, ambas enzimas implicadas en la vía de síntesis del ácido siálico. Así mismo, se reporta por primera vez el reconocimiento del virus dengue a residuos de ácido siálico en su conformación  $\alpha$  2,6 en las glándulas salivales y estómagos de *A. aegypti* y cuya estructura se encuentra ligada a diferentes proteínas. Así mismo, evaluamos el posible papel de moléculas sializadas presentes en un extracto de las glándulas salivales durante la internalización del DENV en células de mamífero. La interacción del ácido siálico de *A. aegypti* con el virus dengue puede jugar un papel importante en la transmisión viral exitosa al humano. El estudio de las interacciones tempranas del DENV en el mosquito vector, permitirá un mejor entendimiento en la competencia vectorial, así como en el desarrollo de nuevas estrategias para el control de la transmisión del virus dengue.



## ABSTRACT

Dengue fever is the most prevalent arthropod-borne viral disease which affects humans. Over 100 million cases occur annually worldwide with a mortality rate of 5%, and no safe vaccine is available; thus, control of the mosquito vector (*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*) is the primary option for preventing dengue epidemics. *Aedes aegypti* has key roles in dengue virus (DENV) infection, replication, and viral transmission (vector competence). Mosquito saliva also plays an important role during DENV transmission. The mosquito factors associated with the modulation of DENV vector competence begins to know. In this study, we detected the presence of sialic acid (Sia) in *Aedes aegypti* tissues, which may have an important role during DENV–vector interactions. We also identified genome sequences encoding enzymes involved in Sia pathways. The cDNA for *Aedes aegypti* CMP-Sia synthase (CSAS) was amplified, cloned, and functionally evaluated via the complementation of LEC29.Lec32 CSAS-deficient CHO cells. *Aedes*CSAS-transfected LEC29.Lec32 cells were able to express Sia moieties on the cell surface. Sequences related to  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase were detected in the *Aedes aegypti* genome. Likewise, we identified Sia- $\alpha$ -2,6-DENV interactions in different mosquito tissues. In addition, we evaluated the possible role of sialylated molecules in a salivary gland extract during DENV internalization in mammalian cells. The knowledge of early DENV–host interactions could facilitate a better understanding of viral tropism and pathogenesis to allow the development of new strategies for controlling DENV transmission.

# INTRODUCCIÓN

## *Generalidades Virus dengue*

Entre las distintas clases de virus, los arbovirus (Arthropod-borne virus) se diferencian por su forma de transmisión, la cual se lleva a cabo por medio de artrópodos al alimentarse de sangre, actuando de esta manera como organismos vectores. Diferentes virus de ARN se replican en artrópodos hematófagos antes de su transmisión a un hospedero animal o humano. La mayoría de los virus de importancia médica se clasifican dentro de las familias Togaviridae, Flaviviridae y Bunyaviridae (Kuno, *et al* 2005). El virus del dengue (DENV) pertenece a la familia Flaviviridae y es un agente causal muy importante entre las enfermedades tropicales a nivel mundial, el virus más común entre los transmitidos por artrópodos y el responsable de casos severos con una tasa de mortalidad del 1 al 15% (World Health Organization, 2014). En las últimas décadas se ha incrementado mucho la incidencia del dengue en el mundo, más del 40% de la población mundial, esta en riesgo de contraer al virus (World Health Organization, 2014). Se estima que al menos 2.5 billones de personas viven en áreas de riesgo para dengue y que entre 50 y 100 millones de personas se infectan cada año (Noisakran & Perng, 2008).

Existen cuatro serotipos del DENV antigénicamente diferentes que co-circulan en regiones tropicales y sub-tropicales del mundo (Fig. 1.), la infección con uno de los cuatro serotipos confiere protección en contra de una reinfección homóloga, mientras que una infección heteróloga subsecuente incrementa la probabilidad de una forma más severa de la enfermedad (Halstead, 1977).

El DENV mide aproximadamente 500Å de diámetro, su genoma está compuesto de una sola cadena de ARN de polaridad positiva de 11 kb el cual tiene un solo marco abierto de lectura que codifica para una poli-proteína (Fig. 2). El ARN se encuentra empaquetado junto con la proteína de la cápside viral, la cual está cubierta por una bicapa lipídica derivada del hospedero (Gubler, 1998b) y está rodeada por 180 copias de las glicoproteínas de envoltura y de membrana (Lindenbach & Rice 2003).

El extremo amino terminal del genoma viral codifica para tres proteínas estructurales: la cápside (C), la proteína de membrana [M expresada como prM, el precursor de la proteína de membrana y la cual funciona como una chaperona para el doblaje y ensamblaje de la proteína

E] y la proteína de envoltura (E), juntas estructuran la partícula viral; el resto del genoma codifica para siete proteínas no estructurales entre las cuales se encuentran las enzimas esenciales para la replicación viral. Múltiples copias de la proteína de la cápside (120 aminoácidos) se asocian con el ARN viral para formar la nucleocápside (NC). La glicoproteína de membrana (165 aminoácidos) y la de envoltura (495 aminoácidos) contienen cada una dos hélices transmembranales (Mukhopadhyay *et al*, 2005). La glicoproteína E es ensamblada como homodímero en la superficie de los viriones maduros y contiene un sitio de unión al receptor celular y un péptido de fusión, el cual facilita la entrada a las células huésped (Allison *et al*, 2001).

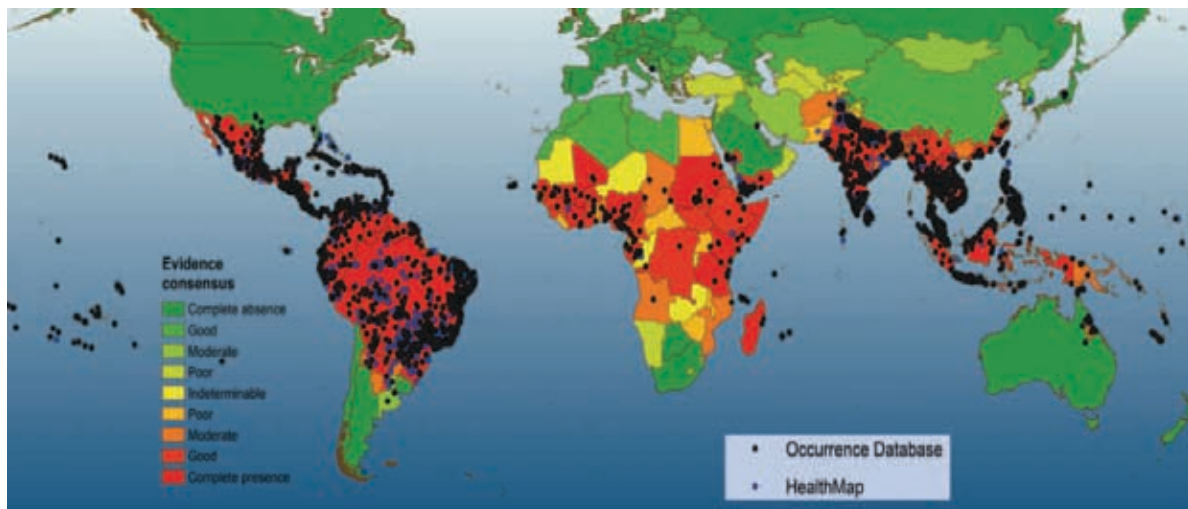


Figura 1. Distribución mundial del virus dengue en 2013 y su correlación con la presencia de *A. Aegypti* (áreas en rojo, tomado de Bhatt *et al*, 2013).

En sobrenadantes de células infectadas, el virus puede encontrarse ya sea como una partícula madura o inmadura, con un diámetro de 50 nm y 60 nm respectivamente. En el virion inmaduro prM y E forman 90 heterodímeros que a su vez conforman 60 espículas triméricas. En el virion maduro la proteína E se encuentra como 90 homodímeros que se acomodan en la superficie viral, formando la cobertura protéica (Figura 3, Perera & Kuhn 2008).

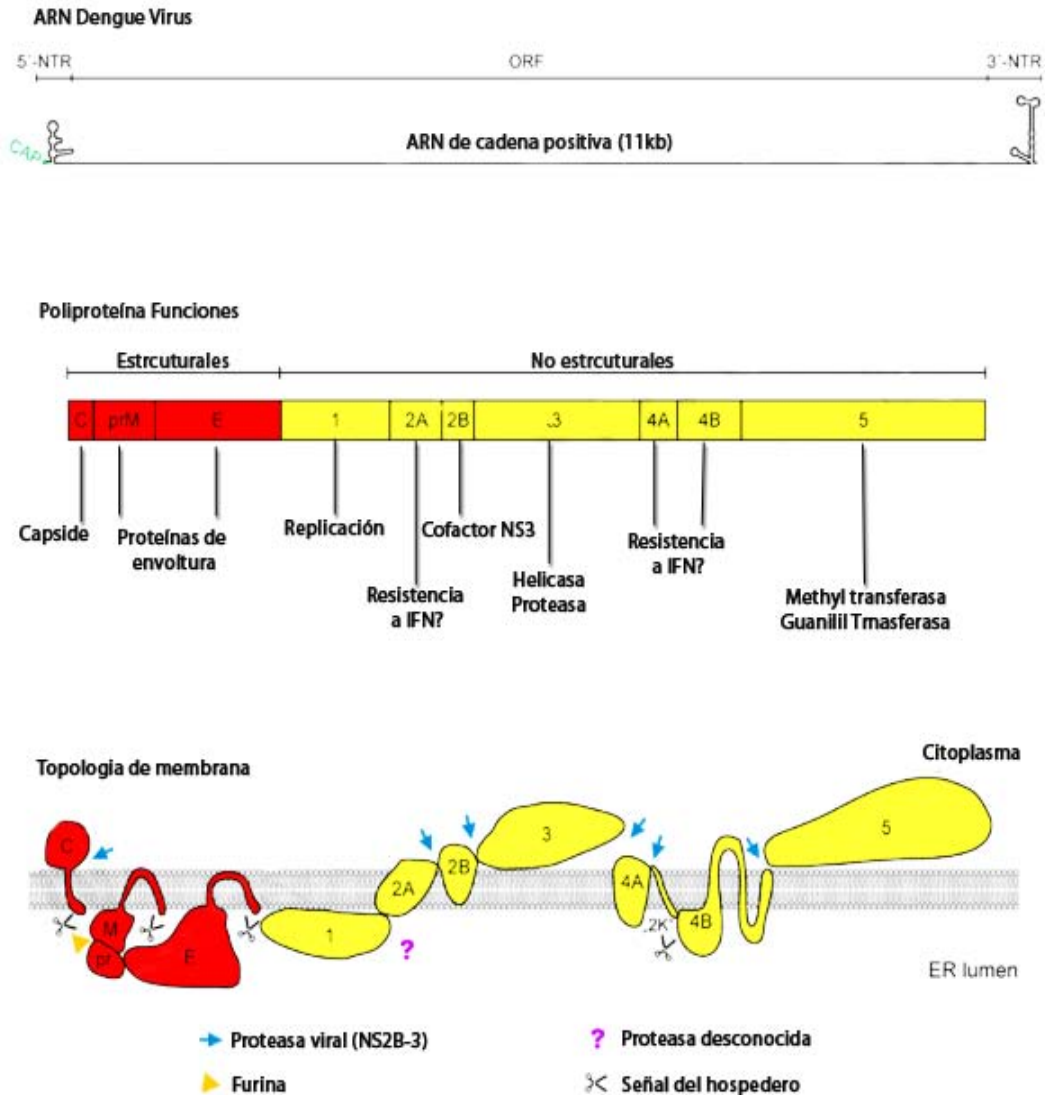


Figura 2. Organización del genoma del DENV. El genoma viral tiene un solo marco de lectura abierto que codifica para 3 proteínas estructurales (rojo) y 7 no estructurales (amarillo) en orientación 5'-3'. Abajo se muestra la posible topología en la membrana plasmática, El ARN viral es traducido como una glicoproteína y procesado por proteasas virales y celulares. La proteína de membrana (prM/M) y la proteína de envoltura (E) son liberadas de la poli-proteína por el corte de una signalasa en el retículo endoplasmico (RE), pero permanecen ancladas en el lado luminal de la membrana. La cápside esta también anclada en la membrana del RE (sobre el lado citoplasmático) por una secuencia señal hidrofobica en su extremo carboxilo terminal. Esta secuencia señal es cortada por la proteasa viral NS2B-NS3. Durante la maduración viral, prM es posteriormente cortada por la proteasa furina en Trans-Golgi generando el péptido pr y la proteína M. Las proteínas no estructurales son procesadas principalmente por la proteasa viral NS2B-NS3 en el citoplasma, con excepción de NS1, la cual es liberada de NS2A por una proteasa todavía no identificada en el lumen del RE. NS2A/2B y NS4A/B están ancladas en el RE como proteínas transmembranales. Modificado de virology molecular University of Heidelberg.

## *Síndrome clínico del dengue*

El espectro clínico del dengue es muy amplio anteriormente se clasificaba en cuatro posibles manifestaciones: Enfermedad no diferenciada, Fiebre por Dengue [FD], Fiebre Hemorrágica por dengue [FHD] y Síndrome de choque por Dengue [SCHD] (Gubler, 2003). La fiebre por dengue involucra una abrupta enfermedad febril de por lo menos 2-7 días, acompañada por dolor de cabeza, dolor retro orbital así como mialgias y artralgias (Rigau-Perez, 1998). La FHD y/o el SCHD se caracteriza por un rápido incremento en la permeabilidad capilar acompañado por trombocitopenia, hemostasia alterada y daño al hígado, la pérdida de fluido en el espacio tisular cuando no se reemplaza pronto puede generar choque (Halstead, 2007).

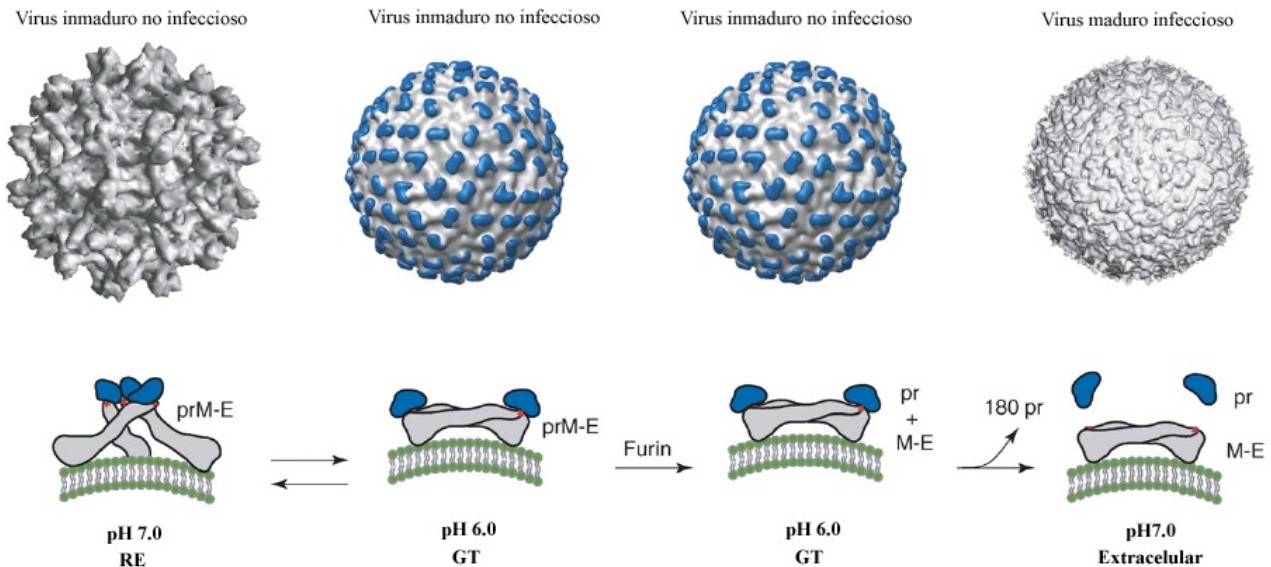


Figura 3. A pH neutral la proteína E existe como un heterodimero con la prM, estos heterodimeros forman 60 espículas triméricas que se extienden mas allá de la superficie del virus. Este arreglo de la proteína E da al virus una morfología con protuberancias y representa la partícula inicial que es ensamblada en el Retículo Endoplasmico (RE). A un pH bajo (6) los heterodimeros prM-E se disocian de su organización trimérica tipo espícula y forman 90 dímeros que se acomodan en la superficie viral. Esta orientación de las proteínas E y prM dan al virion una morfología lisa, al elevar el pH esta partícula puede revertirse a su morfología con espículas. En el aparato de Golgi, la proteína E es cortada en el péptido pr y la proteína M por la endoproteasa furina, la proteína E se mantiene formando 90 homodimeros en la superficie del virion. Por último el virus maduro es secretado al medio extracelular y el péptido pr es liberado de la partícula madura.

Sin embargo, debido al cambio en la epidemiología del dengue (presentación en regiones geográficas no tropicales y diferentes grupos étnicos), se ha dificultado el uso correcto y la aplicación de la clasificación de la OMS de 1997, la cual está basada en casos pediátricos de Asia Sudoriental. Los problemas en el uso de esta clasificación se han notificado por diferentes grupos (Guha-Sapir y Schimmer, 2005; Deen *et al.*, 2006; Rigau-Perez, 2006; Bandyopadhyay *et al.*, 2006). Tanto la dificultad para aplicar los criterios de clasificación de FHD/SSD aunado al incremento en los casos de dengue clínicamente severos que no cumplían estrictamente los criterios de la OMS (por ejemplo: falla hepática, encefalopatía), condujeron a la revisión de esta clasificación en 2009 (WHO, 2009). Se llevó a cabo un estudio clínico prospectivo multicéntrico en diferentes grupos étnicos, en diferentes regiones endémicas para dengue, con el objetivo de desarrollar una clasificación basada en evidencia. Los hallazgos de éste estudio confirmaron que utilizando un conjunto de parámetros clínicos y de laboratorio, es posible observar una diferencia entre el Dengue Grave ó Severo (DS) y Dengue no severo (Alexander *et al.*, 2011). El grupo de pacientes con dengue no grave se dividió en dos subgrupos de acuerdo a los signos y síntomas presentados: Dengue sin signos de alarma (D-SA) y Dengue con signos de alarma (D+SA). Cabe señalar que los pacientes sin signos de alarma pueden desarrollar dengue severo. Esta clasificación fue incorporada en las guías de la OMS en 2009 (Alexander *et al.*, 2011).

Los principales signos y síntomas de los pacientes con dengue son fiebre elevada de inicio súbito, cefalea, mialgias, artralgias, dolor retro-ocular y exantema. Pueden aparecer manifestaciones hemorrágicas leves como petequias, epistaxis y gingivorragia (WHO, 2009). El curso de la enfermedad muestra 3 etapas: Febril (aguda), crítica y de convalecencia. Durante la fase febril es difícil diferenciar el DS del dengue. Sin embargo, durante la etapa crítica, la cual coincide aproximadamente con la defervescencia, cuando la temperatura baja a 37.5-38°C o menos y permanece bajo este nivel, puede incrementarse la permeabilidad vascular, lo cual ocasiona hemoconcentración. Una leucopenia progresiva, seguida por un rápido descenso en plaquetas precede a la extravasación plasmática. Aunque la mayoría de los individuos sintomáticos se recuperan después de un curso clínico autolimitante, una pequeña proporción (10-15%) progresa a la enfermedad severa principalmente caracterizada por extravasación plasmática con o sin hemorragia. Cuando se pierde un volumen crítico de plasma por extravasación puede ocurrir choque que se define por una diferencia  $\leq 20$  mmHg

entre la tensión sistólica y diastólica. Algunos pacientes pueden manifestar signos de alarma (Dolor abdominal, vómito persistente, acumulación de fluido, hemorragia en mucosas, letargia o inquietud, hepatomegalia, incremento del hematocrito concurrente con rápido decremento de trombocitemia). El DS se define por uno o más de los siguientes signos: 1) extravasación plasmática que puede conducir a choque o a acumulación de fluidos, con o sin dificultad respiratoria; 2) hemorragia severa, 3) daño severo de órganos (falla hepática, encefalopatía, falla renal, cardiomiopatía).

Sin embargo, actualmente tanto la clasificación de 1997 como la clasificación de 2009 se utilizan ampliamente (WHO, 2009; Barniol *et al.*, 2011; Narváez *et al.*, 2011).

La mayoría de los casos de Dengue Severo, ocurren después de una infección secundaria o una infección con un virus más agresivo, dos diferentes hipótesis explican este modelo epidemiológico:

1) La hipótesis de la facilitación mediada por anticuerpos propone que los casos graves ocurren en infecciones secundarias, cuando anticuerpos específicos dirigidos contra el DENV y células T de memoria resultantes de una infección primaria con un serotipo diferente, aumentan la unión de DENV heterólogos a receptores Fc en monocitos (Halstead, 2002). Este proceso es seguido por la generación de citocinas inflamatorias y otros mediadores químicos. Estos componentes son liberados en su mayoría de células T, monocitos/macrófagos y células endoteliales causando un incremento en la permeabilidad vascular (Pang *et al.*, 2007).

2) La segunda hipótesis propone que algunas cepas de DENV son más virulentas que otras y causan una viremia elevada, esta hipótesis sostiene que este proceso es independiente del estatus inmunológico del huésped, por lo que el grado de virulencia puede asociarse a las manifestaciones severas del dengue (Rosen, 1977). Los genotipos asiáticos de DENV-2 recientemente introducidos en el Continente Americano se asocian con un incremento en el riesgo y severidad de la enfermedad, (Anderson & Rico-Hesse 2006).

Sin embargo, existen diversos factores que están involucrados en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad, entre los que se encuentran; la patogénesis mediada por la respuesta inmune celular, (Halstead ,1988) la producción de citocinas pro-inflamatorias (Pang *et al.*, 2007), el fondo genético del huésped (Sierra *et al.*, 2007), las diferencias biológicas de las cepas de virus (Diamond *et al.*, 2000), los niveles circulantes del DENV durante la fase aguda

de la infección (Vaughn *et al*, 2000) así como el estatus nutricional del individuo infectado (Thisyakorn *et al*, 1993). Otros factores involucran las propiedades físicas del virus circulante, la condición de anticuerpos neutralizantes (títulos de anticuerpos no neutralizantes en un individuo) y el sistema inmune innato del hospedero (Noisakran & Perng 2007).

Las diversas causas que producen el dengue severo, convergen en el incremento en la permeabilidad vascular, particularmente con daño al endotelio vascular (incremento en la permeabilidad vascular). Las células endoteliales pueden alterar su permeabilidad en base a la respuesta inmune especialmente por citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8 y otras citocinas proinflamatorias (Crone, 1986) así como diferentes mediadores solubles como el receptor IL-2, CD4 soluble, CD8 soluble, receptores a TNF, IL10 y el factor de inhibición de macrófagos (Basu & Chatuverdi, 2008). La quimiocina CCL2 y la proteína MCP-1 son proteínas que regulan las uniones de las células endoteliales y altas concentraciones de estas proteínas han sido reportadas en pacientes con DSS (Lee *et al*, 2006).

En diferentes estudios se han usado células endoteliales para estudiar la fisiopatología durante la infección por DENV. Se demostró en cultivos primarios de células endoteliales, que existe una relación entre las vías de señalización involucradas en los procesos inflamatorios y de coagulación durante la infección por DENV, debido a la regulación de receptores activados por proteasas (PARs) y el factor tisular (TF), a través de la fosforilación de MAPKs cinasas que inducen la expresión de IL8 o moléculas pro-adhesivas (VCAM-1), lo cual permite la activación de células endoteliales en presencia de diferentes aislados virales (Huerta-Zepeda *et al*, 2008). Así mismo, se reportó que existen alteraciones en la vía anti-trombótica y cito-protectora de la proteína C durante la infección producida por el DENV, favoreciendo el proceso apoptótico e incrementando la permeabilidad del endotelio vascular vía la activación de PAR1 y p38 (Cabello-Gutiérrez *et al*, 2009). Estos procesos junto con la acumulación de quimiocinas (RANTES) y la activación de la cascada del complemento en la superficie de células endoteliales (Avirutnan *et al*, 1998) pudieran explicar la vasculopatía observada durante los casos de síndrome de choque por dengue.



## ***Receptores celulares para el virus dengue***

Se propone que la interacción inicial entre una célula susceptible y el DENV es un determinante crítico tanto para el tropismo celular como en la patogenia. La proteína de envoltura (E) del virus dengue participa en la interacción receptor célula-huésped y es conocida como la proteína viral de reconocimiento. Diferentes grupos han propuesto la existencia de moléculas que pudieran participar en el complejo del receptor o co-receptor durante el proceso de internalización viral (Ramos-Castañeda *et al*, 1997; Martínez-Barragán & Del Angel, 2001; Bielefeldt-Ohmann *et al*, 2001). La identidad del receptor de alta afinidad ha sido objeto de diferentes estudios; en los últimos años un número de proteínas, incluyendo DC-SIGN, GRP-78, el receptor de laminina de alta afinidad de 37/67 kDa, el receptor de manosa y las proteínas de choque térmico (70 y 90) han sido consideradas como posibles receptores del DENV en diferentes líneas celulares (Tassaneeritthep *et al*, 2003; Navarro-Sanchez *et al*, 2003; Reyes del Valle *et al*, 2005; Jindadamrongwech *et al*, 2004; Thepparit & Smith 2004; Miller *et al*, 2008; Cabrera-Hernández & Smith 2005).

En la línea celular C6/36 de mosquitos, se ha encontrado un posible receptor glicoproteínico de 40 y 45 kDa, que reconoce a la proteína E del virus del dengue (Salas-Benito & del Ángel, 1997) así como dos proteínas de 67 y 80 kDa (Muñoz *et al*, 1998), también identificadas en el estomago de *A. aegypti* (Mercado-Curiel *et al* 2006; 2008). Sin embargo, ninguna de estas proteínas se ha caracterizado hasta la fecha y hasta ahora se desconocen las moléculas de interacción que el virus dengue utiliza en las glándulas salivales de su mosquito vector.

En estudios previos se ha observado que los glicosamino glicanos y en particular el heparán sulfato, es de gran importancia para el reconocimiento del DENV en un numero diverso de células de mamífero (Vero, CHO y células hepáticas humanas, Chen *et al*, 1997), sin embargo únicamente se le considera como una molécula de unión, ya que la reducción y/o eliminación de este carbohidrato significamente disminuye pero no bloquea completamente la unión e internalización viral (Hilgard *et al*, 2000; Thaisomboonsuk *et al*, 2005; Germi *et al*, 2002), por lo que se ha propuesto que el heparan sulfato funcione como coreceptor, concentrando al virus en la superficie membranal y facilitando de este modo la interacción del virus con un segundo receptor de alta afinidad. Por otra parte existe evidencia que las proteínas glicosiladas y/o residuos de carbohidratos por si mismos, tienen la capacidad de interaccionar con diversos patógenos virales y el virus del dengue no es una excepción.

## ***Agente etiológico***

Durante los pasados 50 años se ha elevado la incidencia de casos de dengue, debido en gran parte a un incremento en la densidad poblacional humana, la extensión en el movimiento de las masas poblacionales, así como un aumento tanto en la densidad como en la dispersión y distribución geográfica del mosquito (Gubler, 2002; 2004; Halstead, 2008). El estatus biológico y el tamaño de las poblaciones del vector, son críticos para la dinámica de transmisión del DENV.

Los mosquitos del género *Aedes* en especial *Aedes aegypti* y *A. albopictus* juegan un papel importante en la transmisión de este virus, lo cual involucra una compleja interacción en el ciclo mosquito-humano (Fig. 4). Las hembras hematófagas de estos vectores obtienen el virus de una persona infectada al ingerir la sangre necesaria para el desarrollo de sus huevecillos (Harrington *et al*, 2001), al momento en que el mosquito adquiere al virus, éste se replica en las células epiteliales del estómago, se disemina al hemocele, y finalmente infecta las glándulas salivales del vector, siendo este último un paso esencial para su transmisión (Salazar *et al*, 2007, Fig. 5). El intervalo de tiempo que pasa el virus dentro del vector se conoce como periodo de incubación extrínseca, usualmente se requieren de 8-10 días después de la ingesta sanguínea para que ocurra la replicación viral y la diseminación interna en el mosquito, antes de que el virus aparezca en las glándulas salivales en un periodo de 10-18 días (Monath, 1994; Salazar *et al*, 2007).

Una vez que el DENV se disemina a las glándulas salivales, la probabilidad de transmitir el virus varía con la frecuencia de intentos de alimentación, la cual está íntimamente relacionada con el periodo gonotrófico, el virus ingerido y la cantidad de sangre ingerida por el mosquito, influyendo en la posibilidad de que el vector lo disemine subsecuentemente (Rosen *et al*, 1985); aunque se considera que la concentración viral que ingiere un mosquito es importante para su futura transmisión, no existen suficientes estudios al respecto.

Aunado a los niveles de ingesta viral por el mosquito, la transmisión exitosa del DENV se asocia con la capacidad vectorial del mosquito, la cual es la tasa promedio a la que los vectores potencialmente infecciosos surgen a partir de un solo hospedero portador, se toma en consideración e incorpora los hábitos de alimentación y la sobrevivencia del vector en el tiempo requerido para que el patógeno se desarrolle y sea infeccioso. La capacidad vectorial es

regulada por factores intrínsecos del insecto, por ejemplo la competencia del vector y la preferencia del hospedero. Además factores como temperatura y humedad influyen en la probabilidad de sobrevivencia y por ende del periodo de incubación intrínseco.

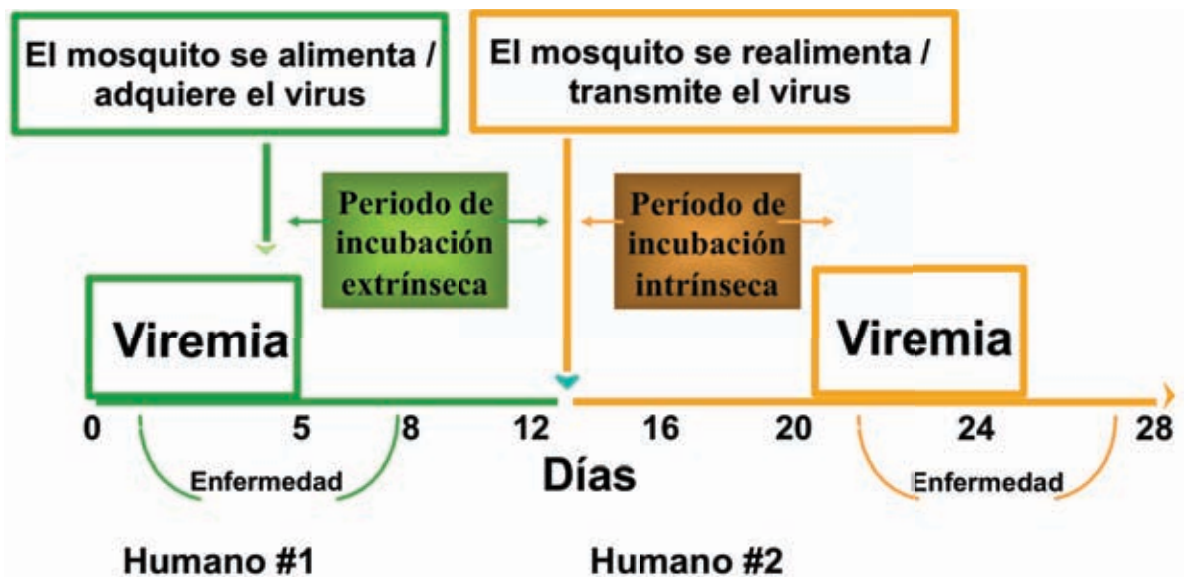


Figura. 4 El diagrama esquematiza tanto el periodo de incubación extrínseca como intrínseca una vez que el mosquito adquiere el virus y lo inocula nuevamente a un segundo huésped al momento de ingerir sangre. El periodo de incubación intrínseca varía entre 4.5 y 7 días, la duración de la viremia puede estar en función de la dosis viral inoculada por el mosquito infectado (Nishiura & Halstead 2007).

La competencia vectorial se refiere a la capacidad de permisividad intrínseca de un vector hacia la infección, replicación y transmisión de un virus (Woodring *et al*, 1998). En el ciclo DENV- mosquito, el virus debe pasar por varias barreras presentes en su vector antes de que pueda ser transmitido posteriormente a otro hospedero vertebrado (Fig. 6). Inicialmente el virus encuentra una barrera de infección en el estomago del vector, la cual tiene que evadir para esparcirse a otros tejidos y establecer una infección diseminada. Aunado a la permisividad de infección en el estomago, se localizan barreras de transmisión en las glándulas salivales (Black IV *et al*, 2002). Entre diferentes cepas del mosquito *A. aegypti* se ha comprobado la susceptibilidad, resistencia y/o diseminación en la infección viral (Bennet *et al*, 2005), que repercuten en el ciclo de trasmisión del virus. Así mismo, se conoce que la capacidad vectorial de *A. aegypti* es determinada por el genotipo infectante de DENV.

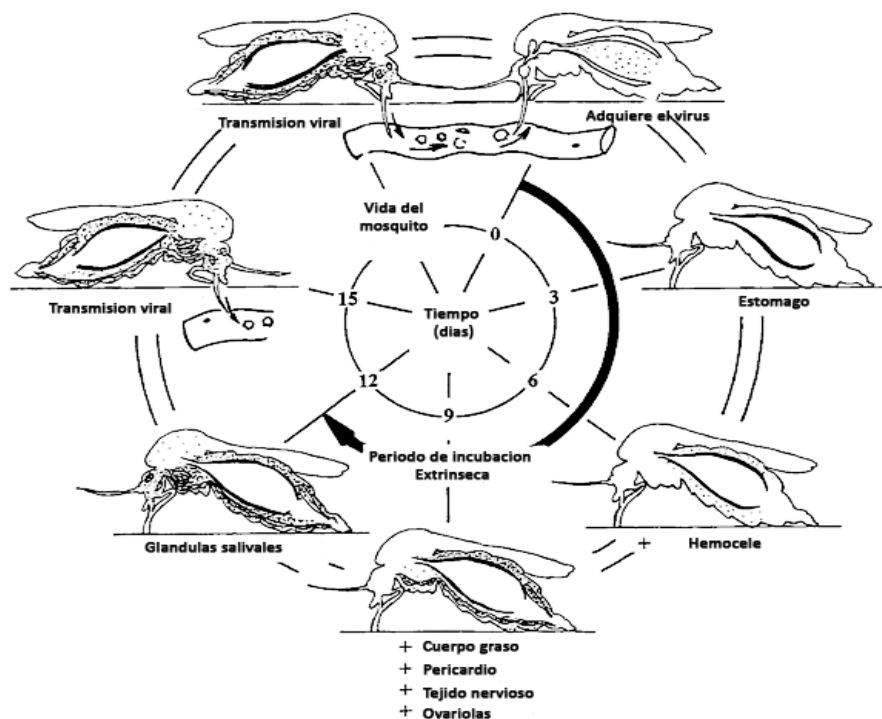


Figura 5. Se esquematiza el periodo de incubación extrínseca, una vez que el mosquito vector ha adquirido el virus en la ingesta sanguínea este invade tejidos importantes para su replicación y diseminación (Estomago y glándulas salivales), una vez que el virus alcanza el hemocele, diferentes tejidos del mosquito pueden ser infectados en un promedio de 9 días, finalmente llega a las glándulas salivales en donde el virus se acumula y está listo para ser nuevamente transmitido en un segundo periodo de alimentación por parte del vector.

## ***Ciclo de transmisión del virus dengue***

El ciclo de transmisión del virus del dengue puede ser tanto selvático como endémico:

- 1) El ciclo del virus dengue selvático, comprende la circulación entre hospederos primates no humanos y diferentes especies de mosquitos del genero *Aedes* particularmente en hábitats boscosos del oeste de África y Malasia. Se han aislado diferentes serotipos virales (DENV 1, 2 y 4) de monos y de especies arbóreas de mosquitos *A. africanus*, *A. leuteocephalus*, *A. opok*, *A. taylory* y *A. furcifer* (Gubler, 1997; 1998). Sin embargo el ciclo de transmisión selvático no ha sido estudiado más a fondo.

2) El ciclo de transmisión endémica del DENV implica la circulación viral entre el humano y el mosquito vector en hábitats domésticos, que sirven como reservorio y lugar de amplificación del DENV, particularmente en los mosquitos vectores *A. aegypti* y *A. albopictus*. La eficiencia del ciclo endémico, el cual es completamente independiente tanto evolutiva como ecológicamente del ancestral ciclo selvático, es propiciado por el comportamiento etiológico y ecológico del mosquito *A. aegypti*. Esta especie deposita sus huevecillos en diversos contenedores de agua, así como en desechos domésticos en las proximidades de los hábitats del humano, lo cual favorece que el vector entre a la vivienda humana y se alimente en múltiples ocasiones de sangre, durante cada ciclo gonotrófico para la obtención de sus nutrientes, producción y depósito de huevecillos.



Figura 6. Se muestran los sitios de replicación y diseminación viral, así como las barreras que marcan la capacidad vectorial en un mosquito, cuando el virus sobrepasa la barrera de transmisión en las glándulas salivales está listo para inocular a un nuevo hospedero y se considera un mosquito competente para la transmisión viral (Tomado y modificado de Black IV *et al*, 2002).

El movimiento de masas de población y el almacenamiento de desechos y contenedores de agua, probablemente esparcieron al mosquito *A. aegypti* desde su origen africano hasta los trópicos. Después de la segunda guerra mundial, esta especie aumento en prevalencia y distribución en Asia y en las islas del Pacífico. *A. aegypti* fue parcialmente erradicado del Continente Americano en las décadas de 1940 y 1950, pero ahora ha re-infestado la mayoría del trópico aumentando la probabilidad de brotes de dengue, sin embargo, se ha demostrado considerable variación en la susceptibilidad y eficiencia de la transmisión entre diferentes poblaciones geográficas de *A. aegypti* principalmente relacionadas con la capacidad vectorial y las barreras de infección (como estómago y glándulas salivales) y/o transmisión del vector.

### ***Estructura de las Glándulas salivales***

Con base en la estructura de las glándulas salivales se conoce que los mosquitos salivan abundante y frecuentemente, regulando su descarga por una combinación de nervios y mecanismos endócrinos. La saliva tiene muchos constituyentes cuyas funciones no están totalmente establecidas. Estas sustancias presumiblemente incrementan la adecuación del artrópodo al aumentar la velocidad a la cual la sangre es embebida y por disminuir la posibilidad de ser eliminados por los hospederos durante la alimentación (Ribeiro, 1984; Ribeiro, 1995). Así mismo, la saliva de los mosquitos es de amplio interés debido a que algunos parásitos (como los causantes de la malaria) y arbovirus (como el dengue), utilizan la saliva del vector como vehículo para la transmisión a sus hospederos vertebrados, por lo que pueden servir como objetivos para vacunas en contra de estas enfermedades (Valenzuela *et al*, 2001).

Cada mosquito tiene un par de glándulas salivales en el tórax justo arriba del primer par de patas flanqueando el esófago (Fig. 7). Cada una de las glándulas consiste de tres lóbulos, dos laterales y uno medio; la longitud de los lóbulos laterales es de aproximadamente 900  $\mu\text{m}$  y el del lóbulo medio de 360  $\mu\text{m}$ , su amplitud es de 70 a 80  $\mu\text{m}$  (Clements, 1992). Cada lóbulo está formado por una capa de células endoteliales dispuesta alrededor de un conducto central y unido externamente por una lámina basal. Estas células guardan los productos secretados en sus vesículas apicales. La saliva posteriormente es secretada dentro del conducto y liberada a la parte de la boca con la ayuda de una “bomba” salival. Los lóbulos laterales están formados

de tres regiones distintas, proximal, intermedia distal, mientras que el lóbulo medio está formado de una región corta (cuello) y una región distal (Fig. 8).

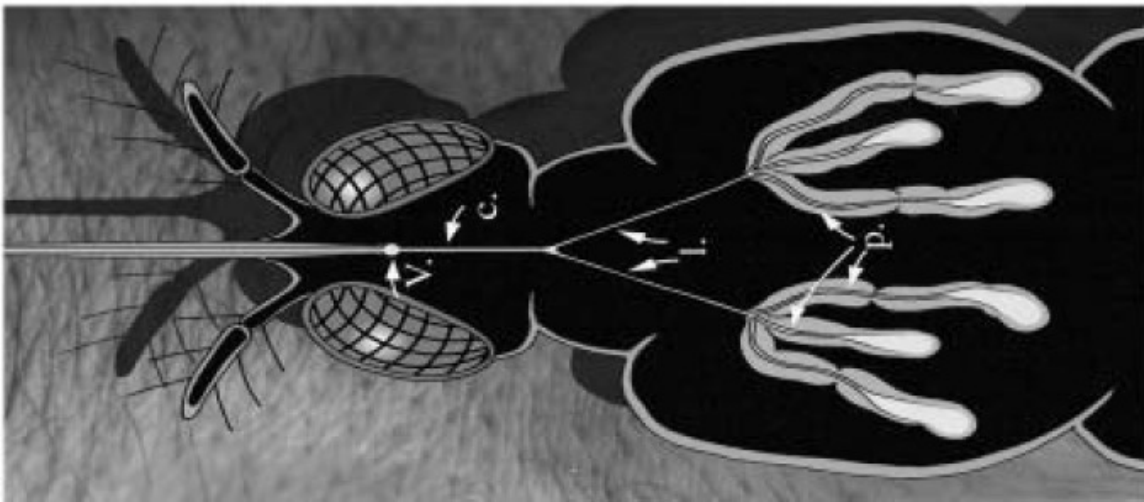


Figura 7. Se muestran la localización específica de las glándulas salivales en el mosquito. Cuando el virus dengue infecta las glándulas salivales está listo para infectar a un nuevo hospedero, en las flechas se traza la ruta (hacia los ductos salivales) que prosigue el virus dengue al momento de una ingesta alimenticia. (Tomado y modificado de Frischknecht *et al*, 2004).

Se conoce que las células del lóbulo distal están asociadas con la secreción de enzimas relacionadas a la alimentación de azúcares, mientras que las células del lóbulo posterior están asociadas con la secreción de moléculas relevantes durante la alimentación sanguínea (Valenzuela, 2003). Las glándulas salivales de los machos son más pequeñas que las de las hembras. Todas las células de las glándulas de los machos son similares a aquellas de la región proximal del lóbulo lateral de las hembras y carecen de proteínas con actividad involucrada en la alimentación sanguínea, debido a sus hábitos alimenticios no relacionados con la ingesta de sangre. La composición proteínica de las glándulas salivales a pesar de su tamaño resulta compleja y la mayoría de las proteínas salivales encontradas no tienen una función conocida (Ribeiro *et al*, 2007), aunque usualmente se pueden detectar al menos 10 de las proteínas más abundantes de un extracto total de glándulas salivales, por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (Valenzuela, 2002a).

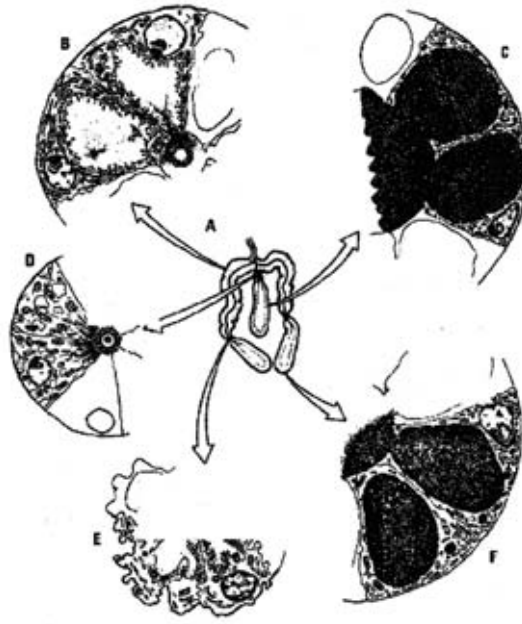


Figura 8. Estructura de las glándulas salivales de un mosquito. Se muestran las tres principales regiones de los lóbulos laterales y medio (A), así como su composición celular (B-F). (Tomado y modificado de Clements, 1992).

Entre las 10 principales proteínas de las glándulas salivales de las hembras de mosquitos, se encuentran la apirasa, el alérgeno salival de 30 KDa, y dos proteínas relacionadas a D7 denominadas D7B y D7, dos péptidos de bajo peso molecular nombrados AE01 y AE02 y una proteína relacionada al alérgeno salival sin función conocida, una proteína con secuencia similar a las angiopoyetinas, las cuales están involucradas en la regulación del crecimiento del tejido vascular en mamíferos, y finalmente una secuencia que se relaciona a la familia de proteínas antígeno-5 cuya función se desconoce (Valenzuela, 2002b).

### ***Proteínas presentes en las glándulas salivales de Aedes aegypti***

Las glándulas salivales de los mosquitos, contienen diferentes proteínas farmacológicamente activas (anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios, inmunomoduladores, etc), las cuales en su mayoría se encuentran presentes en las hembras. (Ribeiro & Francischetti 2003; Ribeiro, 1992; 1995; Champagne & Ribeiro, 1994; Beerntsen *et al*, 1999; Stark and James 1998; Calvo *et al*, 2007) El conjunto de estas proteínas se conoce como sialome (Valenzuela *et al*, 2002c). Algunas de las más abundantes en este tejido pertenecen a la familia D7, las cuales se



les adjudico su función en la interacción y secuestro de aminas biogénicas como serotonina, histamina, norepinefrina y epinefrina (Calvo *et al*, 2006). Durante su búsqueda por sangre, los mosquitos salivan dentro de la piel de sus hospederos, estos últimos reaccionan induciendo una respuesta para controlar la pérdida de sangre o el daño al tejido. La saliva inyectada neutraliza algunas de estas defensas y permite la alimentación exitosa del vector (Ribeiro, 2000).

La saliva de los mosquitos durante años se consideró inactiva, utilizada únicamente para lubricar las partes bucales del insecto. Este concepto ha cambiado con la demostración de que la saliva de los artrópodos hematófagos, incluyendo los mosquitos, está compuesta de potentes productos activos que alteran el sistema hemostático, inmune e inflamatorio del huésped (Valenzuela, 2002b). Después de penetrar la piel, los mosquitos introducen sus estiletes hacia atrás y adelante antes de localizar un vaso sanguíneo y empezar a alimentarse (Ribeiro *et al*, 1984). Al causar un daño en la piel y lacerar la dermis, se induce una respuesta a la pérdida de sangre y al daño producido por el piquete del mosquito ocasionando la activación del sistema hemostático, cuya función primaria es contrarrestar la pérdida de sangre.

Valenzuela y col. en el 2002a hicieron una descripción del conjunto de mRNA y proteínas expresadas en las glándulas salivales de *A. aegypti* descifrando el proteoma y transcriptoma de este mosquito. Estos autores reportaron la secuencia de 456 clonas, basados en productos de amplificación (PCR) de las glándulas salivales, en donde se describen 238 nuevas secuencias parciales, incluyendo la secuencia de 31 proteínas. Sin embargo, no se ha asignado una función biológica a la mayoría de estas secuencias, indicando que estas proteínas salivales pueden representar nuevas moléculas que actúan en la digestión de azúcares, actividad antibacterial o en la hemostasia. De estas 238 secuencias parciales, 118 están asociadas con probables funciones “housekeeping”, 38 son proteínas secretadas y 82 se refieren a productos de función desconocida. Entre las 38 secuencias probablemente asociadas a proteínas secretadas se reveló la presencia de 4 grupos de cDNA relacionados a proteínas de la familia antígeno-5 (no descritos previamente en *A. aegypti*), 4 grupos relacionados a las proteínas D7 (3 de las cuales son nuevos miembros) 2 grupos asociados con el anticoagulante salival dirigido en contra del factor Xa (uno de los cuales es un nuevo miembro), 2 grupos relacionados al alergeno salival de 30 KDa, 2 grupos con la marca de lectina tipo C y

relacionados al receptor de manosa en los macrófagos (no descritos previamente en *A. Aegypti* recientemente relacionados con una posible interacción con el virus dengue, Lin Y, *et al* 2014) y 2 más que tienen un dominio de fibrinógeno relacionadas con las angiopoyetinas de vertebrados. Además de encontrar 2 grupos asociados con la apirasa salival previamente descrita, se encontraron otros seis grupos adicionales, cada uno asociado con una diferente enzima: PAF-acetyl hidrolasa, una enzima que destruye el componente PAF de la agregación plaquetaria, esfingomielina fosfodiesterasa, carboxylesterasa, dos enzimas previamente descritas relacionadas a la alimentación de azúcar y una proteína que hidroliza purinas (Valenzuela, 2002c).

Asimismo, existen tres serin proteasas secretadas, las cuales están probablemente asociadas con la activación de la cascada de profenol oxidasa, responsable de diferentes reacciones inmunes de los artrópodos. Otra posible función asociada a estas proteasas es la de activar vías anti-hemostáticas como la proteína C o el sistema fibrinolítico.

En los últimos años se ha ampliado el conocimiento de proteínas de las glándulas salivales de *A. aegypti*, identificándose 614 transcritos que incluyen 136 posibles proteínas secretorias (Ribeiro *et al*, 2007), representando el 12.5 % en número de proteínas identificadas, de las cuales 9.2% están involucradas en la alimentación sanguínea, (familia de proteínas D7, adenosina deaminasa, apirasa, purin hidrolasa, alérgeno de 30kDa, familia de serpinas y la subunidad G de ferritina (Almeras *et al*, 2009), otras implicadas en la inhibición de la cascada de coagulación como la Aegyptin (Calvo *et al*, 2007, Chagas *et al*, 2014), sin embargo otras proteínas secretadas como vitellogenin B, SGS1 y la proteína secretada de 34 kDa no tienen función conocida. Interesantemente ciertas proteínas secretadas identificadas en saliva y en glándulas salivales, se detectan en varios pesos moleculares, tal es el caso de proteínas D7 detectada siete veces a diferentes pesos moleculares en saliva y únicamente tres veces en el tejido. Estas diferencias pudieran atribuirse a modificaciones pos-transduccionales de las proteínas en el tránsito de la glándula salival a proteínas secretadas (Almeras *et al*, 2008). Por lo que estas modificaciones post-transduccionales en particular la glicosilación, pudiera jugar un importante papel para el reconocimiento de diversos patógenos virales.

## ***Importancia de los Carbohidratos en el reconocimiento a patógenos virales***

Algunas de las funciones de los carbohidratos, al estar unidos a moléculas proteicas o a otras cadenas de azúcares, es el reconocimiento a diversos factores de crecimiento, quimiocinas, y componentes de la matriz extracelular. No obstante, los carbohidratos son trascendentes en la unión a la superficie celular de un grupo heterogéneo de bacterias, parásitos y virus. En particular los glicosaminoglicanos y el ácido siálico son utilizados por diversos virus para el reconocimiento e interacción en la superficie celular (Gesslbauer *et al*, 2007).

La glicosilación es la modificación post-transduccional más frecuente y contribuye significativamente a las funciones de las proteínas dependiendo en el tipo de glicosilación. (Gesslbauer *et al*, 2007). De acuerdo a la unión de los carbohidratos a su proteína, las glicoproteínas se dividen en cuatro grupos, 1) glicoproteínas ligadas a N, 2) glicoproteínas ligadas a O, 3) proteínas ancladas a glicosilfosfatidinositol (GPI) y 4) aunque menos común C-glicosilación la cual se encuentra adherida a residuos de triptofano en ciertas proteínas secretadas y asociadas a la membrana celular. Típicamente la glucosa, N-acetilglucosamina, galactosa, N-acetilgalactosamina, manosa, fucosa, xilosa y ácido siálico son monosacáridos componentes de las cadenas de oligosacáridos.

Las glicoproteínas contienen una o más cadenas de carbohidratos covalentemente unidas a residuos de asparagina (llamados N-linked) o a residuos de serina, treonina, hidroxilisina o hidroxiprolina (llamados O-linked). Estas glicoproteínas se encuentran ubicuitamente en la naturaleza como moléculas solubles (intracelulares o extracelulares) o como moléculas unidas a la membrana. La principal característica de la mayoría de las glicoproteínas es que el componente carbohidrato constituye un porcentaje mucho más pequeño del peso total de la glicoproteína con respecto a la cadena de aminoácidos. Este es un claro contraste a los llamados proteoglicanos (PGs) en el cual la proteína central es modificada en un grado mayor por cadenas largas de polisacáridos comúnmente del tipo de los glicosaminoglicanos (GAGs) covalentemente unidas a una proteína central.

Los PGs están asociados con adhesión viral en la superficie de células no permisivas y después mediar infección “in trans” por presentar los virus al receptor de alta afinidad y su entrada en células permisivas (Romain *et al*, 2006). La especificidad del receptor, el cual participa en la unión del virus a la célula huésped es determinante para el tropismo tisular y es

en muchos casos dependiente de la estructura de las moléculas de glicanos presentes en la superficie celular. Por otra parte, se conoce que la unión de diversos virus a la superficie celular involucra GAGs (en especial heparan sulfato (HS) y condroitin sulfato) para iniciar la infección de diferentes células (Apéndice A tabla 1). Se ha reportado que la eliminación del HS en la superficie de diversas células usando inhibidores de sulfatación (clorato de sodio) o enzimas (heparinasa), se asocia con una resistencia a la infección, resultado de una reducción en la habilidad del virus para unirse a la superficie celular. Esta interacción viral con los GAGs en la superficie celular, está regulada en gran parte por el grado de sulfatación de estos carbohidratos. La infección del virus de la hepatitis B en células HepaRG se abate en un 50% a bajas dosis (9.4 µg/mL) de heparina soluble la cual tiene aproximadamente 2.4 grupos sulfatos por disacáridos, la importancia del grado de sulfatación en las infecciones de este virus se hace más evidente al usar GAGs con un contenido de sulfatos de bajo de 1.1 grupos sulfato por disacárido (condroitin sulfato A, C y dermatan sulfato; Schulze *et al*, 2007). Este mismo patrón de sulfatación para el reconocimiento viral es necesario para el DENV, en el cual la heparina y el heparan altamente sulfatado bloquean la infección de células Vero cuando se usan como moléculas solubles en ensayos de competencia. Sin embargo el heparan pobremente sulfatado y otros GAGs con baja concentración de grupos sulfatos no inhiben el porcentaje de interacción viral en la superficie celular. El heparan presente en la superficie celular es un sitio de unión al DENV ya que distintas líneas celulares mutantes de células de ovario de hámster (CHO; pgsB-628 inhibición en la síntesis de condroitin y heparan sulfato, pgsD-677 completamente deficiente en la síntesis de heparan sulfato y pgsA-745 deficiente en xilosiltransferasa con falla total en la expresión de GAGs), que son deficientes en la producción de GAGs no son infectadas con este virus. Asimismo, moléculas polianiónicas (ácido lactobionico sulfatado) y polisulfonatos (suranim) son protectores a la infección en altas dosis (Chen *et al*, 1997).

Interesantemente el HS no es el único carbohidrato que puede servir como molécula inicial de reconocimiento en la superficie celular, ya que se ha visto que diferentes residuos de ácido siálico también tienen la capacidad de interactuar con diversos patógenos virales. Por ejemplo, el dominio knob de la proteína fibra de adenovirus, reconoce ácido siálico con diferente especificidad, mientras que otros únicamente lo hacen con HS, confiriéndole a los virus diferente adaptación y tropismo (Summerford & Samulski, 1998).

El ácido siálico (Sia) es abundantemente expresado en la superficie celular, en glicoproteínas secretadas y en la matriz extracelular; consiste de una familia de azúcares de nueve carbonos  $\alpha$  keto ácidos típicamente localizados en la posición terminal de una variedad de glicoconjugados. Puede encontrarse de forma libre, pero generalmente está glicosidicamente ligado al grupo  $\alpha 3$  o  $\alpha 6$  hidroxil de los residuos de galactosa (Gal) o al grupo  $\alpha 6$  hidroxil de N-acetilglucosamina (GlcNAc). El Sia puede existir como homopolímeros  $\alpha 2,8$  conocidos como ácido polisiálico. Existen diferentes formas naturales del ácido siálico que pueden estar presentes en una variedad de uniones a otros azúcares, en N-glicanos, O-glicanos y glicolípidos, generando un considerable grado de diversidad y especificidad molecular (Munday *et al*, 1999).

La diversidad en la estructura del ácido siálico se asocia con una variedad de funciones y procesos biológicamente importantes, de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas tales como carga negativa y tamaño. Por ejemplo, participa en eventos de reconocimiento a través de interacciones específicas con lectinas, una familia de proteínas que reconocen y unen azúcares (Lehman *et al*, 2006)

El ácido siálico puede ser un ligando para virus, bacterias y protozoos patogénicos y no patogénicos. Diferentes patógenos (virus, bacterias y protozoarios) expresan lectinas que pueden reconocer ácido siálico. Algunos micro-organismos patógenos interaccionan con las lectinas para su internalización en las células del hospedero, mientras que otros expresan lectinas solubles con una propiedad de unión al ácido siálico. En algunos casos, estos patógenos no sólo usan ácido siálico si no también otras moléculas en la superficie celular para su unión (Angata & Varki, 2002).

Las lectinas virales de reconocimiento al ácido siálico son usualmente capaces de aglutinar hemocitos y tradicionalmente son llamadas hemaglutininas más que lectinas. Muchos virus reconocen ácido siálico para facilitar la unión a las células del huésped (Apéndice A tabla 2), aunque su grado de dependencia al ácido siálico varía.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

Las interacciones tempranas en el reconocimiento viral en la superficie celular, es de gran importancia para la internalización y replicación viral en células huésped, el éxito de estos eventos depende del reconocimiento de receptores específicos en la superficie celular. Diferentes virus pueden utilizar dos diferentes receptores, un receptor de alta afinidad y un co-receptor o molécula de unión, fusión o anclaje. Los virus pueden reconocer diferentes azúcares para su adherencia en la superficie celular. En ocasiones un mismo virus tiene motivos de reconocimiento tanto a proteoglicanos como a residuos de ácido siálico.

Los carbohidratos son un sustrato clave para las interacciones y adaptaciones virales en su célula huésped. El primer paso en la infección por DENV es la interacción entre el virus y la célula huésped a través de un receptor celular, seguido por un proceso de internalización, la habilidad del DENV para infectar células de mosquitos podría depender de la presencia de este tipo de moléculas en los tejidos del vector.

Una vez que el DENV se disemina desde el estomago del vector, llega a las glándulas salivales, las cuales son consideradas el tejido más importante para la transmisión viral, por lo que en este estudio nos propusimos elucidar las interacciones tempranas llevadas a cabo entre el virus dengue y las glándulas salivales de mosquitos *A. aegypti*. La caracterización específica de proteínas y carbohidratos que participan en el reconocimiento DENV-vector es importante en la competencia vectorial.

## **HIPOTESIS**

En las glándulas salivales de mosquitos *Aedes aegypti*, existen moléculas específicas de reconocimiento al virus dengue, importantes en la competencia vectorial.

## **OBJETIVO**

Identificar la (s) molécula (s) involucradas (s) en el reconocimiento específico del virus del dengue en las glándulas salivales del mosquito *A. aegypti*, que podrían participar en la competencia vectorial.

### ***Objetivos Particulares***

- Evaluar la naturaleza de moléculas de interacción específica (posibles receptores) al DENV, en glándulas salivales de *A. aegypti*.
- Evaluar la especificidad de unión de las moléculas involucradas en el reconocimiento del virus dengue
- Caracterización de las moléculas involucradas en el reconocimiento al virus dengue

## **METODOS**

### **Establecimiento y mantenimiento de la colonia de mosquitos *Aedes aegypti***

Los mosquitos de la especie *A. aegypti* fueron cultivados en el insectario del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Para el mantenimiento de la colonia, los huevecillos del mosquito se colocaron en bandejas con agua y se mantuvieron a 28°C, con un porcentaje de humedad relativa del 70 al 80% y un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad; al eclosionar las larvas se alimentaron hasta obtener las pupas; estas últimas se colocaron en un recipiente cubierto con una malla para la obtención de los adultos los cuales se alimentaron con sangre de ratón para obtener nuevamente los huevecillos y continuar con el ciclo de vida.

### **Obtención de glándulas salivales.**

Las glándulas salivales de las hembras del mosquito *A. aegypti* de por lo menos 3 días después de emerger de la pupa se disectaron en grupos de 20 pares en 20 µl de Buffer salino fosfato (10 mM de fosfato de sodio a pH 7.0 con 150 mM NaCl) y se guardaron a -75° C hasta su uso. La disección de las glándulas salivales se logró con ayuda de micro agujas, colocando una de ellas en la parte anterior del tórax y la segunda en la posición de la cabeza del mosquito, las glándulas salivales se ven en un portaobjetos usando un microscopio de disección 4x (National 431TBL) y se pasaron a tubos estériles (Costar 3620).

### **Homogenado de las glándulas salivales (HGS).**

Cada una de las alícuotas que contiene 20 pares de glándulas salivales de *A. aegypti* se sometieron a un tratamiento de congelación y descongelación en cinco ocasiones utilizando nitrógeno líquido. Posteriormente las muestras se sonicaron (ultrasonic 8849-00, Cole- Parmer) durante 10 min y se centrifugaron a 3500 rpm x 10 min obteniendo el sobrenadante. La determinación de la concentración de proteínas del HGS se llevó a cabo por micro BCA (Pierce), las muestras del HGS se incubaron a 37°C durante 30 min y posteriormente se estimó la concentración de la misma a una longitud de onda de 562nm en un espectrofotómetro (Multiskan Ascent, Thermo



labsystem) la concentración de proteína se comparó a una curva estándar de BSA (albumina serica bovina) con una concentración de 2.0 µg/µl.

### **Propagación del virus dengue**

La cepa Nueva Guinea del virus dengue serotipo 2 (DENV-2, donado por el Dr Gubler del centro para el control de enfermedades (CDC) de Fort Collins, Colorado. USA) se propagó en células C6/36 y posteriormente se tituló en células LLC-MK2 (ATCC). Las células C6/36 se crecieron a 28°C en medio esencial mínimo (MEM, Gibco 32561) suplementado con aminoácidos no esenciales, vitaminas, 10 % de suero fetal bovino, penicilina y estreptomicina, las monocapas confluentes de estas células se inocularon con el DENV-2 durante 2 h a una multiplicidad de infección de 1 (MOI = 1), posteriormente se retiró el medio y se dejaron durante un periodo de 5-7 días a 28°C hasta que se observó un efecto citopático (ecp) en el cultivo celular, este procedimiento se repitió una segunda vez con la finalidad de amplificar el título viral, el cual se evaluó mediante placa lítica.

### **Titulación del DENV-2 por ensayo de placa lítica**

A una monocapa de células LLC-MK2 (25 cm<sup>2</sup> de cultivo) se le añadió tripsina, estas células se resuspendieron en 11 ml de Medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, con la suspensión celular se llenó una placa de 24 pozos (Nunclon) con 0.5 ml en cada uno, esta placa se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez que las monocapas estaban confluentes, se lavaron con PBS y se añadieron 100 µl de diferentes diluciones virales de DENV-2 (de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-8</sup> en medio libre de suero) a cada uno de los pozos e incubadas por 2 h a 37°C con 5 % CO<sub>2</sub>. Posteriormente se eliminó el inoculo viral, se lavaron las monocapas, y se añadió 1.5 ml de medio incompleto con 2.5 % de metil celulosa y se dejaron en incubación en una cámara húmeda con 5 % CO<sub>2</sub> a 37°C hasta observar ecp (6-8 días), por último las células se fijaron con 4% de paraformaldehído y se tiñeron con cristal violeta. La titulación viral se determinó contando directamente el número de placas líticas observadas en la dilución más alta, considerando el factor de dilución (ufp/ml = # placas x 10 x df, en donde ufp son las unidades formadoras de placas, df es el factor de dilución, 10 es el factor de corrección correspondiente a 0.1 ml del

inoculo viral). A partir de este ensayo estandarizamos nuestros títulos virales y trabajamos con un título de  $10^7$  ufp/ml

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

Para evaluar las posibles moléculas del HGS que pudieran participar en la unión con el virus dengue, llevamos a cabo un ensayo de proteínas de unión sobrelapadas al virus (VOPBA) de acuerdo a Salas-Benito y Del Angel (1997), con algunas modificaciones. Las proteínas del HGS en presencia o ausencia de 0.5 UI de sialidasa de *Clostridium perfringens*; se desnaturalizaron en presencia de SDS y agente reductor (2- mercaptoetanol), se corrieron a 90mV en una cámara de electroforesis (Bio Rad, miniprotean 3 cell) en un gradiente de poliacrilamida del 4-20 %. Como estándar se incorporo un marcador de peso molecular con un rango de 6.5 a 200 kDa. (Bio Rad 161-0317). Posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio Rad Trans-blot 162-0112), se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con solución de bloqueo (1% de albumina de suero de bovino (BSA, Sigma) + Tween 20 0.2% en PBS) y se lavaron tres veces con PBS. Se incubaron con DENV-2 durante toda la noche a 4°C en una solución de BSA al 1% en PBS  $Ca^{+}$  1mM, posteriormente las membranas se lavaron con PBS + 50mM de NaCl y se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti proteína E DENV-2 (Chemicon Mab 8702) en una dilución 1:300 durante 3.5 h a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS + 50mM de NaCl y se incubaron con un segundo anticuerpo IgG anti ratón acoplado a peroxidasa (Zymed 81-6520) a una dilución 1:5000 durante 1 h, transcurrido este tiempo las membranas se lavaron con PBS+50 mM NaCl y se revelaron con luminol (Santa Cruz Biothechnology, Western blotting reagent sc-2048), por último se tomo una placa fotográfica (Kodak).

### **Determinación de carbohidratos en glándulas salivales de *Aedes aegypti***

La disección de las glándulas salivales de mosquitos hembras de *A. aegypti* se llevo a cabo como se menciona anteriormente, se colocaron en 10 pares en 20 µl de buffer de disección y se canalizaron al laboratorio de glicobiología estructural y funcional de la Universidad de Ciencias y Tecnología de Lille France. En donde los monosacáridos se analizaron por GC/MS con trimetil-silil metil glicosido de acuerdo a Kamerling *et al* (1975). Brevemente: las muestras se

secaron y fueron metanolizadas en MetOH/HCl 0.5N, N-reacetiladas, y después trimetilsilaladas en una mezcla de BSTFA y piridina (1:1) antes de la inyección al cromatógrafo de gases.

### **Ensayos de inmuno histoquímica con lectinas en glándulas y estómagos de *Aedes aegypti***

Las glándulas salivales y estómagos de *A. aegypti* disectados se fijaron en portaobjetos con 4% de paraformaldehído durante 4 h a 4°C. Posteriormente se lavaron con alcohol en diferentes concentraciones (70, 96 y 100%) por 10 min cada una y se enjuagaron con PBS x 10 min, transcurrido el tiempo los tejidos se bloquearon con BSA al 2% durante 30 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se llevo a cabo un lavado con PBS x 5 min y los portaobjetos se sumergieron en PBS-Triton x-100 0.2% x 10 min, se lavaron con PBS-Ca<sup>2+</sup> 1mM x 10 min y se incubaron con diferente lectinas: *Maackia amurensis* Aglutinina (MAA), *Sambucus nigra* Aglutinina (SNA), *Lens culinaris* (LcH) y *Canavalia ensiformis* Aglutinina (ConA, Apéndice F) conjugadas a biotina (Ey laboratorios inc) en una dilución 1:100 x 2 h en una cámara húmeda a 37°C, se lavaron con PBS x 10 min y se incubaron con extravidin-isotiocianato de fluoresceína (FITC, Zymed) en una dilución 1:60 por 20 min, cubierto de la luz a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se enjuagan con PBS-Ca<sup>2+</sup> 1mM x 5 min y con agua desionizada x 5 min. Por último se les agrego líquido de montaje Vectashield-Dapi (Vectashield vector laboratories) y se observan bajo un microscopio de fluorescencia Leica DM/LS (Leica Microsystems) con objetivos de 10x, 20x, 40x y 63x, los fluorocromos fueron visualizados con sus respectivos filtros y analizados en dos canales: verde para lectinas y azul para los núcleos. Las imágenes se capturaron con una cámara digital Leica DCF-300FX (Leica Microsystems digital imaging) adaptada al microscopio. Finalmente las imágenes se digitalizaron con la versión 1.20 del programa Leica IM1000 (Imagic Bildverarbeitung AG). Como control positivo de la presencia de ácido sálico y de la unión de SNA al tejido, usamos cabezas, estomagos, abdomen y larvas de *Drosophila melanogaster*. Como control de inespecificidad de SNA, se trató el tejido de *A. aegypti* y *D melanogaster* con 0.5 UI de sialidasa de *C. perfreingens* previamente a la incubación con SNA, posteriormente se captó la señal bajo el microscopio como se describe previamente

## **Ensayos de inmuno histoquímica con DENV y competencia con lectinas**

Los ensayos se realizaron como se describió anteriormente con ligeras modificaciones: las glándulas salivales disectadas y fijadas se incubaron con DENV-2 ( $10^7$  ufp) a 4°C durante toda la noche, posteriormente se llevaron a cabo tres lavados de 10 min cada uno con PBS y las muestras se incubaron con un anticuerpo anti proteína E DENV 2 (MAB8702 virus dengue tipo 2 Chemicon) 1:300 x 2 h a 37°C. Transcurrido el tiempo, las muestras se lavaron con PBS x 10 min y se incubaron con un anticuerpo anti IgG acoplado a rodamina (Zymed laboratories) 1:3000 x 20 min a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegido de la luz, las imágenes se tomaron como se describió anteriormente en tres canales: verde para lectinas, rojo para anticuerpo anti DENV-2 y azul para los núcleos.

Para los ensayos de competencia con lectinas, estas se incubaron con las glándulas salivales previamente a las incubaciones con DENV-2. Para los ensayos de competencia de ácido sialico; utilizamos fetuina (Dig glycan differentiation kit 11210238; Roche) y ácido sialico soluble (*N*-acetylneuraminic acid A0812; Sigma-Aldrich). El virus dengue se incubo con estos competidores 1 h previa a la incubación con las GS previamente fijadas con paraformaldehído.

## **Tratamiento con sialidasa y tripsina**

Las glándulas salivales disectadas se trataron con 0.5 UI de sialidasa (*Clostridium perfringens*, Roche) o con 0.075 % de tripsina (Sigma) durante 5, 15 y 30 min previo a fijarse en paraformaldehído y a las incubaciones con DENV-2. Por último se tomaron las imágenes como se describe previamente.

## **Tinción de carbohidratos y ensayo de western blot con lectinas**

Para la tinción de carbohidratos, se llevo a cabo un gel SDS-PAGE del HGS en un gradiente de poliacrilamida del 4-20 % (como se menciona con anterioridad) y se tiñeron los carbohidratos totales del homogenado (kit de tinción de glicoproteínas Pro Q Emerald 300, Molecular Probes, invitogen P21855) de acuerdo al manual del proveedor, se le tomo una imagen usando un tansiluminador de UV (Gel Logic 1550 Kodak). Para el western blot con lectinas, las proteínas se

transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon y lavaron como se menciono con anterioridad, posteriormente se incubaron con SNA, LPA y ConA conjugadas a biotina (Ey laboratorios) en una dilución 1:100 durante 3.5 h, se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con un segundo anticuerpo acoplado a estreptavidina conjugada a peroxidasa (Zymed 43-4323, San Francisco California), a una dilución 1:5000 durante 1 h, transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron con PBS+50 mM NaCl y se revelaron con luminol (Santa Cruz Biothecnology, Western blotting reagent sc-2048), por último se tomo una placa fotográfica (Kodak). Como control positivo para SNA se uso fetuina sialidada, asialofetuina (Dig glycan differentiation kit, Roche) y fetuina tratada con *C. perfringens* (Roche).

### **Caracterización de proteínas por Maldi-Tof.**

La obtención de la secuencia proteica del HGS y de la saliva de *A. aegypti* se obtuvo a través del método de espectroscopía de masas asistido por láser (MALDI-ToF). Este ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de proteómica del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). La banda con interacción al virus dengue (VOBPA) y positiva para SNA, se fijó a una matriz orgánica de ácido  $\alpha$ -ciano-4 hidroxicinámico (CHCA), se sometió a digestión con tripsina antes de aplicarlas al MALDI-ToF. Previo a la caracterización iónica se pasó una mezcla de calibración con las siguientes proteínas:

Proteína	Peso monoisotópico
Arg <sup>-1</sup> –Bradiquinina	904.4681
Angiotensin	1296.6853
Glu- Fibrinopéptido	1570. 6774
Neurotensin	1672. 9175

Los resultados obtenidos de las masas de iones péptidicos se observaron en un cromatógrama de espectro de masas obtenido a partir del software interno del MALDI-ToF. El espectro de masas se comparó a la base de datos de iones péptidicos del NCBIInr con el programa Mascot, ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)), se incluyeron parámetros de oxidación

como modificación variable y carbamidomethyl como modificación fija, así como 0.1 Daltones de tolerancia péptica

### **Análisis de sitios de glicosilación**

La secuencia obtenida a partir de la base de datos de Mascot se analizó con el programa Glycomod (Cooper *et al* 2001), disponible en [www.expasy.ch/tools/glycomod](http://www.expasy.ch/tools/glycomod). Este programa analiza los valores de las masas iónicas obtenidas experimentalmente del MALDI-ToF y la relación de estas con la secuencia obtenida de la base de datos de Mascot. Los parámetros de búsqueda se llevaron a cabo tanto para proteínas N-glicosiladas como O-glicosiladas, con modificaciones de metilación oxidadas y cisteínas tratadas con iodoacetamida, así como una masa de tolerancia de 0.1 Daltons. La presunta presencia de péptido señal de la proteína D7 se llevó a cabo con los modelos de Markov y de redes Neutrales en [www.expasy.com](http://www.expasy.com).

### **Extracción de RNA de *Aedes aegypti***

Para llevar a cabo la extracción de RNA total, usamos 25 mosquitos hembras y 25 mosquitos machos adultos de 5 días post- emerger. Los mosquitos fueron homogenizados con un pequeño mortero en un tubo eppendorf en presencia de inhibidores de RNA asasa y mercaoptoetanol al 1%, posteriormente el tejido se homogenizó totalmente en un sonicador celular (Branson sonic power B-30), Por último el lisado se paso por una aguja de 0.9 mm. La extracción de RNA se llevo a cabo con el kit de extracción núcleo spin RNA II (Macherey-Nagel) de acuerdo a los protocolos del proveedor. Posteriormente se determino la concentración del RNA obtenido (nanodrop) y se comprobó la calidad del mismo por medio de nanochips RNA 6000 (RNA Aligent 2100 bioanalyzer, Agilent technologies).

### **Identificación de genes, síntesis de cDNA y rtPCR**

Para la identificación de los posibles genes involucrados en la síntesis de ácido sialico, llevamos a cabo un Blink y una búsqueda en Blast en el NCBI usando el algoritmo tBLAST, con la secuencia de aminoácidos de CMP- ácido sialico sintasa (Csas, gi|24667125) y sialiltansferasa (gi|

24762715) de *Drosophila m.* Una proteína representativa de la secuencia correspondiente de CMP- ácido sialico sintasa (XP 001663017) y otra correspondiente a la sialiltransferasa (XP 001649590), fueron identificadas en el genoma de *A. aegypti* (Apéndice B) y ambas corroboradas en VectorBase (<http://www.vectorbase.org/index.php>) obteniendo la similitud con las secuencias correspondiente a ID, AAEL012868 y AAEL014772 respectivamente.

La síntesis de la primera cadena de cDNA se llevo a cabo usando 200 ng de RNA templado con la ayuda de Affinity script QPCR cDNA synthesis kit (Stratagene) usando random primers, y las siguientes condiciones: 25 °C por 5 min para permitir el alineamiento de los primers, 42°C por 45 min para la síntesis del cDNA and 95°C por 5 min para finalizar la síntesis. Para la reacción de PCR usamos 5 µl of cDNA en un volumen de 25 µl PCR y fue amplificado con Taq DNA polimerasa (Reddy Mix PCR, Thermo scientific) con las siguientes condiciones: 95° C por 5 min, 38 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 1.5 min; 72°C por 10 min; y mantenido a 4°C. Usando los siguientes primers:

<b>5'aedsy</b>	5' GTTGAATTC <b>CATGCGGCTAGTTTTGAT</b> 3'	<b>3'aedsy</b>	5' AAT G G T A C C TTATTCTACTGTGGATCC 3'
<b>5'aedtr</b>	5' CAC AAGCTT <b>ATGTTGCGTGACGTTTCG</b> 3'	<b>3'aedtr</b>	5' CTA GGTACC TCAACATCCACTGTTGCT 3'
<b>5'Act</b>	5'TGGTTACTCGTTCACCACCA 3'	<b>3'Act</b>	5'GGCATACAGATCCTTTCGGA 3'

El primer 5'aedsy, contiene un sitio EcoRI así como los primeros seis codones de la secuencia CMP-n acetil neuraminico acido sintasa de *A. aegypti*. El primer 3'aedsy contiene un sitio de restricción KpnI, y los últimos seis codones de la misma secuencia. El primer 5'aedtr, contiene un sitio de restricción HindIII y los seis primeros codones de la proteína hipotética sialiltransferasa de *A. aegypti*. El primer 3'aedtr, contiene un sitio de restricción KpnI y los últimos seis codones de esta misma secuencia. Como control usamos primers específicos para actina del mosquito *A. aegypti*.

### Clonación y secuenciación

El producto de la secuencia de CMP-n acetil neuraminico acido sintasa fue clonado en el Vector Topo (TOPO TA Cloning Kit with pCR II TOPO) de acuerdo a los protocolos del proveedor. Posteriormente se transformo la cepa DH 5α de *E. coli* con un protocolo de transformación

químico. Para comprobar que el inserto de CMP-n acetil neuraminico acido se clono exitosamente, usamos los primer M13 5' (-20) y el primer M13 3'. El inserto de CMP-n acetil neuraminico acido sintasa se corto en los sitios de restricción EcoRI y KpnI, se subclono en un vector PFLAG CMV 10 (Sigma Aldrich) y se inserto en la cepa DH5 de E coli. Posteriormente el plasmido se obtuvo con Midi prep (Qiagen plasmin) y la secuencia insertada se verifico con los primers 5'p3 FLAG (GTT GAC GCA AAT GGG CGG TAG) y 3'p3FLAG (CTT GCC CCT TGC TCC ATA CCA C), con las siguientes condiciones: 96° C por 5 min, 38 ciclos at 96°C por 45 s, 50°C por 45 s y 72°C por 1 min; 72°C por 10 min; mantenido a 4°C. El producto de 786 pb de CMP-n acetylneuraminic acido sintasa fue cortado y secuenciado (Genoscreen).

### **Transformación Celular, Citometria de flujo e Inmunohistoquímica**

Celulas Cho Wt y LEC29.Lec32 se crecieron en  $\alpha$  MEM + 10 % de SFB en 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. La secuencia correspondiente a CMP sialico acido sintetasa se uso para comprobar su futura participación en células CHO LEC32.Lec29 deficientes de esta enzima, previamente se ligó y oriento la secuencia de CMP-sialico acido sintetasa de *A. aegypti* en el vector de clonación PFLAG CMV 10 (Sigma aldrich) y se transformaron bacterias E coli, DH5. El plásmido correspondiente de estas clonas se aisló usando Midi prep (Qiagen plasmin) y se obtuvo la secuencia. Se comprobó la presencia del inserto de CMP con ayuda de los primers internos específicos.  $1 \times 10^6$  células LEC32.Lec29 se transformaron usando lipofectamina (Invitrogen) en medio OptiMem con 5  $\mu$ g of PFLAG CMV 10 con y sin la secuencia correspondiente a CMP sialico ácido sintetasa por 6 horas, posteriormente las células se lavaron con medio  $\alpha$  MEM y se dejaron 36 horas posteriores a la transformación a 37°C.

Posteriormente las células LEC32.Lec29 transfectadas con el inserto de la secuencia de CMP-sialico acido de *A. aegypti* se cosecharon con 4mM de EDTA en PBS, se centrifugaron a 10.000 rpm x 15 min y se incubaron por 1h a 4°C con lectina MAA (*Mackia amurensis*) acoplada a biotina para llevar a cabo el análisis de citometria de flujo (Fac Scan, Becton Dickinson), como control negativo se usaron células únicamente transfectadas con el vector PFLAG y como control positivo se usaron células CHO Wt. El reconocimiento con el segundo anticuerpo se llevo a cabo con estreptavidina acoplada a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes Invitrogen).



Para el ensayo de inmuno histoquímica las células CHO Wt y LEC29.Lec32 se crecieron en porta objetos en medio  $\alpha$  MEM y se transfectaron como describimos previamente. Las células fueron incubadas con MAA acopladas a biotina, Alexa fluor acoplada a estreptavidina y montadas con DAPI. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de epifluorescencia.

### **Identificación de ácido sialico en estómagos de *Aedes aegypti* por medio de HPLC.**

Los estomago de mosquitos fueron disectados como se describe anteriormente, el tejido se homogenize en agua, se liofilizó e incubo con 1 ml 0.1 M TFA a 80 °C por 2 h. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm x 15 min y se añadieron dos volúmenes de etanol frio, posteriormente las muestras se secaron y resuspendieron en 100  $\mu$ l of agua y se pasaron a través de una columna de 50 x 2 (200 x 400 malla) y 50 x 8 (25 x 50 malla) de cambio de anion Dowex (100  $\mu$ l). La columna se eluyó con 3 volúmenes de agua. El volumen total fue secado y diluido en 0.1 M de TFA antes de su inyección en un sistema HPLC. Los glicanos liberados se separaron usando una columna C-18 Sep-PaK (Waters, Milford, MA).

### **Análisis estadísticos**

Los datos son expresados como la media y desviación estándar y evaluados usando U de Mann-Whitney con el software Statistica version 8. El nivel de significancia se consideró cuando fue menor a 0.05. Para determinar el nivel de significancia de la proteína D7 usando el programa Mascot, el valor de MS/MS se baso en la probabilidad absoluta que la similitud observada entre la masa experimental y la base de datos es  $-10 \log p$ , en donde p es la probabilidad que la similitud es un evento azaroso con una  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### *Identificación de carbohidratos en glándulas salivales de *Aedes aegypti**

Con la finalidad de obtener los posibles carbohidratos que pudieran estar interactuando con el virus del dengue y con el antecedente de que el heparan sulfato funciona como co-receptor viral, nos propusimos identificar los posibles azúcares que pudieran tener interacción con el DENV en las glándulas salivales de *A. aegypti*. La determinación de monosacáridos se llevo a cabo mediante cromatografía en fase gaseosa y los valores se reportan en mg para los carbohidratos mostrados en el Apéndice C, en el cual se observa que el azúcar más abundante corresponde a N-acetil galactosa con un promedio de 0.17 mg por 10 glándulas salivales, interesantemente encontramos por primera vez la presencia de ácido siálico (Sia) en *A. aegypti*.

### *Identificación de las vías de síntesis de ácido siálico en tejidos de *Aedes aegypti**

Con base a que una gran variedad de virus se unen a las membranas celulares a partir de residuos de ácido siálico (Sia), y que este carbohidrato ha sido propuesto como receptor de otros virus (Burmeister *et al*, 2004; Schwegmann & Herrler, 2006; Teuton & Brandt, 2007; Glaser *et al*, 2006; Suzuki *et al*, 2000; Ryan *et al*, 2006; Dugan *et al*, 2008; Isa *et al*, 2006); se caracterizo su posible participación como molécula de reconocimiento al virus dengue. No obstante, la existencia y presencia de ácido siálico en organismos protostomados y particularmente en artrópodos es controversial (Angata & Varki, 2002) y existe evidencia que diversas líneas celulares de insecto carecen de la maquinaria de síntesis de ácido siálico (Marchal *et al*, 2001). Sin embargo, recientemente se ha caracterizado y probado la función de diversas enzimas implicadas en la vía de síntesis de ácido siálico en *Drosophila melanogaster* (Kim *et al*, 2002; Koles *et al*, 2003; Viswanathan *et al*, 2006). Debido a esta controversia, primeramente se evaluó la presencia de la maquinaria de síntesis de ácido siálico en el mosquito *A. aegypti*.

Para la identificación de los posibles genes involucrados en la síntesis de ácido siálico, llevamos a cabo un Blink y un Blast en la base de datos del NCBI, con las secuencias correspondientes a las enzimas caracterizadas de *Drosophila m.* CMP- ácido siálico sintasa (CSAS, gi|24667125) y sialilttransferasa (ST gi| 24762715). Se identifico una proteína correspondiente a la secuencia de

CMP-ácido sialico sintasa (XP 001663017, CSAS) y otra correspondiente a sialiltransferasa (XP 001649590, ST) en el genoma de *A. aegypti* (Apéndice B). Las secuencias correspondientes a la vía de síntesis de ácido siálico en *A.aegypti*, se corroboraron en Vector Base de donde se diseñaron primers internos y externos para la amplificación de las mismas (ver métodos). Para la extracción de RNA, y la amplificación de CSAS y ST, se uso un grupo de 25 mosquitos hembras y 25 machos. Con los primers internos amplificamos los fragmentos esperados de 147 pb para CSAS, 125 pb para ST, y 298 pb para el control de actina. Para probar que no existe inespecificidad al amplificar ambas secuencias, usamos primers externos y amplificamos la secuencia completa de tamaño esperado de 786 pb para CSAS y de 1396 pb de ST. Interesantemente no observamos el producto de amplificación correspondiente a la ST en los machos de *A. aegypti* (Fig. 9).

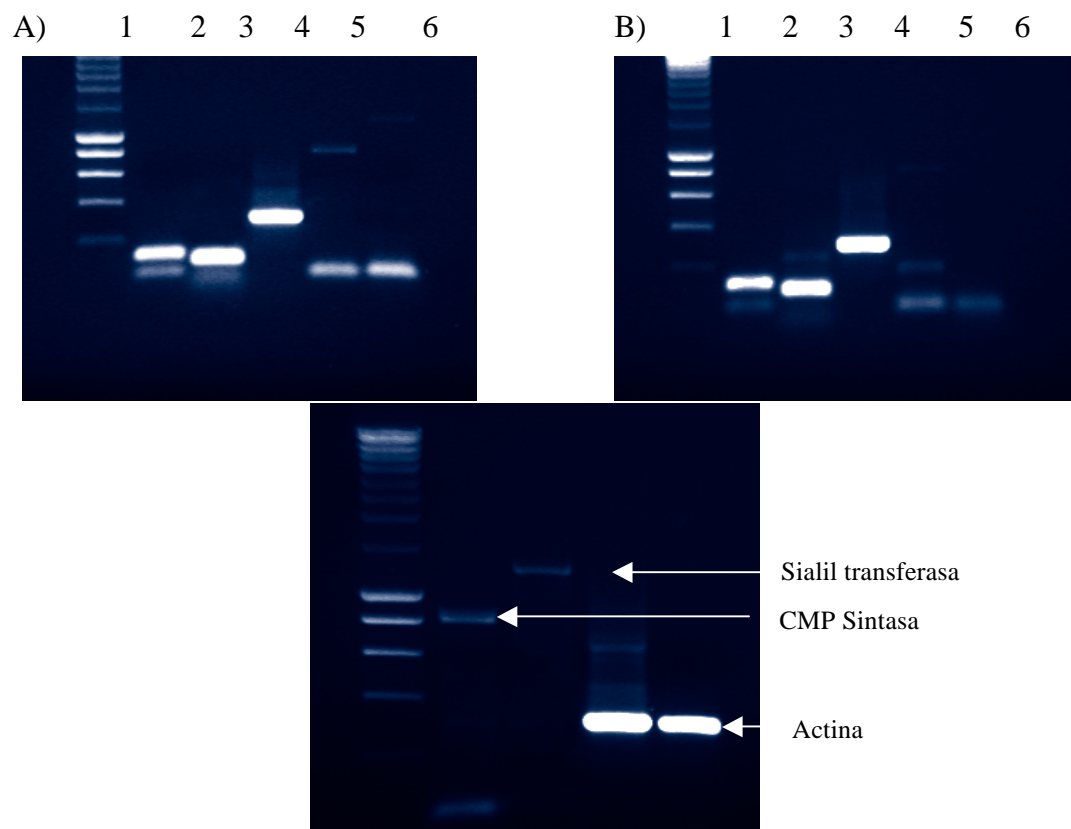


Figura 9. Expresión de las secuencias correspondientes a las enzimas involucradas en la generación de ácido sialico, A) Hembras B) Machos; 1- Marcador de peso molecular, 2- CMP sintetasa, 3-Sialiltransferasa, 4- Control de actina 5- secuencia completa CMP sintetasa, 6-Secuencia completa de sialiltransferasa. C) Expresión de las secuencias obtenidas a partir de RNA de 25 mosquitos hembras.

La presencia de CMP-sintasa y sialil transferasa se evaluó, usando los primers internos, tanto en estómagos como en glándulas salivales de *A. aegypti* (Fig. 10). Interesantemente la presencia de las enzimas involucradas en la síntesis de ácido sialico se encontró en ambos tejidos. Por lo que posteriormente comprobamos la presencia de ácido sialico en una conformación  $\alpha$  2,6 en ambos sitios.

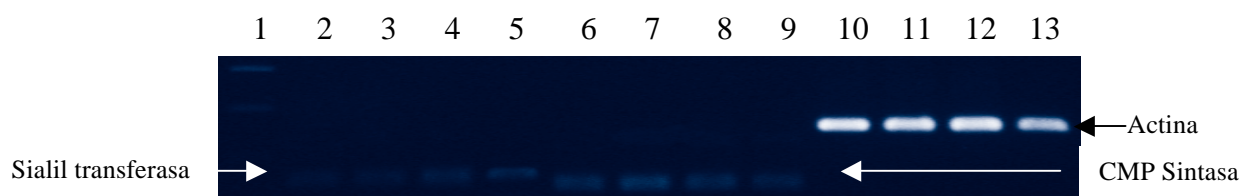


Figura 10. Se muestra la presencia de CMP-sintasa y Sialil transferasa en mosquitos hembras de *A. aegypti*. Línea 1 marcador de peso molecular, 2-5 fragmento de 147 pb de sialiltransferasa en; 2-Abdomen, 3-Cabeza, 4-Estómagos, 5- Glándulas salivales; 6-8 fragmento de 125 pb de CMP-sintasa en; 6-Abdomen, 7-Cabeza, 8-Estómagos, 9-Glándulas salivales; 10-13 se muestra el control de actina para los tejidos disectados en el mismo orden

### ***Clonación, análisis de la secuencia de CMP-sintasa y evaluación de su función en células CHO deficientes de ácido siálico***

La secuencia correspondiente a CMP-sintasa se clono en un vector de expresión (TOPO) y se corto en los sitios específicos de restricción generados en los primers externos, se oriento en un vector PFLAG (Apendice D) para caracterizar su secuencia y llevar a cabo la transformación de células deficientes de CMP-sintasa. Las clonas (C4sintasa y C8sintasa) secuenciadas tienen un marco de lectura abierto que predice una proteína de 261 aminoácidos con una masa molecular de 29.8 kDa y un punto isoeléctrico de 6.72. En C4 sintasa se observa un sitio potencial de polimorfismo (Fig. 11) en donde existe un cambio puntual de un residuo de Adenina por una Timina, lo cual produce un cambio de ácido aspártico por glutamina. Sin embargo, este cambio no modifica la carga proteica.

La CMP-sintasa de *A. aegypti* se cotejo con diversas secuencias disponibles de Genbank, dicha comparación dio como resultado mayor homología con secuencias putativas (aun no descritas) de otras especies de mosquitos que con la secuencia ya descrita de *Drosophila melanogaster* (Apéndice E), Sin embargo, la actividad funcional de las secuencias de estas otras especies de mosquitos aun no se han confirmado.

1 ATGCGGCTAGTTTTGATTCTGACGCTTCTCAGTGCACATCCAGCATTGGTTTCCTTCAA  
1 -M--R--L--V--L--I--L--T--L--L--S--A--H--P--A--F--G--F--L--Q--  
61 GAGAAAAGTGTGACGTGTCCAACATCCCCTGAAAGCATATCCAATGACAGCGTCATAGCG  
21 -E--K--S--V--T--C--P--T--S--P--E--S--I--S--N--D--S--V--I--A--  
121 TTGATTTTGGCAGGAGGCGGTTCCCGTGGCATTCCGCTGAAAAATCTAGCCAAACTCGAC  
41 -L--I--L--A--R--G--G--S--R--G--I--P--L--K--N--L--A--K--L--D--  
A  
181 GATCGTCAAACGCTGTTGAGTCGAGCGCTTCACACCGCACTCTCCACCGATGGATTTTAC  
61 -D--R--Q--T--L--L--S--R--A--L--H--T--A--L--S--T--D--G--F--H--  
E  
241 TCGGTGTGGGTTTTCAACCGAAGATGATCGGATTGCCCAAGCGGTAGAACGTGACTTCCCG  
81 -S--V--W--V--S--T--E--D--D--R--I--A--Q--A--V--E--R--D--F--P--  
301 CACGATCTCGTGAGAGTTCACCTGCGTCCGCCGGAGGTAGCCCAAGACCACACCAGTTCC  
101 -H--D--L--V--R--V--H--L--R--P--P--E--V--A--Q--D--H--T--S--S--  
361 ATCGAATCGGTCCGGGAGTTTTTGGATCATCATCCACGGGTGCAGAATGTGGCGCTGGTT  
121 -I--E--S--V--R--E--F--L--D--H--H--P--R--V--Q--N--V--A--L--V--  
421 CAGTGCACCTTCGCCATTTTTGGGGGTGAGGTATTTGGACGAAGCATTGCAGCGGTTCCAG  
141 -Q--C--T--S--P--F--L--G--V--R--Y--L--D--E--A--L--Q--R--F--Q--  
481 TCACTGAGAGTGGATTGCGTATTTCAGCGTTACGAGAAGTTTTAAGCTAAGGTGGCGGAAG  
161 -S--L--R--V--D--C--V--F--S--V--T--R--S--F--K--L--R--W--R--K--  
541 GAGAAGGATGGAAGGGTTAATGCGCTGAATTTTTGACCCTAGAAAACGTCCCAGGCGTCAA  
181 -E--K--D--G--R--V--N--A--L--N--F--D--P--R--K--R--P--R--R--Q--  
601 GATTGGGACGGAGAGCTTGTGAGGCGGGGATGTTCTACTTTGCAAGGAGAAAGTTGCTT  
201 -D--W--D--G--E--L--V--E--A--G--M--F--Y--F--A--R--R--K--L--L--  
661 CTAGAGGGTCGCTTTTCAACAACAACCTGCGAGGTGGTTGTGATTGACGAAAGAGATTCA  
221 -L--E--G--R--F--Q--N--N--N--C--E--V--V--V--I--D--E--R--D--S--  
721 TTGGAGATCGATTGTTGTACGATCTGGAGTTAGCAAGGAAGATCATTGGATCCACAGTA  
241 -L--E--I--D--S--L--Y--D--L--E--L--A--R--K--I--I--G--S--T--V--  
781 GAATAA  
260 -E--\*-

Figura 11. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de CMP-acido sialico sintasa de *A. aegypti*. En amarillo se muestran los residuos idénticos de otras CMP-sintasa (ver apéndice E) y en azul residuos conservados. En rojo se muestra el cambio de aminoácido en el residuo 61 de la secuencia proteica entre ambas clonas secuenciadas

Para evaluar la actividad funcional de la maquinaria de síntesis de ácido siálico de *A. aegypti*, se transfectaron células CHO, LEC32.Lec29 deficientes de actividad CMP-sintasa (derivadas de la línea parental Pro<sup>-5</sup> y Gat<sup>-2</sup> y generosamente donadas por la Dra P Stanley; Stanley, 1983). La expresión de ácido siálico se determino con una lectina de *Maackia amurensis* (MAA), la cual

reconoce NeuAc en su conformación  $\alpha 2,3$ . Con análisis de citometría de flujo observamos que el 70% de las células transfectadas con la secuencia correspondiente de CMP-sintasa de *A. aegypti*, muestran expresión de ácido sialico (Fig. 12 línea azul) de forma similar a las células CHO parentales no deficientes en ácido sialico (Fig. 12 línea magenta) mientras que el 30% no se transfectaron y se asemejan a la población de células LEC32.Lec29 no transfectadas (control negativo Fig. 12 línea verde y negra).

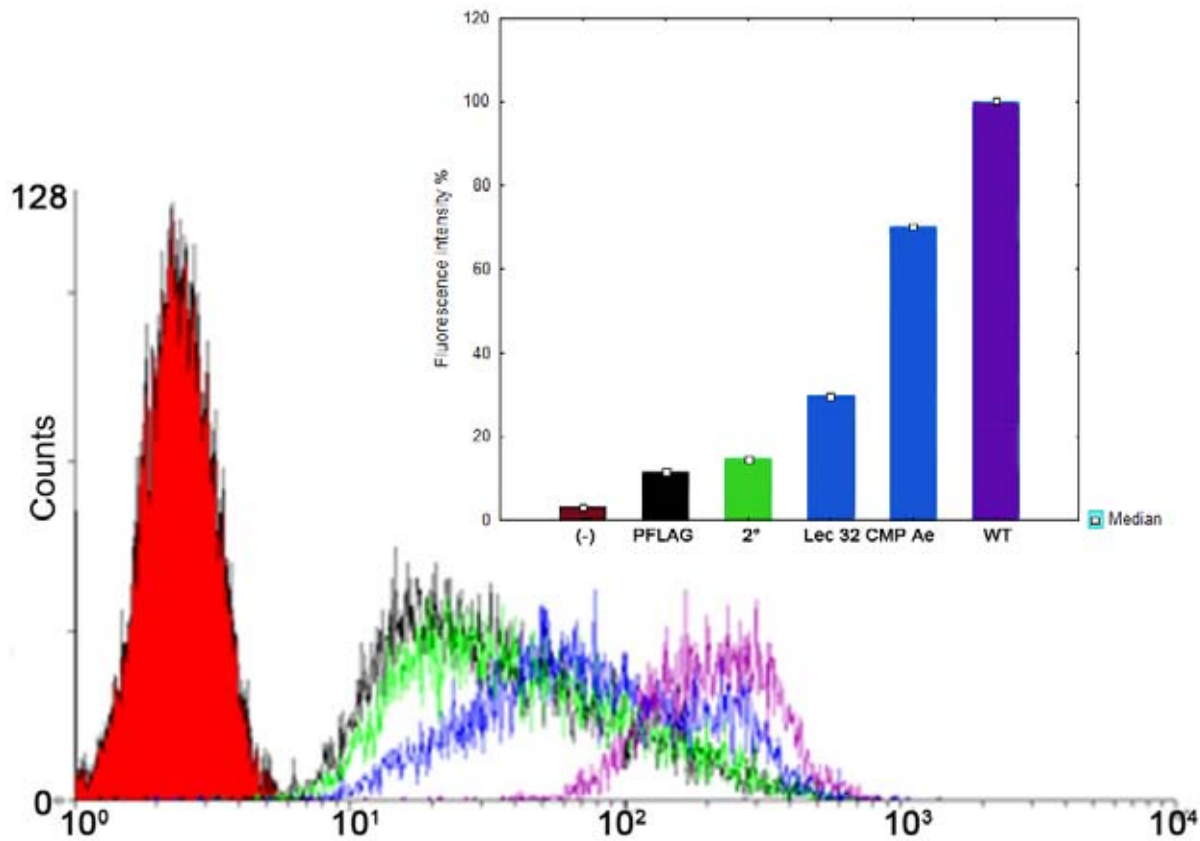


Figura 12. Análisis de citometría de flujo, se muestra en rojo el control de isotipo, en negro células LEC32Lec29 transfectadas con el vector PFLAG, en verde células LEC32Lec29 sin transfectar, en azul se muestra la población de células transfectadas con la secuencia de CMP sialico acido sintetasa proveniente de *Ae aegypti*, y en magenta la gráfica perteneciente a las células CHO parentales. En el recuadro se muestra el porcentaje de intensidad de fluorescencia para cada una de las poblaciones celulares. En las barras azules se muestra el porcentaje de células que se transfectaron y muestran actividad de ácido siálico, un resultado esperado debido al porcentaje de éxito en la transfección.

Para confirmar estos resultados, se evaluó la presencia de ácido siálico en células LEC32Lec29 transfectadas con la secuencia de CMP sintasa de *A. aegypti*, en ensayos de inmunohistoquímica probando su presencia con lectina MAA. Las células transfectadas se asemejan a las células positivas para ácido siálico, (Fig. 13 B y C) y una parte de ellas no muestran la presencia de ácido siálico (como el control negativo, Fig. 13 A). Estos resultados corroboran la actividad funcional de CMP-sintasa, para la generación de ácido siálico, tal cual se ha demostrado recientemente en *Drosophila melanogaster*.

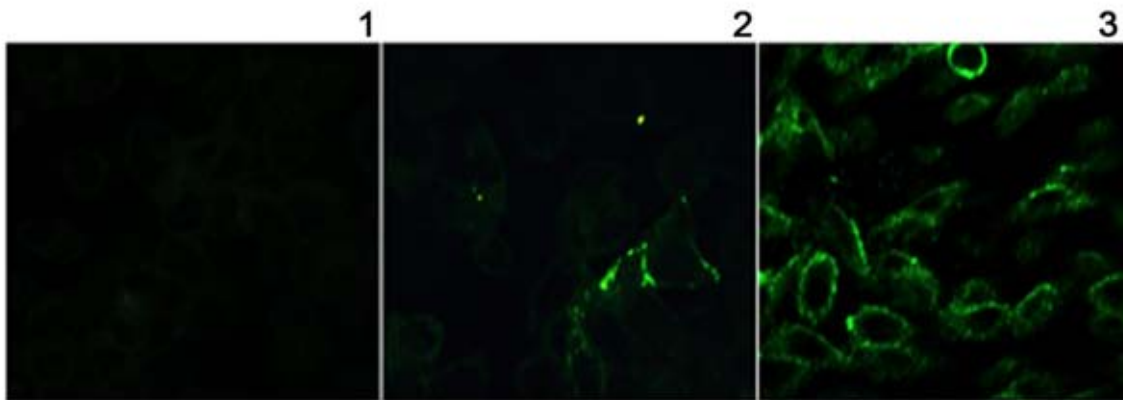


Figura 13. Ensayo de inmunohistoquímica. La detección de ácido siálico se llevó a cabo con lectina MAA. En 1 se muestran células LEC32Lec29 transfectadas con el vector PFLAG sin la secuencia de CMP de *A. aegypti*, en 2 las células transfectadas que incluyen dicha secuencia y en 3 se muestra la presencia de ácido siálico en células CHO parentales.

### ***Interacción ácido siálico- virus dengue en Aedes aegypti***

A partir de un panel con lectinas específicas para residuos de Sia (Apéndice F) identificamos en la superficie de cortes de glándulas salivales de *A. aegypti*, la presencia de este carbohidrato glicosidicamente ligado en un arreglo  $\alpha 2,6$  (Fig. 14). La especificidad en las glándulas salivales depende únicamente de esta composición, ya que una lectina (*Maackia amurensis*, MAA) que reconoce únicamente residuos NeuAc  $\alpha 2,3$  no se unió a la superficie de este tejido, lo que sugiere una especificidad NeuAc  $\alpha 2,6$  (Fig. 15). La presencia de este carbohidrato se observó también en cabezas y estómagos de estos mosquitos (Fig. 16). En los estómagos, la presencia de ácido siálico se corroboró por medio de HPLC (Apéndice G). Como control positivo de la presencia de Sia en tejido, usamos cabezas, abdomen y estómagos de *D. melanogaster*, los cuales incubamos con lectina SNA. (Apéndice H).

Para evaluar si la presencia de ácido siálico en la superficie de las glándulas salivales tiene participación en el reconocimiento al DENV, llevamos a cabo un ensayo de competencia en la superficie de las glándulas salivales de *A. aegypti*, añadiendo el virus dengue a este tejido (interacción DENV-glándulas salivales en ausencia de lectinas Fig. 17 A), y llevando a cabo incubaciones previas a la adición del virus con diferentes lectinas (SNA, LcH y ConA). A partir de estos ensayos, pudimos observar que al bloquear los residuos  $\alpha 2,6$  con SNA la unión del DENV en la superficie de las glándulas salivales disminuyó, mientras que la interacción con residuos de manosa (LcH y ConA) en este tejido no abatió la señal producida por la interacción del virus dengue en la superficie de las glándulas salivales (Fig. 17 B y 17 C).

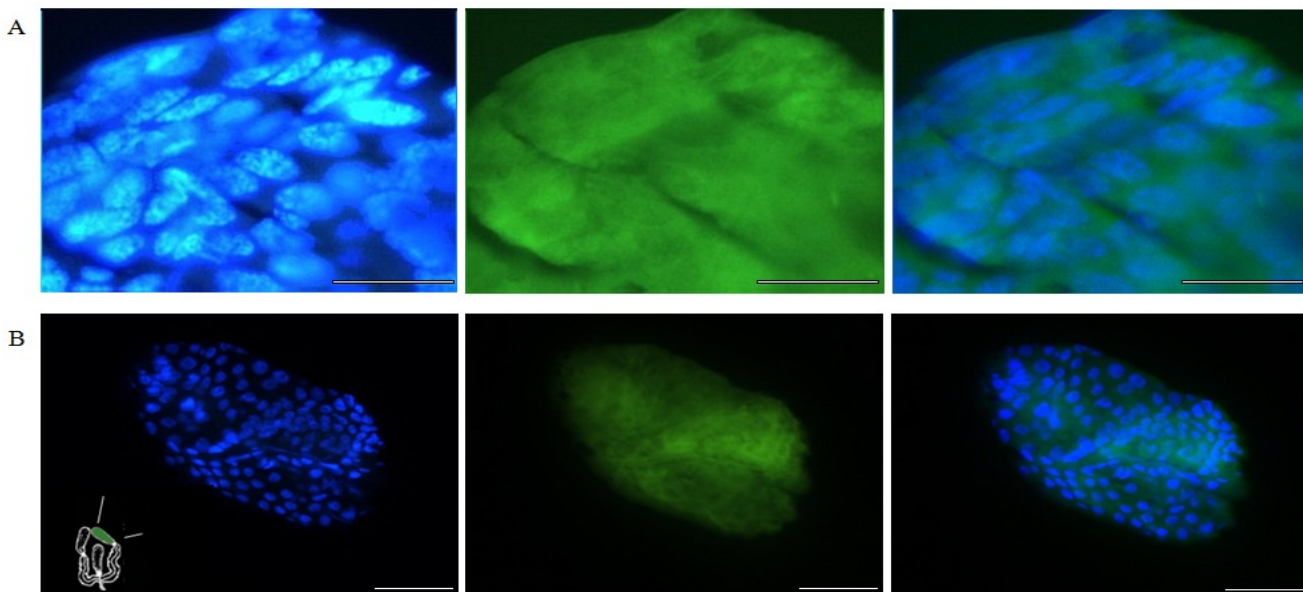


Figura 14. Se muestra la presencia de ácido siálico en su conformación  $\alpha 2,6$  en la superficie de las glándulas salivales del mosquito *Ae. aegypti*. (A) Aumento 60X, (B) Aumento 40X. En el recuadro se muestra la región de la glándula salival. En verde se muestra la señal con la lectina específica  $\alpha 2,6$  (SNA), en azul los núcleos teñidos con DAPI. Escala 10 $\mu$ m.

Para comprobar si dicha unión en la superficie de las GS depende de los residuos de ácido siálico, tratamos estos tejidos con la sialidasa de *Clostridium perfringens* durante 5, 15 y 30 min previos a la incubación con DENV (Fig. 18 a, b y c respectivamente), observamos que la unión al virus disminuyó al tratar los tejidos durante 5 min y que la interacción se abate cuando las glándulas salivales son tratadas con sialidasa durante 30 min previos a la interacción con el dengue virus. Estos datos nos indican que la unión del DENV en las GS del mosquito *A. aegypti*.



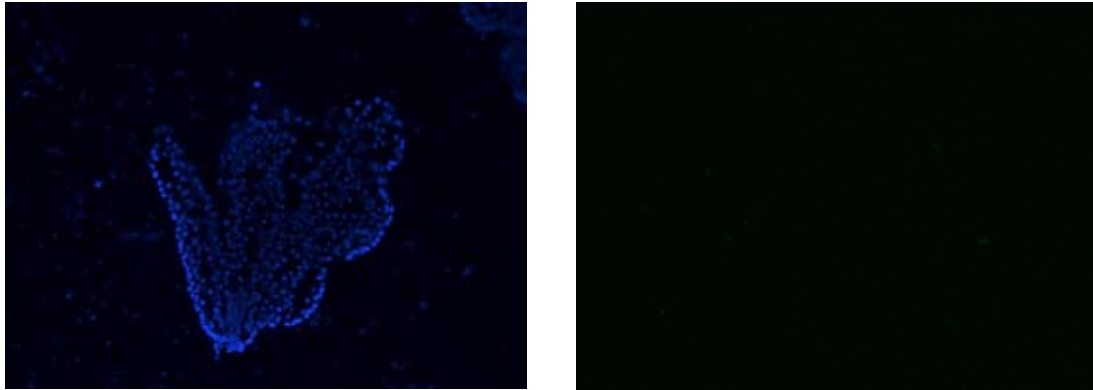


Figura 15. Se muestra la imagen de una glándula con sus núcleos teñidos con DAPI, a la derecha la imagen del tratamiento con MAA para observar la presencia de ácido siálico en su conformación  $\alpha$ 2,3 en la superficie de las glándulas salivales del mosquito *Ae. aegypti*. Aumento 20X. Escala 10 $\mu$ m.

Para corroborar la participación de Sia en la interacción con el DENV, llevamos a cabo un ensayo de competencia en presencia de ácido siálico soluble y fetuina (Fig. 19). La interacción del virus dengue, en presencia de fetuina y ácido siálico soluble (Fig. 19 B y 19 C) disminuyó a comparación de la unión DENV-Glándula salival en ausencia de competidores (Fig. 19 A).

Para evaluar si la interacción entre las GS del vector y el virus dengue dependen de una glicoproteína, tratamos el tejido con tripsina durante 5, 10 y 15 min (Fig. 20). A diferencia de los tratamientos con sialidasa, la interacción viral en los tejidos incubados con tripsina durante 5 min no disminuye, sin embargo dicha unión cae a los 15 min y se abate por completo a los 30 min antes de la adición del DENV. Estos resultados nos indican la presencia de una glicoproteína en las GS de *A. aegypti*, la cual tiene residuos de ácido siálico en su conformación  $\alpha$  2,6 y cuya presencia es importante para la interacción con el virus dengue.

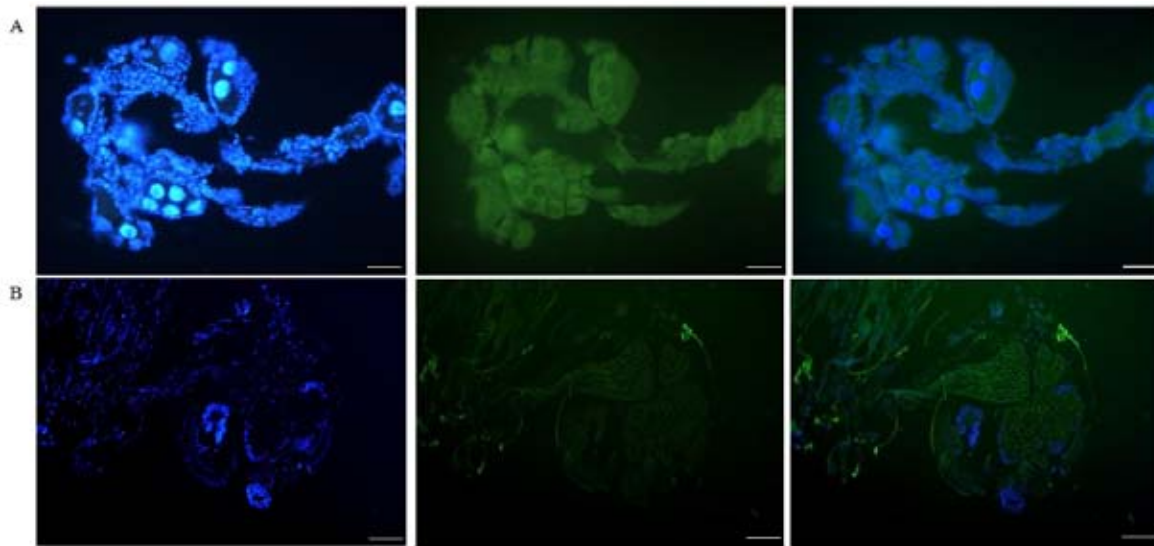
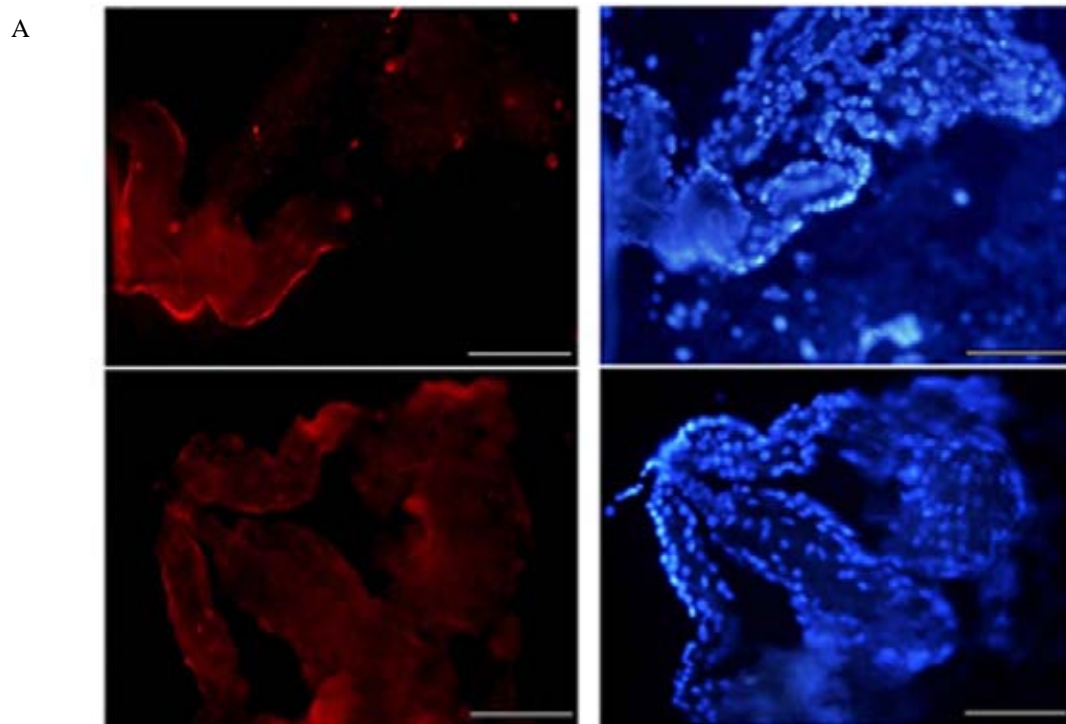


Figura 16. Detección de ácido siálico en su conformación  $\alpha$  2,6 en A) cortes de estómagos y B) en cabezas de *A. aegypti*.



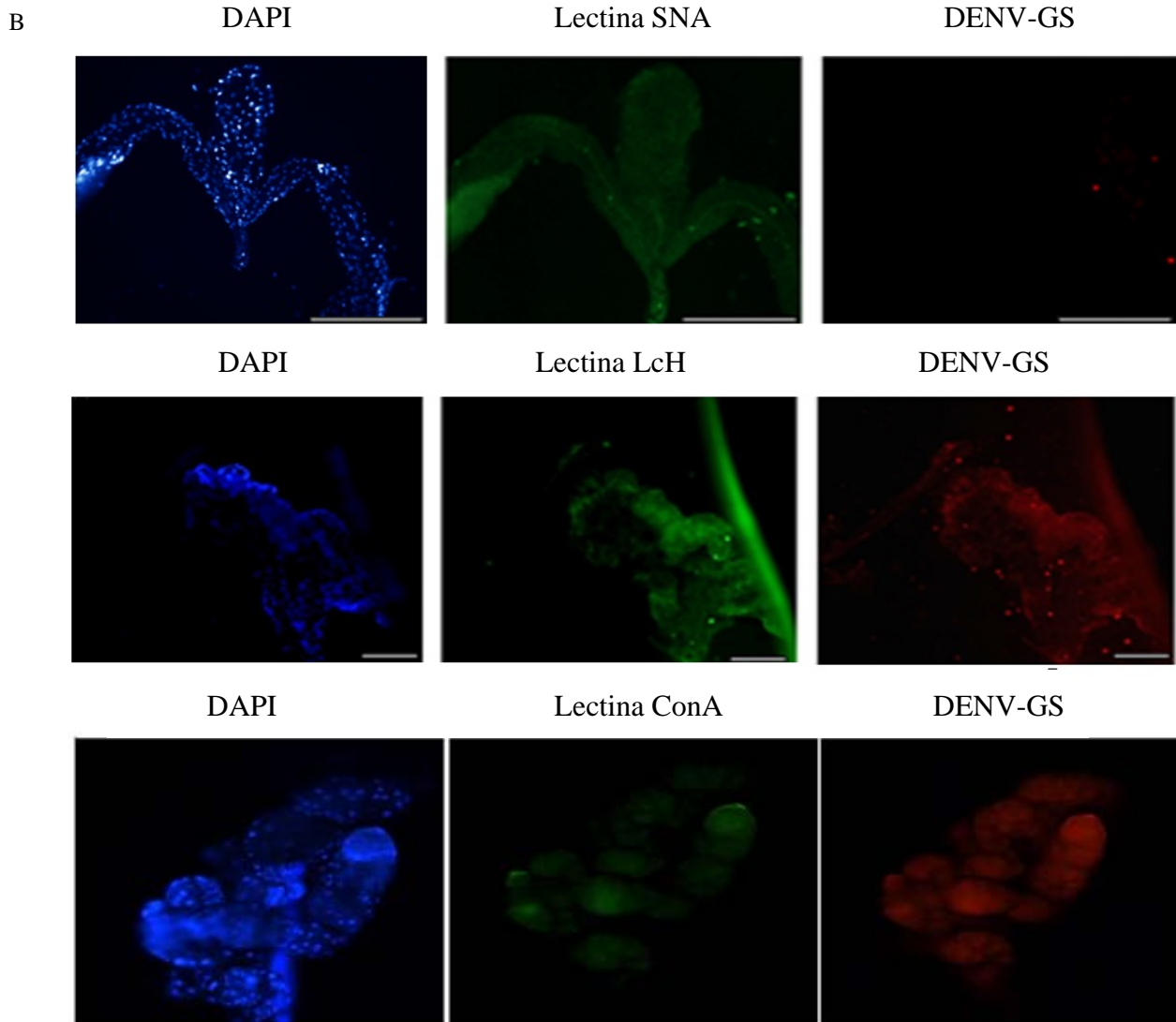


Figura 17. Se muestra la interacción del virus dengue en la superficie de la glándula salival del mosquito *A. aegypti* previo (panel A) y posterior al tratamiento con lectinas (panel B).

En el panel A se muestran dos ensayos de unión del virus dengue en las glándulas salivales sin tratamiento previo con lectinas. En el panel B se muestra la señal producida en la superficie de la glándula salival con diferentes lectinas (SNA, LcH y ConA), así como la interacción del virus dengue en el tejido, posterior a la interacción con lectinas. Los núcleos teñidos con DAPI en azul, en verde la señal de lectinas (FITC) y en rojo la interacción de rodamina con un anticuerpo anti proteína E del DENV. Aumento de LcH 10X, de SNA y ConA 40X.

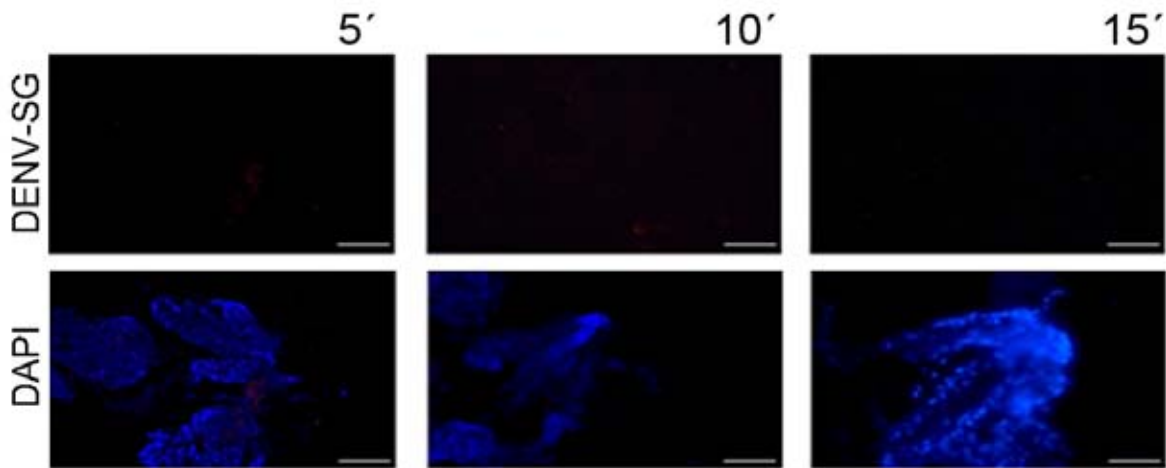


Figura 18. Se muestra las glándulas salivales pre-tratadas con neuraminidasa por A) 5 min, B) 15 min o C) 30 min antes de la adición de DENV, abajo se muestra la interacción con DENV en rojo (rodamina).

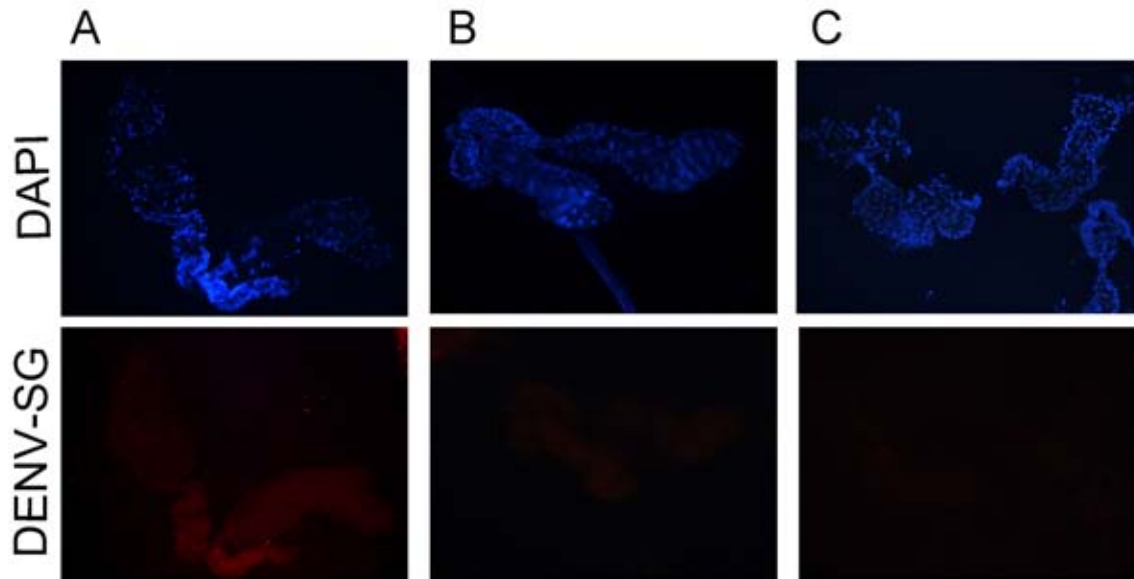


Figura 19. A) Interacción DENV-GS en ausencia de competidores. B) DENV-GS cuando el virus dengue se preincuba con fetuina. C) DENV-GS cuando el virus se preincuba ácido sialico soluble. Los nucleos en azul con DAPÍ, en rojo se muestra la interacción del DENV en la superficie de las glándulas salivales, detectada con un anticuerpo secundario acoplado a rodamina.

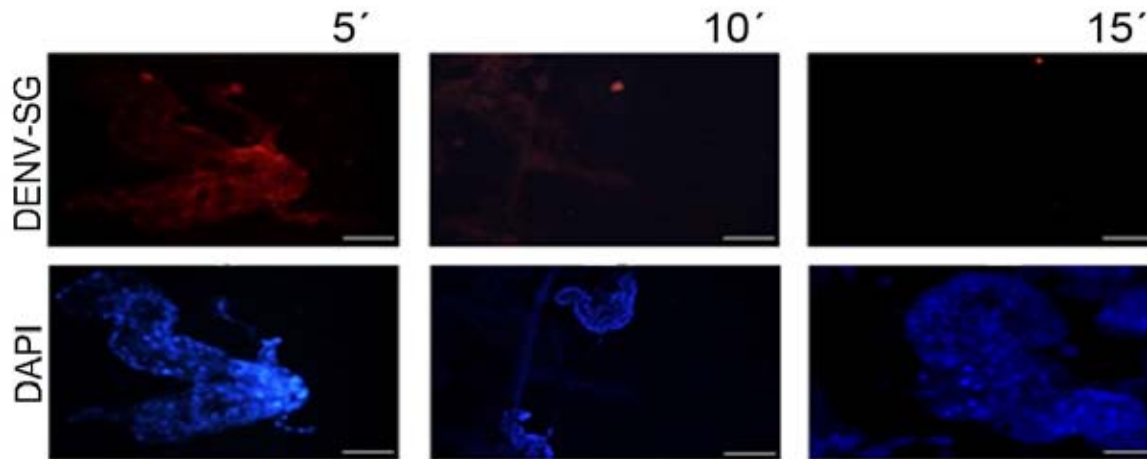


Figura 20. Se muestra las glándulas salivales de *Ae. Aegypti* pre-tratadas con tripsina por 5, 15 o 30 min antes de la adición de DENV. Los núcleos en azul, en rojo se muestra la interacción con el DENV.

### ***Identificación de glicoproteínas de unión al DENV***

Para identificar las glicoproteínas sializadas en las glándulas salivales y caracterizar la glicoproteína de unión al DENV, llevamos a cabo una electroforesis de proteínas totales del homogenado de glándulas salivales (Fig 21). Posteriormente detectamos los carbohidratos totales en este homogenado con un kit de detección de glicoproteínas, Pro Q emerald (Fig. 22 A) y se evaluó la presencia de manosas, glucosas y ácido sialico en un ensayo de western-blot, el cual se incubo con Con A y SNA (Fig. 22 y 23 respectivamente). De los ensayos control con el kit de tinción de carbohidratos pudimos apreciar que existe una gama diversa de glicoproteínas que van desde los 29 kDa hasta los 116 kDa y con mayor magnitud en las bandas en el rango de 29, 45 y 66 kDa (Fig. 22 A, línea 1). Al incubar el HGS con Con A, pudimos observar que aunado al kit de tinción de carbohidratos, existe una serie de glicoproteínas entre los 50 y 60 kDa que no se apreciaban previamente y observamos un aumento en la intensidad de la banda en el rango de 97 kDa, por lo que estas proteínas presumiblemente cuentan con residuos de manosas y glucosas (Fig. 22 B). Por otra parte se observa una disminución en la intensidad de las bandas de 29 kDa y las que se encuentran en el peso de 45 kDa por lo que presumiblemente estas glicoproteínas no tienen carbohidratos específicos para el reconocimiento de Con A.

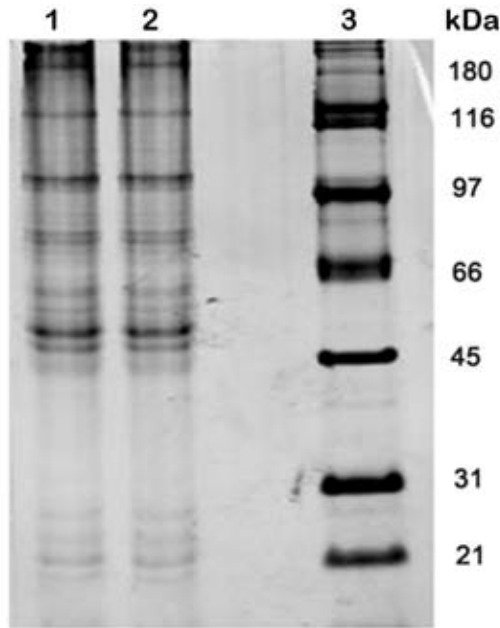


Figura 21. Se muestra el patrón de proteínas totales del HGS teñidas con Sypro Ruby en un gradiente de 4-20%.  
 Líneas 1 y 2 repetición con dos HGS, línea 3 marcador de peso molecular.

Para probar si el virus dengue se pudiera unir a una glicoproteína posiblemente sialidada, llevamos a cabo un ensayo de overlay (VOPBA; virus overlay protein binding assay), usando tanto las proteínas de las glándulas salivales como la saliva de *A. aegypti* (Fig. 23 A y B respectivamente). Al revelar la presencia del virus dengue con anticuerpos específicos para la proteína de envoltura de este, observamos que el virus se unió a diversas glicoproteínas con pesos aproximados de 115, 95, 65, 62, 51, 45, 37, 34, 32, 17, 15 y 9-10, kDa (Fig. 23 A línea 10 y 23 B línea 1).

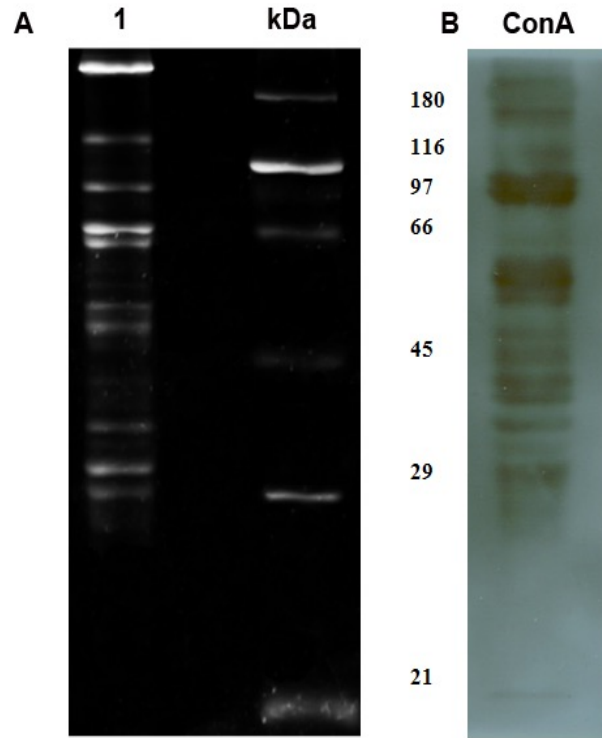


Figura 22. Detección de carbohidratos en el HGS. En el panel A se muestra los carbohidratos totales teñidos con Pro Q emerald, en la línea de la derecha se muestra el marcador de peso molecular; en B se muestran la glicoproteínas glicosiladas en residuos de manosas y glucosas en un western-blot con Con A. Geles al 12%

Las proteínas con pesos moleculares de 65 a 9 kDa también se detectaron con la lectina de reconocimiento al ácido sialico SNA (Figura 23 A línea 9). Para probar la posible participación del ácido sialico en la interacción mosquito-DENV, llevamos un ensayo VOBPA paralelo, en donde tratamos los extractos de proteínas de la glandula salival o saliva con sialidasa. Interesantemente, las proteínas de union al DENV fueron parcialmente o totalmente suprimidas (Figura 23 A línea 11, Figura 23 B línea 2). También fue interesante que las proteínas de las glandulas salivales de 95 y 65 kDa, las cuales no interactuaron con la lectina SNA (Figura 23 A línea 9) no fueron afectadas en el ensayo de VOBPA en donde se trato previamente con sialidasa (Figura 23 A línea 11). En el ensayo de union DENV-saliva, observamos una proteína con un peso aproximado de 45kDa reconocida por lectina SNA e inhibida cuando usamos sialidas en el ensayo VOBPA (Fig. 23 B). Como control positivo para el reconocimiento especifico en la interacción Sia-Lectina SNA, usamos fetuina (Fig. 23 A línea 4 y 12) así como asialofetuina y fetuina pretratada con *Clostridium perfringens* (Fig. 23 A líneas 5, 6 13 y 14).

De este modo proponemos que la interacción entre las glandulas salivales del mosquito y en virus del dengue depende de la presencia de residuos de ácido sailico.

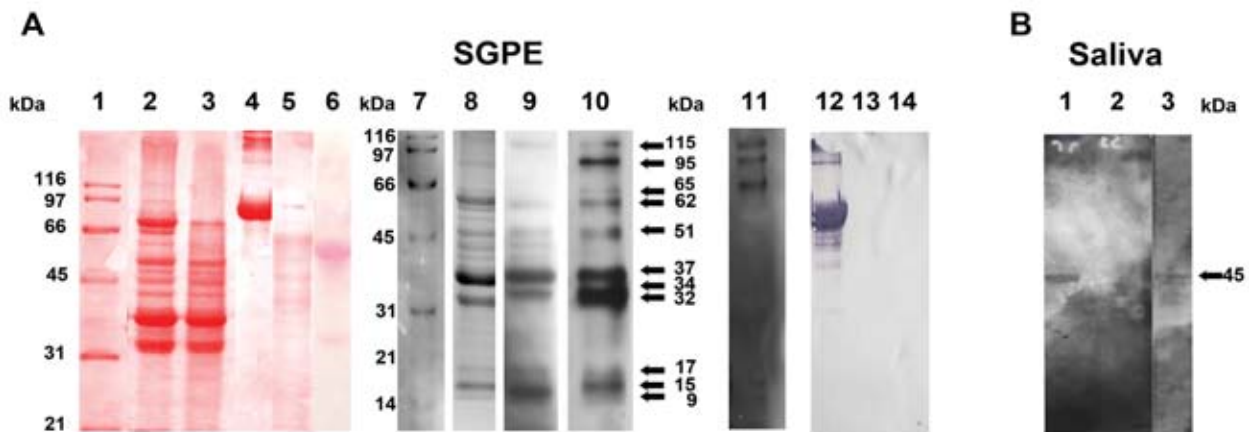


Figura 23. Ensayo de VOPBA en el HGS y saliva de *A. aegypti* en presencia y ausencia de sialidasas. **A)** líneas 1-6 membrana de nitrocelulosa teñida con rojo ponceau; línea 1 marcador de peso molecular, línea 2 HGS, línea 3 HGS pretratado con sialidasa, línea 4 fetuina, línea 5 asialofetuina, línea 6 fetuina pretratada con sialidasa, líneas 7-12 blot y overlay, línea 7 marcador de peso molecular, línea 8 HGS, línea 9 blot del HGS con lectina SNA, línea 10 virus dengue overlay con HGS, línea 11 virus dengue overlay con HGS pretratado con sialidasa, línea 12 blot de fetuina con lectina SNA, línea 13 blot de asiolofetuina con SNA, línea 14 blot de fetuina pretratada con sialidasa y revelada con lectina SNA. **B)** Interacción DENV- saliva mosquito. Línea 1 blot de la saliva del mosquito con lectina SNA, línea 2 virus dengue overlay con proteínas de saliva pretratadas con sialidasa, línea 3 virus dengue overlay con saliva de *Aedes aegypti*. La unión del DENV se detecto con un anticuerpo monoclonal específico para la proteína E del virus.

Las diferentes proteínas que tuvieron interacción al virus del dengue, presentes en el extracto de glandulas salivales, fueron identificadas por LC/ESI-MS/MS, la identidad de estas proteínas se muestra en la tabla 1, indicando el nombre de la proteína, el número de acceso al NCBI, los valores observados y esperados de los iones masas, el porcentaje de cobertura correspondiente y el valor generado por MASCOT. Las secuencias de las proteínas involucradas en la interacción con el DENV se evaluaron usando el software Glycomod el cual nos permitio determinar si las proteínas en cuestión tienen posibles residuos de ácido sialico (Apéndice I).



TABLE 1: Identificación de las proteínas del HGS y saliva de *Ae. aegypti* con interacción al DENV.

Nombre de la proteína	No. acceso NCBI	MW (kDa)		No. de péptidos con similitud	Score	cobertura (%) de la secuencia
		Gel	Database			
<b>SG protein extract</b>						
Apyrase [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 556272	62.820	62.691	14	404	19%
Salivary serpin [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 94469320	51.617	47.765	49	712	60%
D7 protein, putative [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 157113327	37.200	38.603	46	862	44%
Long form D7Bclu1 salivary protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 16225992	37.200	38.579	5	86	15%
D7 protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 159557	37.200	37.005	3	51	9%
Putative 34 kDa secreted protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 18568296	34.833	36.154	18	547	33%
Putative 34 kDa family secreted salivary protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 94468336	34.833	35.698	20	533	33%
30 kDa salivary gland allergen Aed a 3 [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 2114497	32.628	27.130	37	479	55%
Allergen, putative [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 157133926	32.628	29.529	13	216	31%
Short form D7Cclu23 salivary protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 16225995	16.947	17.676	10	150	24%
Putative salivary C-type lectin [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 94468370	16.947	17.202	5	104	17%
Putative 14.5 kDa salivary protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 94468650	14.862	17.039	6	117	40%
Protein translocation complex beta subunit, putative [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 157138304	9.397	10.329	2	75	24%
<b>Saliva</b>						
D7 Protein putative [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 157113327	45.23	39.173	18	178	35%

## ***Identificación y caracterización de la glicoproteína D7 de la saliva de Aedes aegypti***

Al observar que esta glicoproteína se une a lectinas específicas para ácido siálico, así como su interacción con el virus dengue, nos propusimos caracterizarla por medio de MALDI-ToF. De los iones masa obtenidos (Fig. 24 A) 18 de ellos se asemejaron a iones masas peptídicos de la proteína gi|157113327, (Fig. 24 B) una molécula putativa de la familia D7 de *A. aegypti* en la cual observamos un 35% de similitud en su secuencia, con un score de 178 y un valor esperado de  $6.4^{-13}$  con una  $p < 0.05$  (Fig. 22 C), por lo que estadísticamente existe evidencia significativa de que esta glicoproteína pudiera unirse al virus dengue. Los otros iones masa que no pertenecen a la secuencia de la proteína D7, pertenecen a tres diferentes proteínas putativas de *A. aegypti*, sin embargo, la homología de la secuencia, así como su nivel estadístico resultaron ser por debajo del nivel significativo (Apéndice J).

Al analizar la secuencia de la proteína putativa D7 de *A. aegypti*, se observó que en ella existe una región transmembranal a partir del residuo 7 de fenilalanina y hasta la leucina 24 (Fig. 24 D) de su extremo amino por lo que puede considerarse una proteína de membrana; aunque se ha propuesto que la familia de estas proteínas presentes en las glándulas salivales de diversos mosquitos se secretan (Arca *et al.*, 1999; 2002). Debido a esto se realizó un VOBPA en la saliva de *A. aegypti* (Fig. 23 B) y se observó la unión del DENV así como de lectina SNA a la glicoproteína de aproximadamente 45kDa por lo que nuevamente se analizó por medio de MALDI-ToF. Interesantemente encontramos dos péptidos cuyas secuencias se asemejan con la proteína D7 gi|157113327 con un score de 478 (Apéndice K panel A). La saliva del mosquito se obtuvo por un proceso cuidadoso sin daño a las glándulas salivales o contaminación de tejido. De esta manera se postula que la proteína D7 es secretada, que esta se une a las partículas virales y que esta tiene motivos de ácido siálico.

Considerando que la glicoproteína de 45 kDa se encuentra en la saliva y por lo tanto presumiblemente es secretada, analizamos su secuencia en búsqueda de indicios de secreción con el modelo de Redes neurales y el de Markov. Interesantemente encontramos, que la glicoproteína de 45 kDa contiene un péptido señal con una mayor probabilidad de corte entre los aminoácidos 21 y 22 de su secuencia (Apéndice K panel B).

A

Ions mass values		
712.270258	1045.570164	*1430.712378
*733.354291	1165.607203	1493.747918
*751.357088	*1173.573207	*1504.727682
*763.427306	1179.600942	1554.829088
*800.345774	*1186.618422	1716.864091
825.083221	*1200.617721	*1729.921800
*832.325675	1234.667622	
856.511486	*1302.605975	
870.531580	1311.630856	
*883.432429	*1320.644919	
*893.461325	1326.605443	
*1008.500337	*1349.621032	
*1039.485782	1365.666608	

B

## Mascot Search Results

### Protein view

178 for [gi|157113327](#), D7 protein, putative [*Aedes aegypti*]  
Match to: [gi|157113327](#) Score: 116 Expect: 6.4e-13  
D7 protein, putative *Aedes aegypti*

Nominal mass ( $M_r$ ): 39173; Calculated pI value: 9.32  
NCBI BLAST search of [gi|157113327](#) against nr

D

### Matched peptides shown underline

1 MFPPRKFLLS SFILAALHVT AAPLWDAKDP EQLRFITSRC MEDWYPKAKN  
51 PKAALQNWLG WKLEPSDDQA TQCYTKCVLE KIGFYEPGEK RFKGV~~VMQC~~  
101 WETFHKYLNA DREKVHDLTS TDFIPPLKS SSCSEVFEAF KKVNGKHSET  
151 IRAILFGKGE SSKYYQKEG VKIKQKEQSL FMHCEALNYP KGSPQRKDLC  
201 GIRKYQMGSG IVFERHMECI FKGLRYMTSK NELDVDEIAR DFIVVKKKPD  
251 AMKAMMKTCK ANLKEKNPGK IAVHYKCLM NDSKVTNDFK EAFDYREVRS  
301 KDYFAALTGK LKPYSRSDVR KQVDDIDKIQ CS

No	N terminal	Transmembrane region	C terminal	Type	Length
1	7	FLSSFILAALHVTAAPLWDAKD	29	PRIMARY	23

C

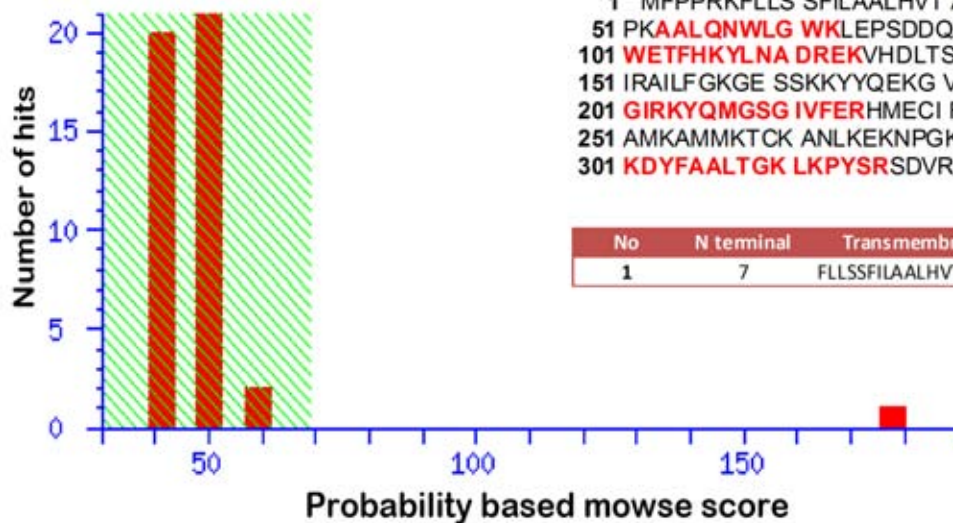


Figura 24. En el panel A se muestra los iones masa obtenidos, en asterisco se muestra aquellos valores que pertenecen a la secuencia de la proteína D7, (marcados con rojo en el panel D); En B se muestra el resultado del análisis de los iones masa en la base de dato del NCBI nr (en mascot), el resultado muestra un valor de 116 y  $6.4 \times 10^{-13}$  con una probabilidad  $< 0.05$  de que la molécula analizada por MALDI ToF pertenece a la proteína gi|157113327 (putativa D7) de *A. aegypti*; En C se muestra la gráfica de probabilidad y significancia del análisis de la secuencia; Finalmente en D se muestra la secuencia de la proteína D7 así como una posible región transmembranal.

A partir de la secuencia de D7 se pudo observar que existen posibles sitios de N-glicosilación en la posición 278-284 de esta proteína (Tabla 2 A), con dos posibles combinaciones de carbohidratos que implican la presencia de ácido siálico; en la primera combinado con una hexosa y la segunda con el ácido siálico en presencia de N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina.

Los posibles sitios de O-glicosilación son más diversos (Tabla 2 B), por lo que únicamente nos enfocamos en aquellos en los cuales se involucra la presencia de ácido siálico, algunos de ellos tienen una menor diferencia entre la masa iónica obtenida por medio del MALD-ToF (masa experimental), la masa teórica del glicopéptido y la masa del carbohidrato, por lo que solo consideramos una diferencia menor a 0.05 daltones. En la proteína D7 existen tres regiones péptidicas que cuentan con dichas características, entre los residuos 35-39 se encuentran dos posibles combinaciones de O-glicosilación ligadas por medio de los grupos hidroxilo de serina y treonina de dicha región; la primera combinación liga la presencia de ácido siálico a 2 moléculas de N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina y la segunda probabilidad de la región 35-39 tiene una combinación de hexosa, Neu Ac y un ácido ketodeoxynonulosónico (KDN). El segundo péptido con posibilidades de estar O-glicosilado se encuentra en la región 285-290, en el cual por medio de un residuo de treonina pudiera ligarse una pentosa, N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina y el residuo de ácido siálico. Por último existe una región con un residuo de serina entre los aminoácidos 311-316 con una diferencia de tan solo 0.019 daltones entre la masa experimental y su masa teórica por lo que existe posibilidad de que en esta región se encuentre la presencia de un residuo de Sia ligado a una deoxyhexosa.

A

Glycoform mass	$\Delta$ mass (Dalton)	Structure	Peptide mass [M]	Peptide sequence	Theoretical glycopeptide mass
<b>510.17</b>	0.126	(HexNAc) <sub>1</sub> (NeuGc) <sub>1</sub>	809.341	278-284 CLM <b>N</b> DSK	1320.518
<b>453.148</b>	0.127	(Hex) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	866.363	278-284 CLM <b>N</b> DSK	1320.518
<b>494.175</b>	0.127	(HexNAc) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	825.336	278-284 CLM <b>N</b> DSK	1320.518

B

Glycoform mass	$\Delta$ mass (Dalton)	Structure	Peptide mass [M]	Peptide sequence	Theoretical glycopeptide mass
697.254	0.04	(HexNAc) <sub>2</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	622.344	35-39 FITSR	1320.605
703.217	0.037	(Hex) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (KDN) <sub>1</sub>	622.344	35-39 FITSR	1326.568
626.217	0.037	(HexNAc) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>1</sub>	722.36	285-290 VTNDFK	1349.584
437.153	0.019	(Deoxyhexose) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	762.439	311-316 LKPYSR	1200.599

Tabla 2. Determinación de potenciales sitios de glicosilación de D7. Se estimó teóricamente los putativos sitios de glicosilación, son sus posibles uniones a carbohidratos (marcados en rojo) junto con su posible estructura glicosídica. En A se muestra los potenciales sitios de N glicosilación; en B se muestran los potenciales sitios de glicosilación con la combinación de carbohidratos que involucran ácido siálico. Hex: Hexosa; NAc: N acetilglucosamina; NeuAc: ácido siálico; NeuGc: ácido N-glicolilneuraminico; KDN: ácido ketodeoxi nonulosónico; Pent: pentosa.

### ***Infección viral de células de mamífero en presencia de Homogenado de Glándulas salivales de Aedes aegypti***

Debido a que una de las proteínas que se observó con interacción al virus dengue, se secreta en la saliva durante el proceso de ingesta sanguínea del mosquito, se probó la posible participación del sialoma en la modulación de la infección viral en células LLCMK2 y CHO Wt. El porcentaje de internalización viral en dichas líneas celulares se evaluó en ausencia y presencia de un extracto salival de *A. aegypti*. Se observó un aumento en la infección viral en ambas líneas celulares (Fig. 25 A) y que este aumento en la internalización del DENV depende del tiempo de incubación del extracto salival con el virus previo a la infección celular (Fig. 25 B). Así mismo, el aumento en la infección viral resultó ser dependiente de la dosis administrada de la concentración proteica (pares de glándulas salivales) del extracto de glándulas de *A. aegypti* (Fig. 25 C).

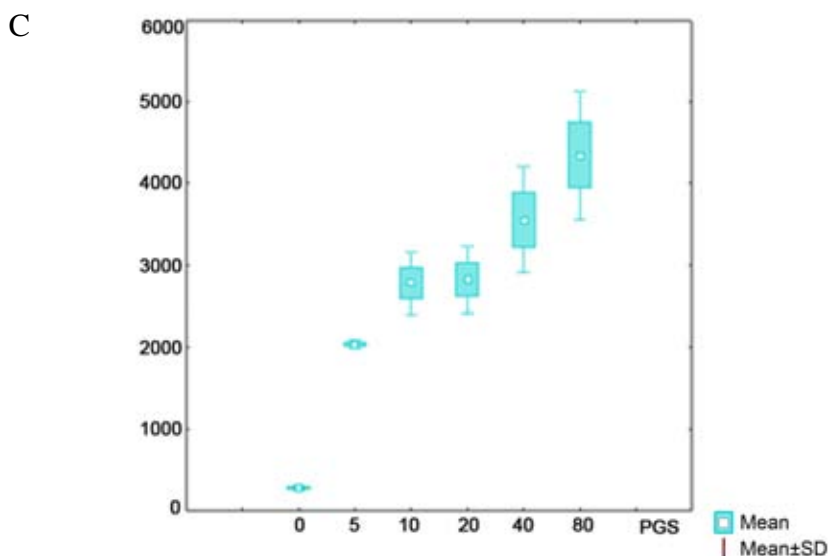
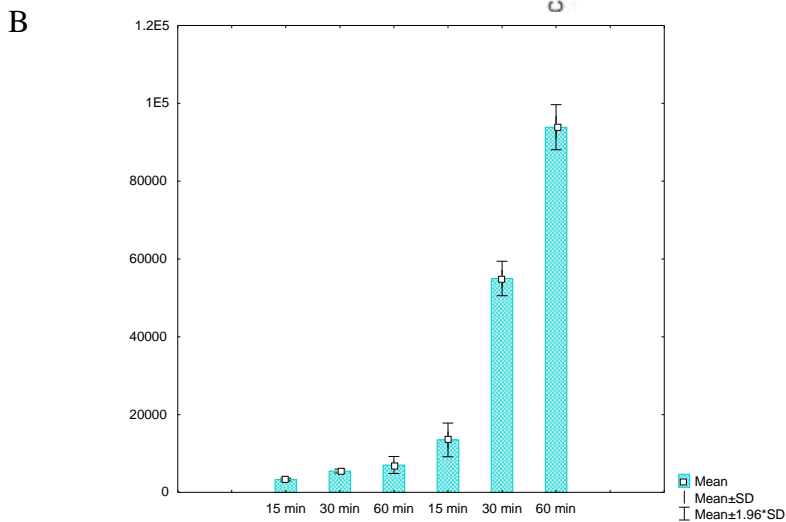
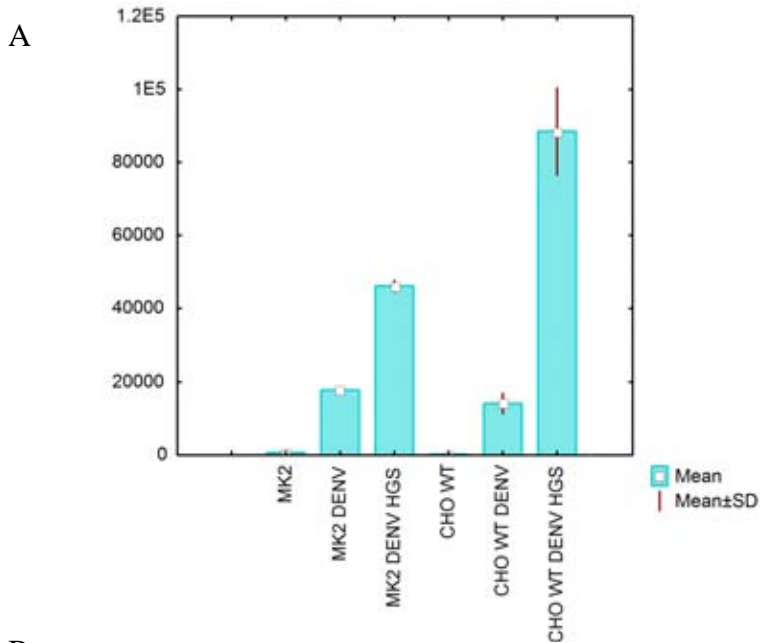


Figura 25. Aumento de internalización viral en presencia de extracto de glándulas salivales de *A. aegypti*. En **A** se muestra el porcentaje de internalización (en cpm) del DENV en ausencia y presencia de extracto de glándulas salivales. El número de partículas virales que se internalizó se midió por medio del marcaje metabólico de virus dengue a los 60 minutos post infección en células LLC MK2 y CHO Wt. En **B** se muestra las cpm de virus que se internalizó en células CHO con incubaciones de 60 minutos de DENV con extracto salival previos a la infección celular. La internalización de DENV se tomó a los 15, 30 60 min en células MK2 y CHO. En **C** se muestra el nivel de internalización en células CHO a los 5 minutos posteriores a la infección viral con diferentes dosis equivalentes a pares de glándulas salivales de *A. aegypti*. Se muestra la SD y media de los valores obtenidos con una diferencia  $p < 0.05$  usando la U Mann-Whitney.

Debido a que el extracto del homogenado de glándulas salivales tiene repercusiones en la exacerbación de la infección viral en líneas celulares de mamífero y que la unión del virus a las glándulas salivales es presumiblemente dependiente de ácido sialico, entonces probamos el efecto potenciador de la infección viral del extracto salival, en presencia y ausencia de sialidasas de *C perfringens* (Fig. 26 línea D y H). Interessantemente el incremento de la internalización viral en ambas líneas celulares en presencia de HGS se vio disminuido cuando estas fueron tratadas con sialidasa, similarmente a los ensayos de infección en incubaciones sin presencia del HGS (Fig. 26 línea B y F) y es mucho menor a la exacerbación viral producida por el HGS sin tratamiento con sialidasa (Fig. 26 línea C y G).

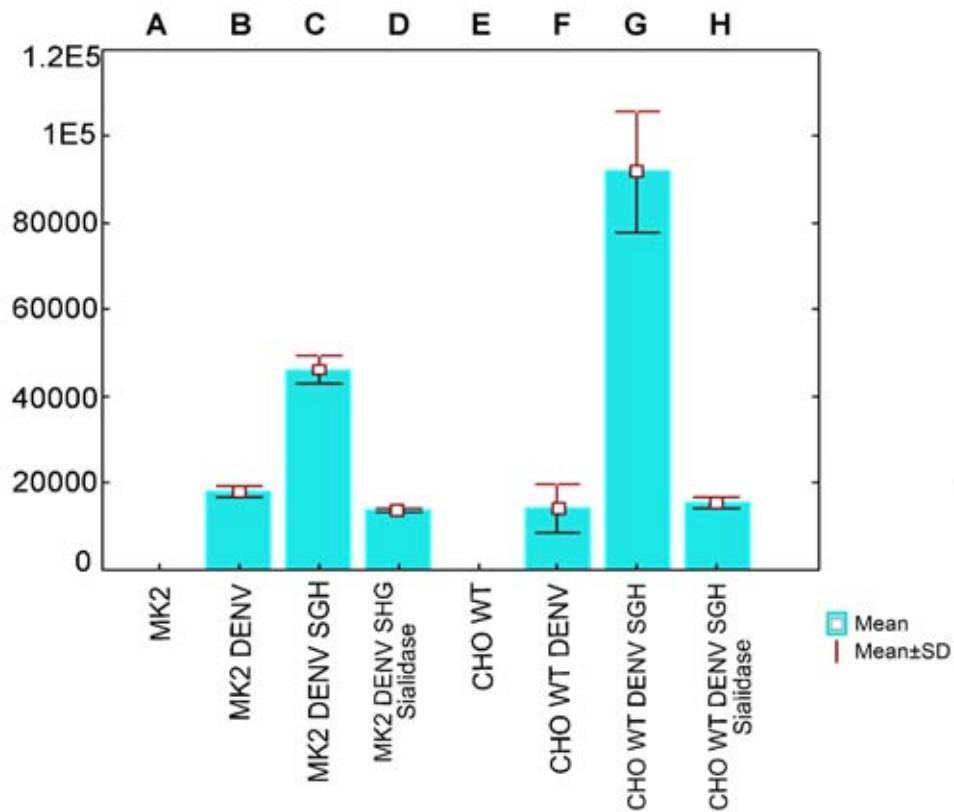


Figura 26. Internalización viral en células MK2 y CHO en presencia o ausencia de HGS tratadas o no con Sialidasa. En A- se muestran las células MK2 no infectadas con virus dengue. B- son células MK2 infectadas con virus dengue. C- MK2 infectadas con una mezcla de virus dengue-extracto salival. D- células MK2 infectadas con virus dengue-extracto salival previamente tratado con sialidasa. E- células CHO no infectadas con virus dengue. F- células CHO infectadas con virus dengue. G- CHO infectadas con una mezcla de virus dengue-extracto salival. H- células CHO infectadas con virus dengue-extracto salival previamente tratado con sialidasa.

## DISCUSION

La transmisión de microorganismos patógenos a sus hospederos a través de vectores, involucra la interacción específica en ciertos tejidos del vector (Brennan *et al* 2000; Korochkina *et al*, 2006; Hillyer *et al*, 2007); específicamente en los mosquitos se conoce que el estomago y las glándulas salivales son importantes para inocular los parásitos. Para que el virus del dengue sea transmitido, éste debe replicarse en las células epiteliales del estomago, diseminarse a su hemocele, y finalmente infectar las glándulas salivales del mosquito (Salazar *et al*, 2007).

Las interacciones tempranas de reconocimiento entre el mosquito vector y el DENV es un determinante crítico tanto para la replicación como la patogenicidad viral (Cologna *et al*, 2003). La proteína de envoltura (E) del virus del dengue, participa en la interacción receptor célula-hospedero y es conocida como la proteína viral de reconocimiento. En estudios previos se ha observado que los glicosamino glicanos y en particular el heparán sulfato, es de gran importancia para el reconocimiento del DENV en un numero diverso de células de mamífero (Vero, CHO y células hepáticas humanas, Chen *et al*, 1997), por lo que se ha propuesto que el heparan sulfato funcione como coreceptor, concentrando al virus en la superficie membranal y facilitando de este modo la interacción del virus con un segundo receptor de alta afinidad.

Sin embargo, se desconoce la posible participación que los carbohidratos pudieran tener en el reconocimiento viral en el mosquito vector. Interesantemente, en este trabajo se caracterizó la presencia de ácido siálico en estómagos y glándulas salivales del mosquito vector del DENV. A pesar de que se han revelado importantes funciones para la sialidación en procariontes y animales superiores, se conoce poco de la sialidación en protostomados, por lo que existe la incertidumbre de que estos organismos posean la maquinaria de síntesis para producir estructuras sialidadas.

En este estudio se caracterizo las principales moléculas involucradas en la vía de síntesis de ácido siálico en *A. aegypti*. Observamos que las secuencias putativas de proteínas involucradas en la generación de este carbohidrato están presentes en este mosquito, por lo que se clonó, expresó y probó su actividad funcional. Se encontro la maquinaria de síntesis en tejidos en los que también se observó la presencia de ácido siálico (por inmunohistoquímica) e interesantemente la sialiltransferasa no está



presente en mosquitos machos, lo que nos sugiere que la especificidad y función de este carbohidrato en las hembras de *A. aegypti* esta implicada en la alimentación sanguínea.

Se sabe que diversos virus, reconocen residuos de ácido siálico para la interacción con receptores en la superficie de distintas líneas celulares (ver Apéndice A).

Este carbohidrato es abundantemente expresado en glicoproteínas secretadas, en la superficie celular y en la matriz extracelular. Puede encontrarse de forma libre, pero generalmente esta glicosidicamente ligado al grupo  $\alpha 3$  o  $\alpha 6$  hidroxil de los residuos de galactosa (Gal) o al grupo  $\alpha 6$  hidroxil de N-acetilglucosamina (GlcNAc). La diversidad en la estructura del NeuAc refleja su participación en una variedad de procesos biológicamente importantes, muchos de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas tales como carga y tamaño (Lehman *et al*, 2006). Estas mismas propiedades del Sia facilitan el reconocimiento de diversos virus (Angata & Varki 2002), y su especificidad  $\alpha 2,3$  o  $\alpha 2,6$  delimita el tropismo celular o inclusive el huésped. Los virus asociados a adeno del serotipo 4 y 5 (AAV4 y AAV5) tienen diferentes objetivos celulares. AAV5 requiere la composición  $\alpha 2,3$  del Sia N-glicanos para que lo reconozca, mientras que la unión de AAV4 se da a partir de residuos  $\alpha 2,3$  O-glicanos (Kaludov *et al*, 2001). La hemaglutinina del virus de la influenza humana del serotipo A predominantemente se une a estructuras Neu5Ac $\alpha 2,6$  Gal, las cuales están presentes en células no ciliadas de la tráquea humana (Suzuki *et al*, 2000), mientras que el virus de influenza aviar se une específicamente a Neu5Ac $\alpha 2,3$  Gal (Glaser *et al*, 2006). Esta especificidad de unión a residuos de ácido siálico limita tanto el tropismo como el huésped (Matrosovich *et al*, 2004).

En la superficie de las glándulas salivales, nosotros observamos que los residuos de ácido siálico son específicos en su conformación  $\alpha 2,6$  ya que MAA (la cual reconoce residuos  $\alpha 2,3$ ) no se adhiere a la superficie de las glándulas salivales y no bloquea la interacción del virus en este tejido. Por lo que la interacción virus-GS es dependiente únicamente de la conformación NeuAc  $\alpha 2,6$ , lo cual pudiera explicar la especificidad a ciertos mosquitos si es que algunos tienen únicamente estos motivos o carecen de ácido siálico y de este modo restringir al DENV a ciertos vectores, tal como sucede al delimitar el huésped en el virus de influenza aviar y humana.

La hemaglutinina del virus de la influenza (Weis, 1988), la proteína VP1 de poliomavirus (Stehle & Harrison, 1997) y el dominio de unión a ácido siálico de la proteína Vp4 de rotavirus (Dormitzer *et al*,

2002) son proteínas virales que reconocen motivos de ácido siálico. En los adenovirus (los cuales también tienen motivos específicos de unión al HS), el dominio Knob de la proteína fibra tiene regiones específicas de interacción con el Sia (Burmeister *et al*, 2004), se sabe que esta unión es sensible a un incremento en la fuerza iónica y que las moléculas cargadas negativamente como glicosaminoglicanos sulfatados inhiben la interacción del virus a las células en una manera no específica dependiente de carga (Arnberg *et al*, 2002). Este tipo de inhibición se presenta en la unión del virus dengue en diferentes líneas celulares al usar diferentes glicosaminoglicanos (Marks *et al*, 2001; Lin *et al*, 2002). Aunque se sabe que el virus dengue tiene motivos de interacción con heparan sulfato, hasta la fecha no se le han caracterizado sitios de reconocimiento al ácido siálico, aunque presumiblemente el virus dengue cuenta con actividad de hemaglutinina (Inouye *et al*, 1977) por lo que no se descarta la posibilidad de que tenga sitios de interacción a heparan sulfato así como a ácido siálico, como en el caso de adenovirus. Thaisomboonsuk *et al*, 2005, reportaron que los residuos de ácido siálico son importantes para el reconocimiento del virus dengue en células Vero y LLC-MK2, pero no en células provenientes de mosquitos (C6/36 y AP61), y sugieren que los receptores en las líneas celulares de insectos son diferentes a los propuestos para líneas de mamífero. Se sabe que las líneas celulares de mosquitos carecen de sialil transferasas (Stollar, 1987, Marchal *et al*, 2001), sin embargo también se conoce que estas células provienen de un triturado de larvas, por lo cual nosotros inferimos no cuentan con la expresión de ácido siálico como el mosquito adulto.

Anteriormente se demostró la presencia de  $\alpha$  manosa,  $\alpha$ -D-N acetil galactosamina,  $\beta$ -D gal-(1,3) N acetil, galactosamina,  $\beta$ -D galactosa y N acetil glucosamina en las glándulas salivales de *A. aegypti* y se observó que la lamina basal de estas poseen una carga negativa neta (Perrone *et al*, 1986) lo cual favorecería la interacción del virus dengue en este tejido, tal como sucede en células hepáticas humanas, CHO y Vero en donde el DENV interacciona con moléculas de heparan sulfato (Chen *et al*, 1997).

Por otra parte se observó que WGA, la cual se une a residuos de N acetil glucosamina, bloquea la interacción con esporozoitos de *plasmodium gallinaceum* en la superficie de las glándulas salivales (Barreau *et al*, 1995). WGA es una lectina de *Triticum vulgare*, la cual reconoce específicamente residuos de N acetil glucosamina, sin embargo tiene regiones de interacción con residuos de ácido siálico. Hasta hace algunos años se desconocía la presencia de NeuAc en invertebrados, por lo que en

su momento no se consideró la posible participación de este en la interacción con esporozoitos de *plasmodium*. Interesantemente Zieler *et al* (1999), encontraron que los oocinetos de *Plasmodium gallinaceum*, se adieren al epitelio del estómago de *A. aegypti* a través de la interacción con un carbohidrato, presumiblemente ácido siálico, a pesar de que en ese estudio se trató de caracterizar la presencia de ácido sialico por medio de HPLC y electrospray en estómagos de *A. aegypti*, los resultados revelaron que no había presencia de ácido siálico. Aunado a eso aun no se describía la maquinaria de síntesis de ácido siálico en *D. melanogaster*, por lo que se descarto que la interacción de los oocinetos se lleve a cabo a partir de la unión con este carbohidrato. En nuestro estudio se usaron otros métodos igualmente sensibles para la identificación de ácido siálico (HPLC y CG,). A pesar de su baja concentración en glándulas salivales y estómagos podemos afirmar que este carbohidrato esta presente y es sintetizado *de novo* por el mosquito *A. aegypti*, como se probo con la función activa de CMP-sintasa. Estos datos concuerdan con lo que se ha descrito en *D. melanogaster* en donde se identificó la presencia y función de una CMP-ácido siálico síntetasa (Viswanathan *et al*, 2006) y una  $\alpha$  2,6 sialil transferasa (SiaT; Koles *et al*, 2004).

En este trabajo identificamos una glicoproteína de la familia D7, la cual se encuentra sialidada en su conformación  $\alpha$  2,6 y presumiblemente su presencia es importante para la unión del DENV, como se demostró con los ensayos de competencia y al utilizar sialidasa, con lo que se acentúa la importancia de los carbohidratos en la interacción viral.

El análisis de la secuencia de esta proteína nos permitió observar diversos sitios de glicosilación que incluyen la presencia de NeuAc, unidos a otro tipo de carbohidratos que pudieran incluir hexosas y pentosas entre otros, así como un probable sitio transmembranal lo cual la ubica en la superficie de las glándulas salivales. Esta proteína tiene un peso aproximado de 39 kDa, sin embargo nosotros la observamos en el rango de 45kDa, probablemente esta diferencia se deba a su conformación glicoproteíca, la cual no se había contemplado con anterioridad.

La función de la familia (moléculas pequeñas y grandes según su transcripto, Valenzuela *et al*, 2002a; Ribeiro *et al*, 2007) de las proteínas D7 ha sido un trabajo arduo durante años, ya que a pesar de ser en conjunto las proteínas más abundantes en las glándulas salivales de los mosquitos (James *et al*, 1991; Francischetti *et al*, 2002; Valenzuela *et al*, 2002b; Ribeiro *et al*, 2004) su función se desconocida y se

postulaba que pudieran funcionar como moléculas de unión o acarreadores de pequeños ligandos hidrofóbicos; implicadas en la ingesta de sangre ya que se encuentran presentes únicamente en las hembras y son inyectadas por el mosquito al hospedero con la saliva durante la alimentación. Calvo *et al*, 2006, describió que la familia de proteínas D7 son acarreadoras de aminas biogénicas (norepinefrina, histamina y serotonina) permitiendo a las hembras de *A. aegypti* alimentarse exitosamente. La presencia en grandes cantidades de estas proteínas en la saliva secretada de estos mosquitos (Arca *et al*, 2002, Almera *et al*, 2009), así como su función como acarreadoras de ligandos, las hacen posibles moléculas transportadoras de ciertos patógenos.

Se ha observado que la saliva de diferentes vectores aumenta la transmisión de patógenos como Leishmania o Virus de Cache Valley (Titus & Ribeiro 1988; Kamhawi *et al*, 2000; Edwards *et al*, 1998). Con base a la función de las proteínas D7 así como su secreción por las hembras hematófagas al ingerir alimento, nosotros proponemos que esta proteína puede servir como una molécula de anclaje a partir de sus residuos de ácido siálico y posteriormente funcionar como una molécula acarreadora del virus dengue al ser inoculado al hospedero mamífero, junto con la saliva que inyecta el mosquito al alimentarse, tal como se ha propuesto con anterioridad para el sialoma de otros vectores (Samuelson *et al*, 1991; Labuda *et al*, 1993; Bowman *et al*, 1997; Valenzuela 2002c; Limesand *et al*, 2003; Nutall & Labuda 2004; Schneider & Higgs 2008). Para probar esta hipótesis se realizó un ensayo de internalización viral en presencia y ausencia de extracto de glándulas salivales. Los resultados reflejan que existe un aumento en la internalización del DENV dependiente del tiempo de interacción virus-HGS, tiempo de inoculación, así como de la dosis de extracto salival (Fig. 25) y en la presencia de ácido siálico ya que al tratar el HGS con sialidasa la potenciación en la infección viral en las líneas celulares disminuye considerablemente. Por lo que presumiblemente la interacción de las partículas virales con la glicoproteína D7 y en particular la interacción con residuos de ácido siálico, le confieren al virus una mayor adaptación en el proceso infeccioso.

Sí la saliva de los artrópodos es importante en el proceso infeccioso. El aislamiento de inmunosupresores para la realización de anticuerpos pudiera neutralizar su actividad, o proteínas específicas de la saliva de los vectores que generan fuerte respuesta celular pudieran disminuir los patógenos que transmiten.

Los intentos por lograr esta supresión en la infección se han empezado a llevar a cabo; Valenzuela y col (2001a) aislaron los genes de la proteína PpSp15 de *Phlebotomus papatsi*, y observaron que animales inmunizados con esta proteína se protegen a la infección producida por *Leishmania major* (el patógeno transmitido por *P papatsi*) cuando se retaban con saliva y el parásito. Así mismo, los animales vacunados con PpSp15 generaron una respuesta celular al homogenado de las glándulas salivales y piquetes de *P papatsi*, sin embargo no produjeron anticuerpos, aunque no se infectaron con *L major*.

Estos datos sugieren que una respuesta celular a proteínas de la saliva es suficiente para la protección a la infección de *Leishmania*. De manera similar se pudiera realizar retos inmunizados con anticuerpos anti glicoproteínas sializadas de *A. aegypti* y medir los efectos en los procesos infecciosos en células y ratones retados con dengue virus.

Por último, en las líneas celulares de insectos en las que se han estudiado la interacción con el DENV, se ha encontrado un posible receptor glicoproteínico de 40 y 45 kDa, que reconoce a la proteína E del virus del dengue (Salas-Benito & del Ángel, 1997). Mendoza y col 2005, observaron nuevamente la glicoproteína de 45 kDa en esta línea celular, la cual al tratar con periodato de sodio tiene un peso de 38 kDa y al generar anticuerpos contra ella se bloquea la unión del virus dengue en diferentes tejidos del mosquito, sin embargo no se ha logrado caracterizar esta proteína. Mercado-Curiel *et al*, (2006 y 2008) observaron en el estomago de *A. aegypti*, dos proteínas de 80 y 67 kDa que interactúan con el DENV, no obstante hasta el momento no se han caracterizado. Cao-Lormeau, 2009, ha descrito putativas moléculas de reconocimiento al DENV en las glándulas salivales de *A. aegypti*, en la cual se describen proteínas de 77, 58, 54 y 37 kDa, todas ellas aun no caracterizadas, algunos de estos pesos moleculares coinciden con nuestras proteínas encontradas en nuestro ensayo VOBPA, Sin embargo, los métodos empleados en ese estudio varían considerablemente al nuestro, las condiciones astringentes de lavado antes de la incubación con anticuerpo anti proteína E-DENV no existen en el trabajo de Cao-Lormeau y son totalmente diferentes a los protocolos que se usó en nuestro estudio. Sin embargo, cabe la posibilidad que en diferentes condiciones se puedan observar otras proteínas de unión.

En nuestro trabajo la proteína D7 que interactúa con el virus dengue pesa aproximadamente 45 kDa presumiblemente en su forma glicoproteínica ya que el peso de su secuencia peptídica es de 39 kDa aproximadamente. Sin embargo, no podemos afirmar que se trate de la misma proteína observada con

anterioridad por Mendoza y Salas (pero pudiera ser la misma de 37 kDa identificada por Cao-lemau), ya que la familia de las proteínas D7 únicamente se encuentran presente en las glándulas salivales, por lo que posiblemente la molécula que nosotros identificamos se trate de una glicoproteína que bien, únicamente pudiera unir al virus y transportarlo, por lo que no descartamos que las otras moléculas que interaccionan con el DENV tanto en estómagos como en glándulas salivales pudieran ser parte de un complejo proteico que internalice al virus dengue en tejidos de *A. aegypti*. Las principales proteínas de saliva de diferentes cepas de *A. aegypti* presentan ligeras diferencias en la expresión, interesantemente las proteínas D7 se presentan en diferentes pesos moleculares, por lo que se menciona que posibles modificaciones postraduccionales pudieran ser las responsables de dichas variaciones en el peso molecular (Almeras *et al* 2009). Nosotros observamos que la proteína de 45 kDa secretada en saliva se une al virus dengue y contiene sitios de unión a lectina SNA, por lo que se encuentra sialidada en una conformación  $\alpha$  2,6 y presumiblemente pertenece a la familia de proteínas D7 como se corroboró por análisis de MALDI-ToF, por lo que esta proteína pudiera ser secretada aunado al análisis de secuencia y la presencia de un péptido señal en su secuencia peptídica. Sería completamente relevante si se pudiera caracterizar el resto de la cadena de carbohidratos y conocer si esta genera mayores sitios de interacción al virus dengue, confiriendo mayor afinidad y/o tropismo en el mosquito vector.

Cabe señalar que en el estomago y en las glándulas salivales se han caracterizado diferentes barreras de infección y escape de patógenos (Black *et al*, 2002; Bennett *et al*, 2005; Mercado-Curiel *et al*, 2008), por lo que no es difícil de considerar a estos órganos como entidades molecularmente diferentes, y cabe la posibilidad de que los receptores no sean los mismos en ambos tejidos, sin embargo la presencia de ácido siálico existe en ambos órganos, por lo que la región glicosídica de la proteína puede estar llevando a cabo una función importante al reconocimiento del virus dengue, y la región proteica variar de cierta forma.

Las mismas barreras de infección, posiblemente limitan el tropismo en diferente especies de mosquitos (*Culex* sp, *Anopheles* sp) que naturalmente no se infectan con virus dengue, de igual manera es de interés analizar si el grado de ácido siálico varia entre especies refractantes a la infección por DENV, o si existe una diferencia en la conformación  $\alpha$  2,6 o  $\alpha$  2,3 que delimite el reconocimiento e interacción del DENV en las glándulas salivales de estas especies o cepas de mosquitos.

## CONCLUSIONES

Con base al desconocimiento de la presencia de ácido sialico en organismos protostomados, en este trabajo se describe por primera vez la presencia de ácido siálico en mosquitos, junto con la caracterización y demostración funcional de la maquinaria de síntesis de este carbohidrato.

En el presente trabajo encontramos y caracterizamos por primera vez diversas moléculas con motivos de ácido sialico capaces de interactuar con el virus del dengue, observamos que algunas de estas moléculas son secretadas junto con la saliva de *A. Aegypti*. De igual manera observamos que en células de mamífero infectadas con virus dengue en presencia de un extracto de glándulas salivales, el porcentaje de infección se ve favorecido y que este disminuye considerablemente cuando se tratan las muestras con sialidasa. Así mismo, encontramos que los residuos de ácido siálico de las diversas proteínas que interactúan con el virus dengue, son de gran relevancia para la interacción virus-vector en las glándulas salivales y que la interacción depende de motivos  $\alpha$  2,6, sin embargo esta interacción no se ve únicamente en este tejido ya que estos hallazgos también incluyen estómagos del vector. Cabe señalar que la interacción del DENV con sialoglicoproteínas de saliva puede servir de vehículo de transporte al virus al transmitirse al hospedero humano haciendo más eficiente la infección de la célula huésped.

## PERSPECTIVAS

La presencia de ácido sialico como moléculas de reconocimiento al virus dengue, brinda una serie de expectativas que pudieran llevarse a cabo trabajos posteriores. Como ya se comento, seria interesante evaluar si los residuos sializados se presentan en mosquitos refractantes a la transmisión del dengue virus. De igual forma, será importante analizar sí las moléculas caracterizadas previamente en estómagos de *A. aegypti* tienen sitios putativos de ácido siálico y sí carbohidratos aledaños en la cadena de azúcares son importante para el reconocimiento viral. Con base en que se conoce la secuencia nucleotida de las enzimas involucradas en la síntesis de ácido sialico, seria importante poder bloquear esta vía y observar el porcentaje de unión viral en tejidos de *A. aegypti*.

Por otra parte sabemos que la proteína D7 tambien tiene un papel importante en el reconocimiento viral, por lo que se pudieran generar anticuerpos en contra de esta proteína y elucidar la respuesta de infección en modelos celulares, en presencia y ausencia de extracto de glándulas salivales.

Finalmente el caracterizar en las particula virales los sitios de reconocimiento al ácido siálico (dominio de hemaglutinación funcional), pudiera ser relevante para intentar bloquear la interacción viral. Presumiblemente, la secuencia líneal del virus dengue no muestre dominios de hemaglutinina evidentes por lo que la función se deba a la conformación tridimensional, por lo tanto hacer modelos estructurales de interacción DENV-ácido siálico pudiera elucidar dichos sitios.



## REFERENCIAS

- Alexander, N., Balmaseda, A., Coelho, I. C., *et al* (2011) Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health* **16**: 936-48.
- Almeras, L., Orlandi-Pradines, E., Fontaine, A., Villard, C., Boucomont, L., Denis de Senneville, L., Baragatti, M., Pascual, A., Pradines, B., Corre-Catelin, N., Pages, F., Reiter, P., Rogier, C., and Fusai, T. (2008) Sialome individuality between *Aedes aegypti* colonies. *Vector borne zoonotic dis* **9**: 531-41
- Almeras, L., Fontaine, A., Belghazi, M., Bourdon, S., Boucomont-Chapeaublanc, E., Orlandi-Pradines, E., L., Baragatti, M., Corre-Catelin, Reiter, P., Pradines, B., Fusai, T., and Rogier, C. (2009) Salivary gland protein repertorie form *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector borne zoonotic dis* **10**: 391-402
- Allison, S., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C.W. and Heinz, F. (2001) Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J virol* **21**: 11357-66
- Anderson, J., and Rico-Hesse, R. (2006) *Aedes aegypti* capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* **75**: 886-92
- Angata, T., and Varki, A. (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* **102**: 439-469
- Arca, B., Lombardo, F., Capurro, M., della Torre, A., Dimopoulos, G., James, A.A., and Coluzzi, M. (1999) Trapping cDNAs encoding secreted proteins from the salivary glands of malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1516-1521
- Arca, B., Lombardo, F., Lanfrancotti, A., Spanos, L., Veneri, M., Louis, C., and Coluzzi, M. (2002) A cluster of four D7-related genes is expressed in the salivary glands of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* **11**: 47-55
- Arnberg, N., Kidd, A.H., Edlund, K., Nilsson, J., Pring-Akerblom, P., and Wadell, G. (2002) Adenovirus type 37 binds to cell surface sialic acid through a charge-dependent interaction. *Virology* **302**: 33-43
- Avirutnan, P., Malasit, P., Seliger, B., Bhakdi, S., and Husmann, M. (1998) Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol* **11**: 6338-46
- Bandyopadhyay, S., Lum, L.C., and Kroeger, A. (2006) Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health* **8**: 1238-55
- Barniol, J., Gaczkowski, R., Barbato, E.V., *et al* (2011) Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC Infect Dis* **11**:106
- Basu, A., and Chatuverdi, U.C. (2008) Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**: 287-99
- Bhatt, S., Gething, P., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J., and Hay, S.S. (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**: 504-507

- Barreau, C., Touray, M., Pimenta, P.F., Miller, L.H., and Vernick, K.D. (1995) *Plasmodium gallinaceum*: sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary glands is inhibited by anti-gland and by lectins. *Exp Parasitol* **81**:332-343
- Bennett, K. E., Beaty, B. J., and Black IV, C. W. (2005) Selection of D2S3, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Strain with high oral susceptibility to Dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to Dengue 2 escape. *J Med. Entomol* **42**: 110-119
- Beerntsen, B.T., Champagne, D.E., Coleman, J.L., Campos, Y.A., and James, A.A. (1999) Characterization of the sialokinin I gene encoding the salivary vasodilator of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* **8**: 459-467
- Biefeldt-Ohmann, H., Meyer, M., Fitzpatrick, D.R., and Mackenzie, J.S. (2001) Dengue viruses binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res* **73**: 81-89
- Brennan, J.D.G., Kent, M., Dhar, R., Fujioka, H., and Kumar, N. (2000) Anopheles gambiae salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13859-13864
- Black, W.C 4th., Bennett, K.E., Gorrochotegui-Escalante, N., Barilas-Mury, C.V., Fernandez-Salas, I., Muñoz, Mdell., et al (2002) Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch Med Res* **33**: 379-388
- Bumersteir, W.P., Guilligay, D., Cusak, S., Wadell, G., and Arnberg, N. (2004) Crystal structure of species D adenovirus fiber. *J Virol* **78**: 7727-7736
- Bowman, A.S., Coons, L.B., Needham, G.R., and Sauters, J.R. (1997) Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Med Vet Entomol* **11**: 277-285
- Cabrera-Hernandez, A., and Smith, D.R. (2005) Mammalian dengue virus receptors. *Dengue Bulletin* **29**: 119-133
- Cabello-Gutierrez, C., Manjarrez-Zavala, M., Huerta-Zepeda, A., Cime-Castillo, J., Monroy-Martinez, V., Corre, B., and Ruiz-Ordaz, B. (2009) Modification of the cytoprotective protein C pathway during dengue virus infection of human endothelial vascular cells. *Thromb Haemost* **101**: 916-28
- Cao-Lormeau (2009) Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virol J* **25**: 35-39
- Calvo, E., Tokumasu, F., Marinotti, O., Villeval, J.L., Ribeiro, J.M., and Francischetti, I.M. (2007) Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, Integrin alpha2beta1, and von Willebrand factor. *J Biol Chem* **282**: 26928-26938
- Calvo, E., Mans, B.J., Andersen, J.F., and Ribeiro, J.M. (2006) Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biol Chem* **281**: 1935-1942
- Chagas, A.C., Ramirez, J.L., Jasinskiene, N., James, A.A., Ribeiro, J.M., Calvo, E. (2014) Collagen-binding protein, Aegyptin, regulates probing time and blood feeding success in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **13**: 6946-51
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., and Marks, R.M. (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*. **3**: 866-871
- Champagne, D.E., and Ribeiro, J.M. (1994) Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 138-142
- Clements, A.N. (1992) The biology of mosquitoes. Edt London Chapman and Hall. 509 Pag.

- Cologna, R., Armstrong, P. M., and Rico-Hesse, R. (2005) Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* **79**: 853-859.
- Cooper, C.A., Gasteiger, E., and Packer, N.H. (2001) GlycoMod- A software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics* **1**: 340-349
- Crone, C. (1986) Modulation of solute permeability in microvascular endothelium. *Fed Proc* **45**: 77-83
- Deen, J.L., Harris, E., Wills, B., Balmaseda, A., Hammond, S.N., Rocha, C., Dung, N.M., Hung, N.T., Hien, T.T., and Farrar, J.J. (2006) The WHOdengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* **368**: 170-173.
- Diamond, M.S., Edgil, D., Roberts, T., Lu, B., and Harris, E. (2000) Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J virol* **74**: 7814-23
- Dormitzer, P.R., Sun, Y.Z., Wagner, G. & Harrison S. C (2002) The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J* **21**: 885-897
- Dugan, A.S., Gasparovic, M.L., and Atwood, W.J. (2008) Direct correlation between sialic acid binding and infection of cells by two human polyomaviruses (JC virus and BK virus). *J Virol* **82**: 2560-2564
- Edwards, J.F., Higgs, S., and Beaty, B.J. (1998) Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. *J Med Entomol* **35**: 261-265
- Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Pham, V.M., Garfield. M.K., and Ribeiro, J.M. (2002) Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J exp Biol* **205**: 2429-2451
- Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thieberge, S., Olivo.Marin, J., Shorte, S., and Menard, R. (2004) Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell Microbiol* **6**: 687-94
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortatjacob, H., Ruigrok, R.W.H., *et al* (2002) Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* **292**: 162-168
- Gesslbauer, B., Rek, A., Falsone, F., Rajkovic, E., Kungl, A. (2007) Proteoglycanomics: tools to unravel the biological function of glycosaminoglycans. *Proteomics* **7**: 2870-80
- Glaser, L., Zamarin, D., Acland, H.M., Spackman, E., Palese, P., Garcia-Sastre, A., and Tewari, D. (2006) Sequence analysis and receptor specificity of the hemagglutinin of a recent influenza H2N2 virus isolated from chicken in North America. *Glycoconj J* **23**: 93-99
- Gubler, D, J. (1998a) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* **11**:480-96
- Gubler, D, J. (1998b) The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever:current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore* **27**: 227-34
- Gubler, D. J. (2002) The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med Res* **33**: 330-342
- Gubler, D. J. (2003) Dengue Fever Viruses. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley and Sons, (ed) Chichester. pp 1-7
- Gubler, D. J. (2004) The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**: 319-330
- Guha-Sapir, D., and Schimmer, B. (2005) Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol* **2**: 1

- Halstead, S. B., and O'Rourke, E. (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J exp Med* **146**: 201-17
- Halstead, S. B. (1988) Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* **239**: 476-81
- Halstead, S. B. (2002) Dengue. *Current Opin Infect Dis* **15**: 471-6
- Halstead, S. B. (2007) Dengue. *Lancet* **10**: 1644-52
- Halstead, S. B., (2008) Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* **53**: 273-291
- Harrington, L. C., Edman, J. D., and Scott, T. W. (2001) Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *J Med Entomol* **38**: 411-442
- Hilgard, P., and Stocker, R. (2000) Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* **32**: 1069-1077
- Hillyer, J.F., Barreau, C., and Vernick, K.D. (2007) Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *Int J parasitol* **37**: 673-681
- Huerta-Zepeda, A., Cabello-Gutierrez, C., Cime-Castillo, J., Monrroy-Martinez, V., Manjarrez-Zavala, M., Gutierrez-Rodriguez, M., Izaguirre, R., and Ruiz-Ordaz, B. (2008) Crosstalk between coagulation and inflammation during dengue virus infection. *Thromb Haemost.* **99**: 936-43
- Isa, P., Arias, C.F., and Lopez, S. (2006) Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J* **23**: 27-37
- Inouye, S., Matsuno, S., and Hasegawa, A. (1977) Surface charge of dengue virus hemagglutinins prepared from infected mouse brains. *Jpn J Med Sci Biol* **30**: 109-18
- James, A.A., Blackmer, K., Marinotti, O., Ghosn, C.R., and Racioppi, V. (1991) Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*. *Mol Biochem Parasitol* **44**: 245-254
- Jindadamrongwech, S., Thepparit, C., and Smith, D.R. (2004) Identification of GRP 78 (BIP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* **149**: 915-927.
- Kaludov, N., Brown, K.E., Walters, R. W., Zabner, J., and Chiorini, J.A. (2001) Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* **75**: 6884-6893
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., and Sacks, D. (2000) Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* **290**: 1351-1354
- Kim, K., Lawrence, S., Park, J., Pitts, L., Vann, W., Betenbaugh, M., and Palter, K. (2002) Expression of a functional *Drosophila melanogaster* N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) phosphate synthase gene: evidence for endogenous sialic acid biosynthetic ability in insects. *Glycobiology* **12**: 73.83
- Koles, K., Irvine, K.D., and Panin, V.M. (2004) Functional characterization of *Drosophila* sialyltransferase. *J Biol Chem.* **279**: 4346-4357
- Korochkina, S., Barreau, C., Pradel, G., Jeffery, E., Li, J., Natarajan, R., et al (2006) A mosquito-specific protein family includes candidate receptors for malaria sporozoite invasion of salivary glands. *Cell Microbiol* **8**: 163-175

- Kuno, G., and Chang, G. (2005) Biological transmission of arboviruses: reexamination of a new insights into components, mechanism. And unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin Microbiol Rev* **18**: 60-37
- Kamerling, J.P., Gerwig, G., Vliegthart, J., and Clamp, J. (1975) Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and protonmagnetic resonance of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem J* **151**: 491-5
- Labuda, M., Jones, L.D., Williams, T., and Nuttall, P.A. (1993) Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med Vet Entomol* **7**: 193-196
- Lee, Y., Liu, M., Lei, H., Liu, C., Wu, J., Tung, Y., Lin, Y., Yeh, T., Chen, S., and Liu, H. (2006) MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol*. **87**: 3623-30
- Lehmann, F., Tiralongo, E., and Tiralongo, J. (2006) Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1331-1354
- Lin, Y.L., Lei, H.Y., Lin, Y.S., Yeh, T.M., Chen, S.H., and Liu, H.S. (2002) Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. *Antiviral Res.* **56**: 93-96
- Lin, Y., Zhang, F., Liu, J., Xiao, X., Zhang, S., Qin, C., Wang, P., Cheng, G. (2014) Transmission-blocking antibodies against mosquito C-type lectins for dengue prevention. *Plos Pathog* **13**: e1003931
- Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2003) Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* **59**: 23-61
- Limesand, K.H., Higgs, S., Pearson, L.D., and Beaty, B.J. (2000) Potentiation of vesicular stomatitis New Jersey virus infection in mice by mosquito saliva. *Parasite Immunol* **22**: 461-467
- Marchal, I., Jarvis, D, L., Cacan, R., and Verbert, A. (2001) Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biol Chem* **382**: 151-9
- Marks, R.M., Lu, H., Sundaresan, R., Toida, T., Suzuki, A., Imanari, T., *et al* (2001) Probing the interaction of dengue virus envelope protein with heparin: assesment of glycosaminoglycan – derived inhibitors. *J Med Chem* **44**: 2178-2187
- Martínez-Barragan, J.J., and Del Angel, R.M. (2001) Identification of a putative coreceptor on vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J Virol* **75**: 7818-7827
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., and Klenk, H.D. (2004) Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Scie USA* **101**: 4620-4624
- Mercado-Curiel, R.F., Black, W.C 4th., and Muñoz, MdeL. (2008) A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol* **8**: 118-132
- Mercado-Curiel, R.F., Esquinca-Aviles, H.A., Tovar, R., Diaz-Badillo, A., Camacho-Nuez., and Muñoz, MdeL. (2006) The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol.* **6**: 85-95
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., Rossmann, M. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* **3**:13-22
- Mendoza, M.Y., Salas-Benito, J.S., Lanz-Mendoza, H., Hernandez-Martinez, S., and Del Angel, R.M. (2002) A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* **67**: 76-84
- Miller, J.L., deWet, B.J.M., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C.M., Dewek, R.A., Pauline, M.R., and Gordon, S. (2008) The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog* **4**: e17 0001-0010

- Monath, T, P. (1994) Vector-borne emergent disease. *Ann N Y Acad Sci.* **15**: 126-8
- Muñoz, MdeL., Cisneros, A., Cruz, J, P., Tovar, R., and Ortega, A. (1998) Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol Lett* **168**: 251-258
- Munday, J., Floyd, H., Crocker, P. (1999). Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J Leukoc Biol* **66**:705-11
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.L., *et al* (2003) Dendritic-cell-specific ICAM-3 grabbing non integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito cell derived dengue virus. *EMBO rep.* **4**: 723-728
- Narvaez, F., Gutierrez, G., Pérez, M.A., Elizondo, D., Nuñez, A., Balmaseda, A., and Harris, E. (2011) Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e1397
- Nishiura, H., and Halsted, S.B. (2007) Natural history of dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 infections: reanalysis of classic studies. *J Infect Dis* **195**: 1007-13
- Noisakran, S., and Perng, G.C. (2008) Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med* **233**: 401-408
- Nutall, P.A., and Labuda, M. (2004) Potentiation of vesicular stomatitis New Jersey virus infection in mice by mosquito saliva. *Parasitology* **129s**: 177-189
- Pang, T., Cardoso, M., Guzman, M, G. (2007) Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* **85**: 43-4
- Perera, R., and Kuhn, R.J. (2008) Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* **11**: 369-77
- Perrone, J.B., DeMaio, J., and Spielman, A. (1986) Regions of mosquito salivary glands by surface lectin-binding characteristics. *Insect Biochem* **16**:313-318
- Ramos-Castañeda, J., Imbert, J., Barron, B., and Ramos, C. (1997) A 65 kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *J Neurovirol.* **3**: 435-440
- Reyes-Del Valle, J., Chavez-Salinas, S., Medina, F., and Del Angel, R.M. (2005) Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* **79**: 4557-4567
- Ribeiro, J.M., Rossignol, P., and Spielman, A. (1984) Role of mosquito saliva in blood vessel location. *J Exp Biol* **108**: 1-7
- Ribeiro, J.M. (1992) Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J exp Biol.* **165**: 61-71
- Ribeiro, J.M. (1995) Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis.* **4**: 143-152
- Ribeiro, J, M. (2000) Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Med Vet Entomol* **14**: 142-8
- Ribeiro, J, M., and Francischetti, I.M. (2003) Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* **48**: 73-88

- Ribeiro, J.M., Charlab, R., Pham, V.M., Garfield, M., and Valenzuela, J.G. (2004) An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol* **34**: 543-563
- Ribeiro, J.M., Arca, B., Lombardo, F., Calvo, E., Myphan, V., Chandra, P.K., and Wikel, S. K. (2007) An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* **8**: 6
- Rigau-Perez, J., Clarck, G., Gubler, D., Reiter, P., Sanders, E., and Vorndam, A. (1998) Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* **19**: 9717
- Rigau-Perez, J. (2006) Severe dengue: the need for a new case definitions. *Lancet Infect Dis* **5**: 297-302
- Romain, R., Lorat-Jacob, H., and Fender, P. (2006) Heparan sulphate proteoglycans and viral vectors: Ally or foe? *Current gene therapy* **6**: 35-44
- Rosen, L. (1977) The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* **23**: 1205-6
- Rosen, L., Rosenboom, L., Gubler, D., Lien, J., and Chaniotis, B. (1985) Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parental infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *Am J Trop Med Hyg* **34**: 603-15
- Ryan, C., Zaitsev, V., Tindal, D.J., Dyason, J.C., Thomson, R.J., Alymova, I., *et al* (2006) Structural analysis of a designed inhibitor complexed with the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus. *Glycoconj J* **23**: 135-141
- Salas-Benito, J. S., and Del Angel, R. M. (1997) Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue 4 type virus. *J Virol* **71**:7246-7252.
- Salazar, M. I., Richardson, J.H., Sánchez -Vargas, I., Olson, K.E., and Beaty, B. (2007) Dengue virus type 2: replication and tropism in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol* **7**: 1-13
- Samuelson, B.J., Lerner, E., Tesh, R., and Titus, R. (1991) A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J Exp Med* **173**: 49-54
- Schneider, B.S., and Higgs, S. (2008) The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**: 400-408
- Schulze, A., Gripon, P., and Urban, S. (2007) Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparin sulfate proteoglycans. *Hepatology* **46**: 1759-68
- Schwegmann, C., and Herrler, G. (2006) Sialic acids as receptor determinants for coronavirus. *Glycoconj J* **23**: 51-58
- Sierra, B., Alegre, R., Perez, A., Garcia, G., Sturn-Ramirez, K., Obasanjo, O., Aguirre, E., Alvarez, M., Rodriguez-Roche, R., Valdes, L., Kanki, P., and Guzman, M. (2007) HLA-A.-B.-C and –DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban populations for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol* **68**: 531-40
- Stark, K.R., and James, A.A. (1998) Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Biol Chem.* **273**: 20802-20809
- Stanley, P. (1983) Selection of lectin-resistant mutants of animal cells. *Methods Enzymol* **96**: 157-84

- Stehle, T., and Harrison, J.A. (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP-1 oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J* **16**: 5139-5148
- Stollar, V. (1987) Approaches to the study of vector specificity for arboviruses-model systems using cultured mosquito cells. *Adv Virus Res* **33**:327-65
- Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R.E., Chambers, T.M., Kiso, M., *et al* (2000) Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J virol* **74**: 11825-11831
- Summerford, C., and Samulski, R. (1998) Membrane-associated heparin sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J virol* **72**: 1438-45
- Tassaneeritthep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpheller, C., Finke, J., Sun W., *et al.* (2003) DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* **197**: 823-829
- Teuton, R.J., and Brandt, C.R. (2007) Sialic acid on herpes simplex virus type 1 envelope glycoproteins is required for efficient of cells. *J virol* **81**: 3731-3739
- Titus, R.G., and Ribeiro, J.M. (1988) Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* **239**: 1306-1308
- Thaisomboonsuk, B.K., Clayson, E.T., Pantuwatana, S., Vaughn, D.W. and Endy, T.P. (2005) Characterization of dengue-2 virus binding to surfaces of mammalian and insects cells. *Am J Trop Med Hyg* **72**: 375-383
- Thepparit, C., and 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. *J Virol* **78**: 12647-12656
- Thisyakorn, U., and Nimmannitya, S. (1993) Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* **16**: 295-7
- Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Garfield, M., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E., Sacks, D., and Ribeiro, J. (2001) Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* **6** 331-42
- Valenzuela, J.G., Pham, V.M., Garfield, M.K., Francischetti, I.M., and Ribeiro, J.M. (2002a) Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1101-1122
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Gonzales, E. C., de Miranda-Santos, I.K., Marinotti, O.,Francischetti, I.M., and Ribeiro, J.M. (2002b) The family D7 of salivary proteins in blood sucking díptera. *Insect Mol Biol* **11**: 149-155
- Valenzuela, J.G. (2002c) High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 1199-1209
- Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M., Pham, V., Garfield, M., and Ribeiro, J. M. (2003) Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 717-32
- Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T.P., *et al* (2011) Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* **18**: 2-9
- Viswanathan, K., Tomiya, N., Park, J., Singh, S., Lee, Y. C., Palter, K., and Betenbaugh, M.J. (2006) Expression of a functional *Drosophila melanogaster* CMP-sialic acid synthetase. *J Biol Chem.* **281**: 15929-15940
- Weis, W., Brown, H., Cusack, S., Paulson, C., Skehel, J., and Wiley, D. (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**: 426-431



- WHO <http://www.who.int/en/>
- Woodring, J., Chandler, L., Oray, C., McGaw, M., Blair, C., and Beaty, B. (1998) Short report: Diapause, transovarial transmission, and filial infection rates in geographic strains of La Crosse virus-infected *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg* **58**: 587-8
- Zieler, H., Nawrocki, J., and Shahabuddin, M. (1999) *Plasmodium gallinaceum* ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of *Aedes aegypti* by interaction with a carbohydrates ligand. *J Exp Biol* **202**: 485-95
- Zocher, G., Mistry, N., Frank, M., Hahnlein-Schick, I., Ekstrom, J., Arnberg, N., and Stehle, T. (2014) A sialic acid binding site in a human picornavirus. *Plos Pathog* **e1004401**.

## Apéndice A

Tabla 1 .Virus que reconocen residuos de glicosaminglicanos

Virus	Proteína viral	Especificidad	Referencia
<b>Adenoviridae</b> Adenovirus tipo 2 y 5	Knob fiber	Heparan sulfato	Dechecchi 2001
<b>Circoviridae</b> Circovirus Porcino tipo 2		Heparan sulfato, condroitin sulfato	Misinzo 2006
<b>Flaviviridae</b> Virus de la Hepatitis C Dengue serotipo 2	Proteína E NS1	Heparan Sulfato GAG altamente sulfatados Heparan sulfato, condroitin sulfato	Barth 2006 Chen 1997 Avirutnan 2007
Virus de la fiebre amarilla Virus de encefalitis Murray Valley	Proteína E	Heparan sulfato Heparina	Germi 2002 Lee 2000
<b>Hepadnaviridae</b> Virus de la hepatitis B	Proteína L	Heparan Sulfato	Schulze 2007
<b>Herpesviridae</b> Herpesvirus humano 7 Herpes simple tipo 1,2	GP B GP C	Heparan sulfato Heparan sulfato, condroitin sulfato 3-0-sulfatado	Secchiero 1997 WuDunn 1989, Tiwari 2006
Pseudorabies virus Citomegalovirus Virus Epstein -Barr	Zebra	GIII Heparan sulfato Heparan sulfato	Mettenleiter 1990 Song 2001 Mahot 2005
<b>Poxviridae</b> Ectromelia virus Virus Vaccinia	EI63 H3L A27L D8L G, H	Heparan sulfato Heparan Sulfato Condroitin sulfato Heparina	Argüello 2008 Ho 2005 Hsiao 1999 Karger 2001
Virus sincitial respiratorio bovino Virus sincitial respiratorio humano		Heparan sulfato, Condroitin sulfato A, B y C, Acido hialuronico	Hallak 2007
<b>Papilomaviridae</b> Virus de papiloma humano, 16,33 y 39 Virus del papiloma humano 11	L1	Heparan Sulfato Heparan sulfato, Heparina	Giroglou 2001 Joyce 1999
<b>Paramixoviridae</b> Virus sincitial respiratorio		Heparan sulfato, condroitin sulfato	Hallak 2000
<b>Parvoviridae</b> Virus asociado a Adeno serotipo 2		Heparan sulfato	Kern 2003
<b>Picornaviridae</b> Foot and mouth disease virus Echovirus Virus de encefalomiелitis murina de Theile	VP1,VP2,VP3	Heparan sulfato Heparan sulfato Heparan sulfato	Jackson 1996 Goodfellow 2001 Reddi 2002
<b>Retroviridae</b> Virus de leucemia murina Virus de inmunodeficiencia humana	GP120/41	Heparina Heparan sulfato	Walker 2002 Roderiquez 1995
<b>Togaviridae</b> Sindbis Virus	E2	Heparan sulfato	Byrnes 1998

Tabla 2 .Virus que reconocen residuos de ácido siálico

<b>Virus</b>	<b>Proteína viral</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Referencia</b>
<b>Adenoviridae</b>			
Adenovirus tipo 37	Knob fiber	Sia $\alpha$ 2,3, Sia $\alpha$ 2,6	Burmeister, 2004
Adenovirus tipo 8, 19	Knob fiber	Sia	Arnberg 2000
<b>Coronaviridae</b>			
Coronavirus bovino	Proteína S, HE	Neu5,9Ac $_2$ $\alpha$ 2,3Gal, Neu5,9Ac $_2$ $\alpha$ 2,6Gal,	Schwegmann 2006
Coronavirus humano OC43	Proteína S	Neu5,9Ac $_2$ $\alpha$ 2,3Gal, Neu5,9Ac $_2$ $\alpha$ 2,6Gal,	Krempf 1995
Virus de encefalomiелitis porcina	HA-A	Neu5,9Ac $_2$	Schultze 1990
Coronavirus de gastroenteritis porcina	Proteína S	Neu5GAc $\alpha$ 2,3, Neu5Aca $\alpha$ 2,3	Schwegmann 2006
Coronavirus infeccioso aviar	HA-A	Neu5Aca $\alpha$ 2,3	Schultze 1992
<b>Herpesviridae</b>			
Citomegalovirus humano		Neu5Ac, Neu5Gc	Lobert 1995
Herpes virus simple tipo 1	GPC,GPD, GPH	Sia $\alpha$ 2,6	Teuton 2007
<b>Hepadnaviridae</b>			
Virus de la hepatitis B	Proteína S	Neu5Ac	Komai 1988
<b>Orthomixoviridae</b>			
Influenza tipo A	HA	Neu5Aca $\alpha$ 2,6 Gal	
Humana		Neu5Aca $\alpha$ 2,3 Gal	Suzuki 2000
Aviar		Neu5Aca $\alpha$ 2,6 Gal, Neu5Aca $\alpha$ 2,3 Gal	Glaser 2006
Porcina		Neu5Gca $\alpha$ 2,3 Gal	Van Eijk 2004
Equina	HA	Neu5Aca $\alpha$ 2,6 Gal	Suzuki 2005
Influenza tipo b			Gagneux 2003
<b>Papillomaviridae</b>			
Parvovirus limfotropico B de mono		Sia	Keppler 1994
<b>Paramyxoviridae</b>			
Virus Newcastle	HN	Neu5Ac2en	Ryan 2006
Virus Sendai	HN	NeuAca $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc/4GlcNAc	Rocheleau 2000
Parainfluenza humana tipo 1 y 3	HN	NeuAca $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc	Amonsens 2007
	HN	NeuAc/Neu5Gca $\alpha$ 2,3/6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc	
Parainfluenza 5	HN	Sia	Lamb 2001
Rubulavirus porcino	HN	Neu5Aca $\alpha$ 2,3Gal	Villar 2006
Virus Mumps	HN	Sia	Villar 2006
Simian Virus 5	HN	Sia	Villar 2006
<b>Parvoviridae</b>			
Parvovirus canino	VP2	Sia	Barbis 1992
Virus minute murino	VP1	Sia	Nam 2006
Parvovirus bovino	HA-A	Neu5Aca $\alpha$ 2,3-O	Blackburn 2005
Virus asociado a Adeno serotipo 4 y 5	HA-A	Neu5Aca $\alpha$ 2,3 Gal	Kaludov 2001
	HA-A	Neu5Aca $\alpha$ 2,3 Gal, Neu5Aca $\alpha$ 2,6 Gal	
<b>Polyomaviridae</b>			
Polioma murino	VP1	NeuAca $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNA	Tsai 2003
Simian virus 40	VP1	GM1	Neu 2008
Polioma virus humano JC		Sia $\alpha$ 2,6	Dugan 2008
Polioma virus humano BK		Sia $\alpha$ 2,3	Dugan 2008
<b>Picornaviridae</b>			
Virus de encefalomiocarditis		Sia	Tavakkol 1990
Rhinovirus humano 87		Sia	Tomassini 1989
Virus de encefalomiелitis murina de Theiler	VP2	Sia $\alpha$ 2,3	Lipton 2006
Enterovirus humano tipo 70		Sia $\alpha$ 2,3-O	Nokhbeh 2005
Virus de hepatitis A	VP1/VP3	Sia	Sánchez 2004
Virus de rinitis equina A		Sia $\alpha$ 2,3	Stevenson 2004

Coxsackievirus A24		Sia	Nilsson 2008 Zocher 2014
<b>Rabdoviridae</b>			
Virus estomatitis vesicular		Sia	Puri 1992
<b>Reoviridae</b>			
Reovirus tipo 3	σ1	Sia	Barton 2003
Reovirus tipo 1	σ1	Sia $\alpha$ 2,3	Guglielmi 2006
Rotavirus aviar	VP4	Sia	Sugiyama 2004
Grupo C de rotavirus porcino	VP4	Sia	Svensson 1992
Rotavirus porcino CRW-8	VP4 y VP8	Sia	Ciarlet 2002
Rotavirus porcino A131,A138,A411	VP4	Sia	Ciarlet 2002
Rotavirus humano KUN, MO	VP4	GM1	Isa 2006
Rotavirus humano Wa,HCR3a	VP4 y VP8	Sia	Blanchard 2007
Rotavirus de mono rhesus	VP8	Neu5Ac,Neu5Gc	Dormitzer 2002
Rotavirus de simio RRV	VP4	Sia	Delorme 2001
Rotavirus de simio SA11	VP4	Sia,Neu5Gc-GM3	Delorme 2001
Rotavirus bovino NCDV	VP4	Neu5Gc-GM3	Isa 2006
Rotavirus canino CU-1,K9	VP4	Sia	Ciarlet 2002
Rotavirus Felino Cat97	VP4	Sia	Isa 2006
Virus bluetongue		Neu5Ac- NeuGAc	Yang 1993

## Apéndice B

Pre-computed BLAST results for: [gi|24667125|ref|NP\\_730474.1](#) CMP-sialic acid synthase [*Drosophila melanogaster*]

Matching gis: [23093105](#):

Total (score > 100) : 762 hits in 762 proteins in 198 species

Selected: 762 hits in 762 proteins in 198 species Filter: Min Score: 100 |

Other views (Reports): [Taxonomy report](#) [Multiple Alignment](#) [Blast](#)

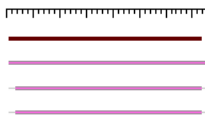
[Reset all filters](#)

[Choose Display Options](#)

15 Archaea 323 Bacteria 117 Metazoa 0 Fungi 0 Plants 0 Viruses 307 The Others [reset selection](#)

Results: 1 - 100 [Next Page](#) [Last](#)

% hits  [reset selection](#)  
187 aa

blink 

SCORE	ACCESSION	Length	Protein Description
<a href="#">Conserved Domain Database hits</a>			
980	<a href="#">AAN11643</a>	187	CMP-sialic acid synthase [ <i>Drosophila melanogaster</i> ]
426	<a href="#">XP_001663017</a>	261	cmp-n-acetylneuraminic acid synthase [ <i>Aedes aegypti</i> ]
426	<a href="#">EAT34937</a>	261	cmp-n-acetylneuraminic acid synthase [ <i>Aedes aegypti</i> ]

Pre-computed BLAST results for: [gi|24762715|ref|NP\\_726474.1](#) Sialyltransferase CG4871-PA, isoform A [*Drosophila melanogaster*]

Matching gis: [15213697.7291837](#):

Total (score > 100) : 1643 hits in 1637 proteins in 82 species

Selected: 1643 hits in 1637 proteins in 82 species Filter: Min Score: 100 |

Other views (Reports): [Taxonomy report](#) [Multiple Alignment](#) [Blast](#)

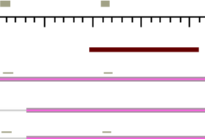
[Reset all filters](#)

[Choose Display Options](#)

0 Archaea 0 Bacteria 1524 Metazoa 0 Fungi 50 Plants 14 Viruses 55 The Others [reset selection](#)

Results: 1 - 100 [Next Page](#) [Last](#)

% hits  [reset selection](#)  
451 aa

blink 

SCORE	ACCESSION	Length	Protein Description
<a href="#">Conserved Domain Database hits</a>			
2405	<a href="#">AAK92126</a>	451	sialyltransferase [ <i>Drosophila melanogaster</i> ]
933	<a href="#">XP_001649590</a>	400	hypothetical protein AaeL_AAEL014772 [ <i>Aedes aegypti</i> ]
933	<a href="#">EAT32971</a>	400	conserved hypothetical protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]

Fig x. BLAST obtenido del NCBI con la secuencia de CMP- ácido sialico acid sintetase (Csas, gi|24667125) y sialiltransferase (gi| 24762715) de *Drosophila m.* A) Putativa CMP-sintasa de *A. aegypti* B) Putativa Sialiltransferasa de *Ae aegypti*.

## Apéndice C

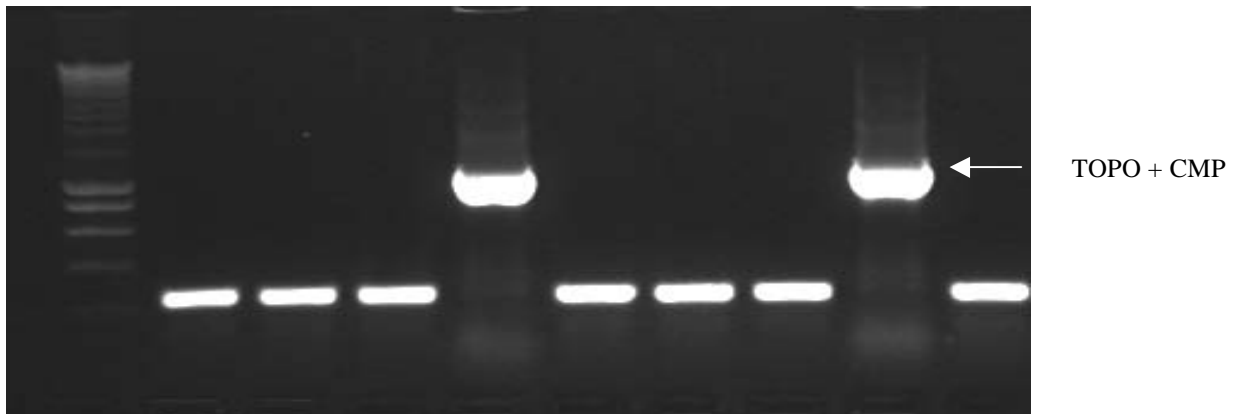
	Concentración
Galactosa	.016 mg
Manosa	.084 mg
N - acetil galactosa	0.17 mg
N- acetil glucosa	.042 mg
Acido Sialico	.007 mg

**Table 3 Determinación de carbohidratos en las glándulas salivales de *Ae. aegypti*.**

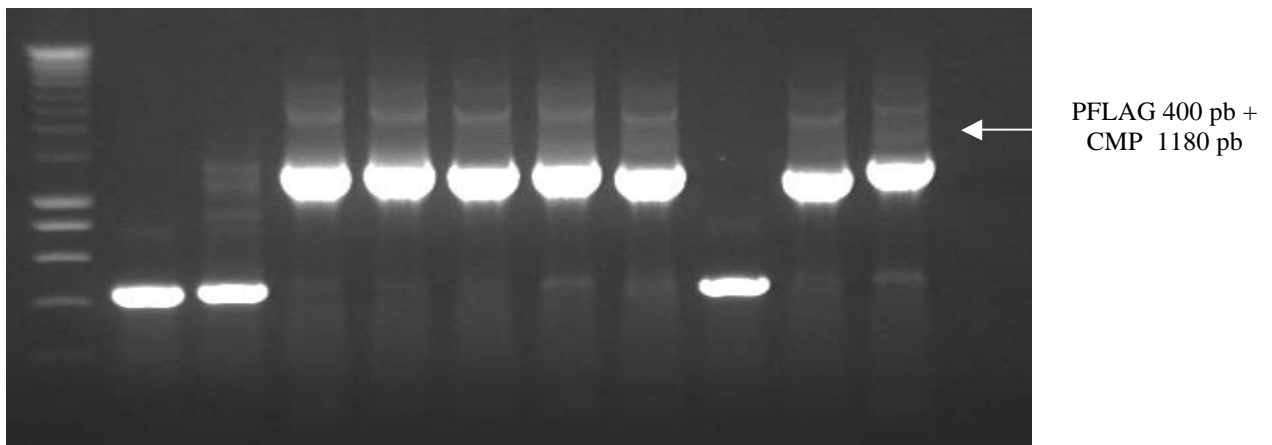
La concentración de carbohidratos es el promedio de 10 pares de glándulas salivales, los monosacáridos se identificaron por Cromatografía de Gases. La tabla muestra la concentración en miligramos del panel total de carbohidratos identificados por este método.

## Apéndice D

A



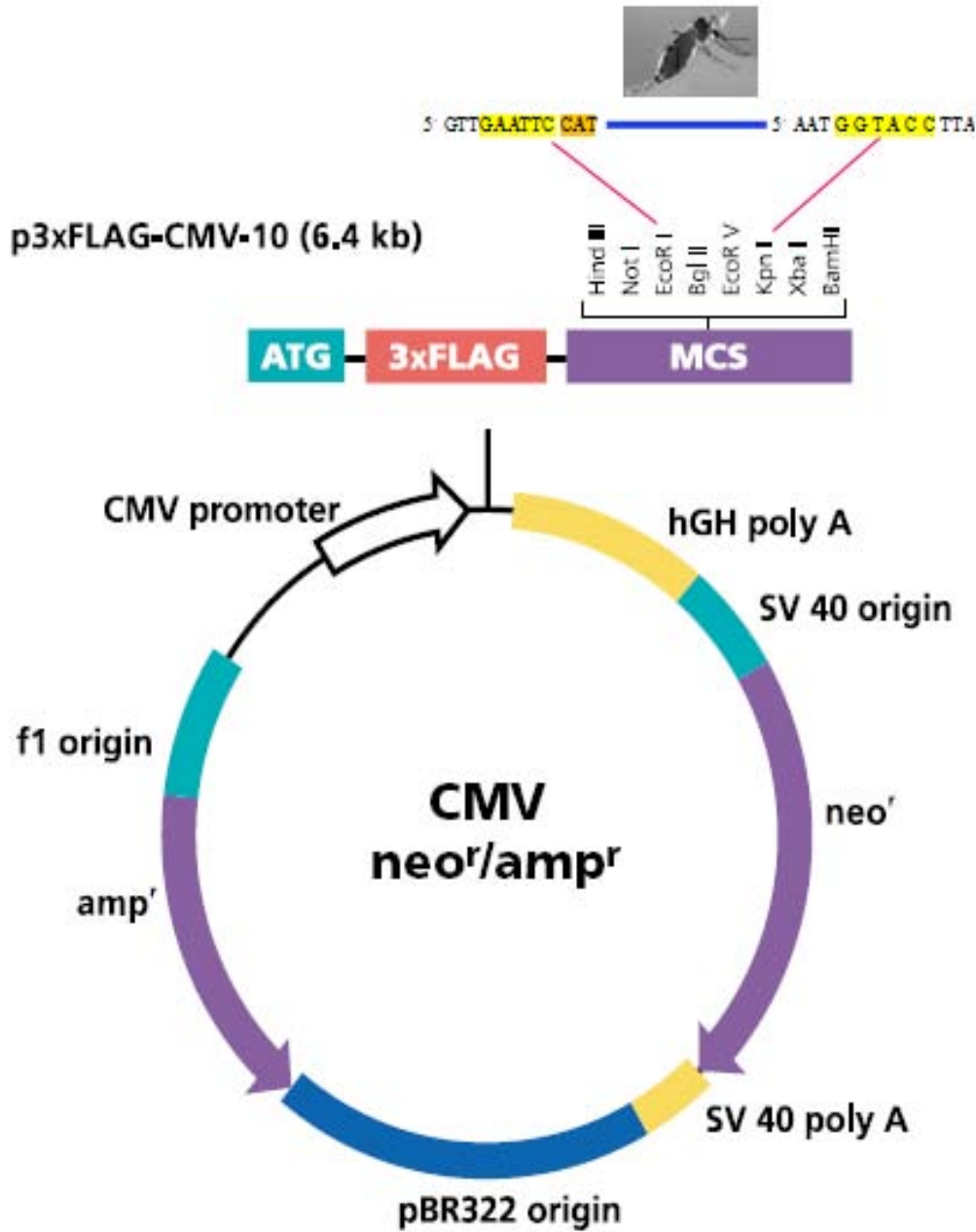
Expresión de CMP-sintasa de *A. aegypti* en bacterias E coli (DH5) transfectadas, se observan las clonas 4 y 8 positivas con el producto de amplificación esperado. El análisis de la expresión se comprobó con primers específicos para TOPO vector, y posteriormente se comprobó la presencia de la secuencia CMP con ayuda de primers internos.



Expresión de CMP-sintasa en el vector PFLAG en bacterias E coli transformadas, se observan las clonas con el producto de amplificación esperado. El análisis de la expresión se comprobó con primers específicos para PFLAG vector, posteriormente se secuenció el fragmento correspondiente a CMP sintasa.

La clona de la secuencia correspondiente, se usó para la transfección de células LEC32.Lec29 (deficientes de actividad de CMP-sintasa).

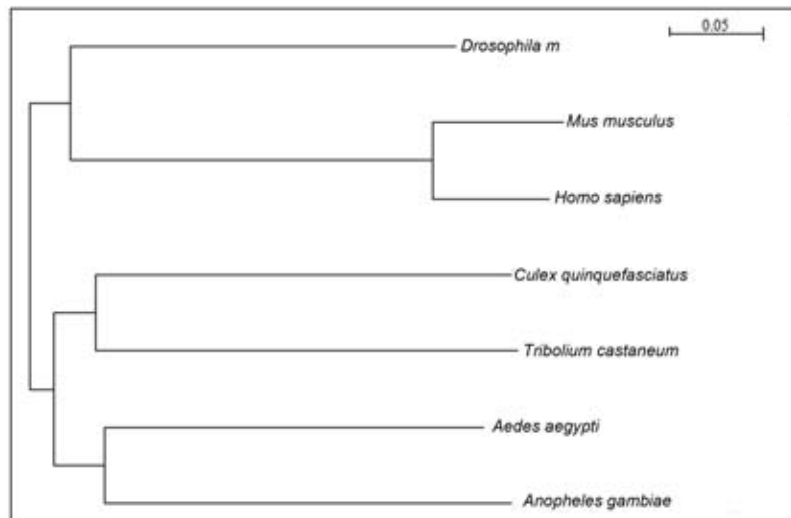
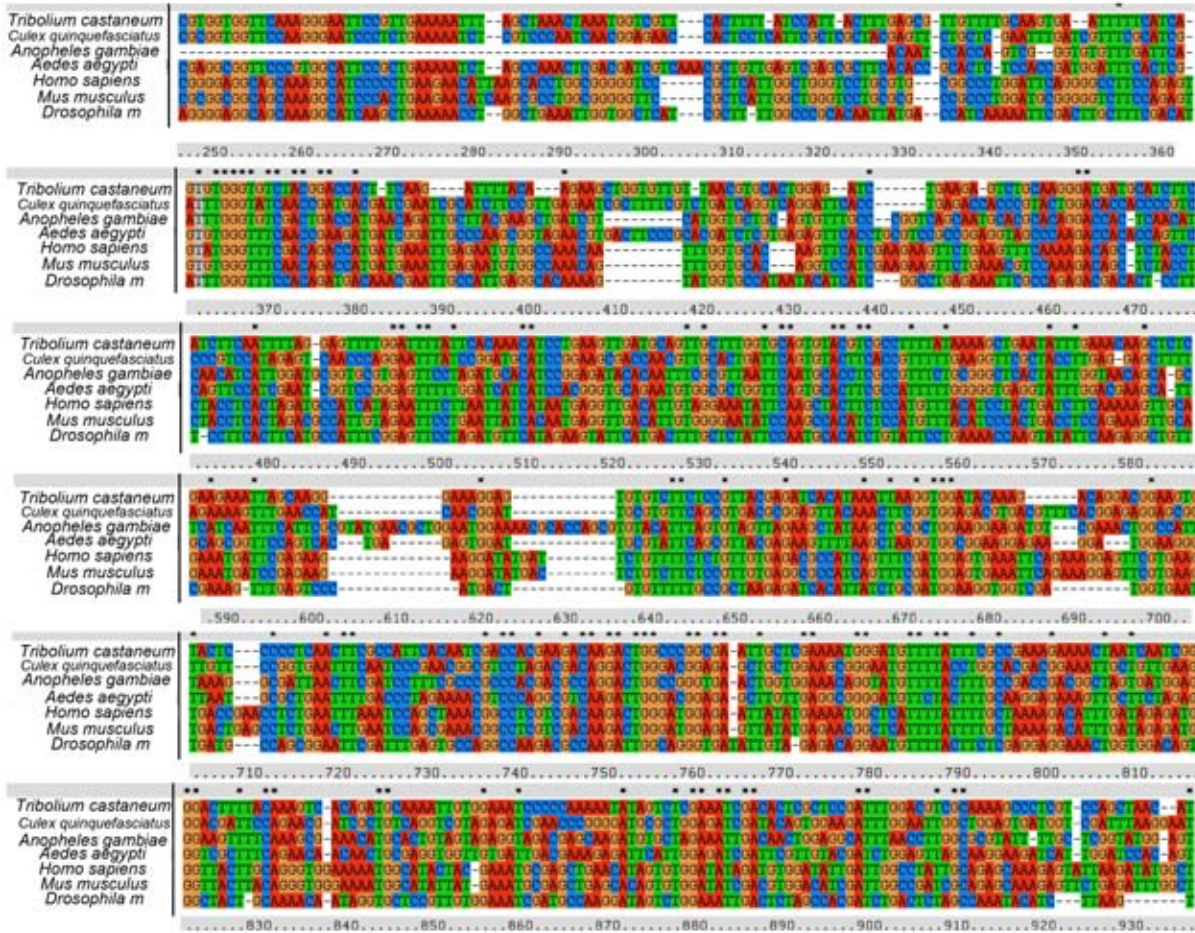
C



Mapa del vector CMV-PFLAG, el cual usamos para la transfección de células LEC32Lec29, deficientes de CMP-sintasa, se muestran los sitios de restricción en donde se introdujo la secuencia correspondiente a CMP-sintasa de *A. aegypti*.



# Apéndice E



Análisis de CMP-sintasa de *A. aegypti*. Las secuencias fueron alineadas usando clustal W con una penalidad de espacio de 15 y de extensión de 6.66. Las secuencias usadas en el análisis son: *Tribolium castaneum* (Tca) similar a CMP-N-acetylneuraminic acid synthase (LOC656718), mRNA, *Culex quinquefasciatus* (Cuq) putativa N-acetylneuraminic acid cytidyltransferase, *Anopheles gambiae* (Aga) str. PEST AGAP004527-PA (AgaP\_AGAP004527) mRNA, *A. aegypti* (Aae) AaeL\_AAEL012868 CMP-N-acetylneuraminic acid synthase, *Drosophila melanogaster* (Dme) CMP-sialic acid synthase (CSAS), mRNA, *Homo sapiens* (Has) CMP-N-acetylneuraminic acid synthase mRNA, *Mus musculus* (Mmu) cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid synthase (CMAS), mRNA. \* indica bases conservadas en todas las secuencias. Los espacios introducidos para maximizar la homología se muestran con puntos.

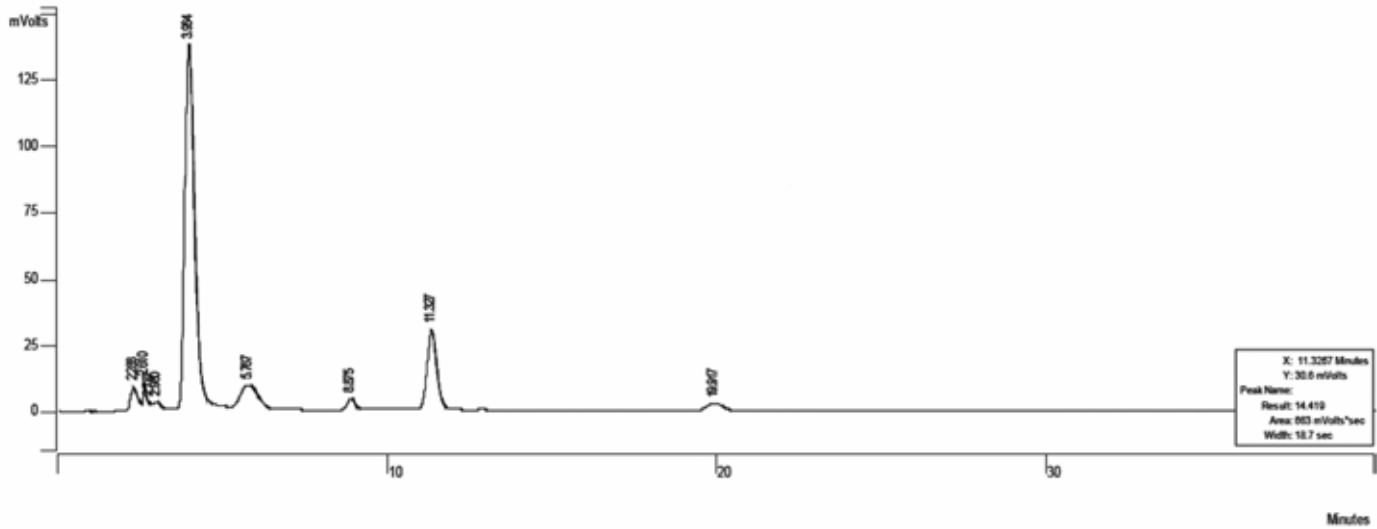
En la parte inferior de la figura, se muestra el árbol filogenético más parsimonioso (obtenido usando Drawn N-J) usando las secuencias de *Homo sapiens* y *Mus musculus* como grupo externo. Se observa una mayor relación entre las secuencias de artrópodos y particularmente CMP-sintasa de *A. aegypti* y la secuencia putativa de *Anopheles gambiae*. Aunque esta última secuencia tiene un intron de tamaño variable, localizado entre el codón de inicio y el dominio de unión de CMP y hasta ahora no ha sido corroborada su presencia en este mosquito.

## Apéndice F

Lectina	Abreviación	PM (kDa)	Afinidad
<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	27	$\alpha$ -D Man, Gal
<i>Limulus polyphemus</i>	LPA	29	Neu5Ac
<i>Maackia amurensis</i>	MAA	35 – 40	Neu5Ac $\alpha$ -2,3-Gal/GalNAc
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	36 – 38	Neu5Ac $\alpha$ -2,6-Gal/GalNAc
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	MRL	19	Neu5,7,9Ac2
<i>Lens culinaris</i>	LcH	43	$\alpha$ -Man

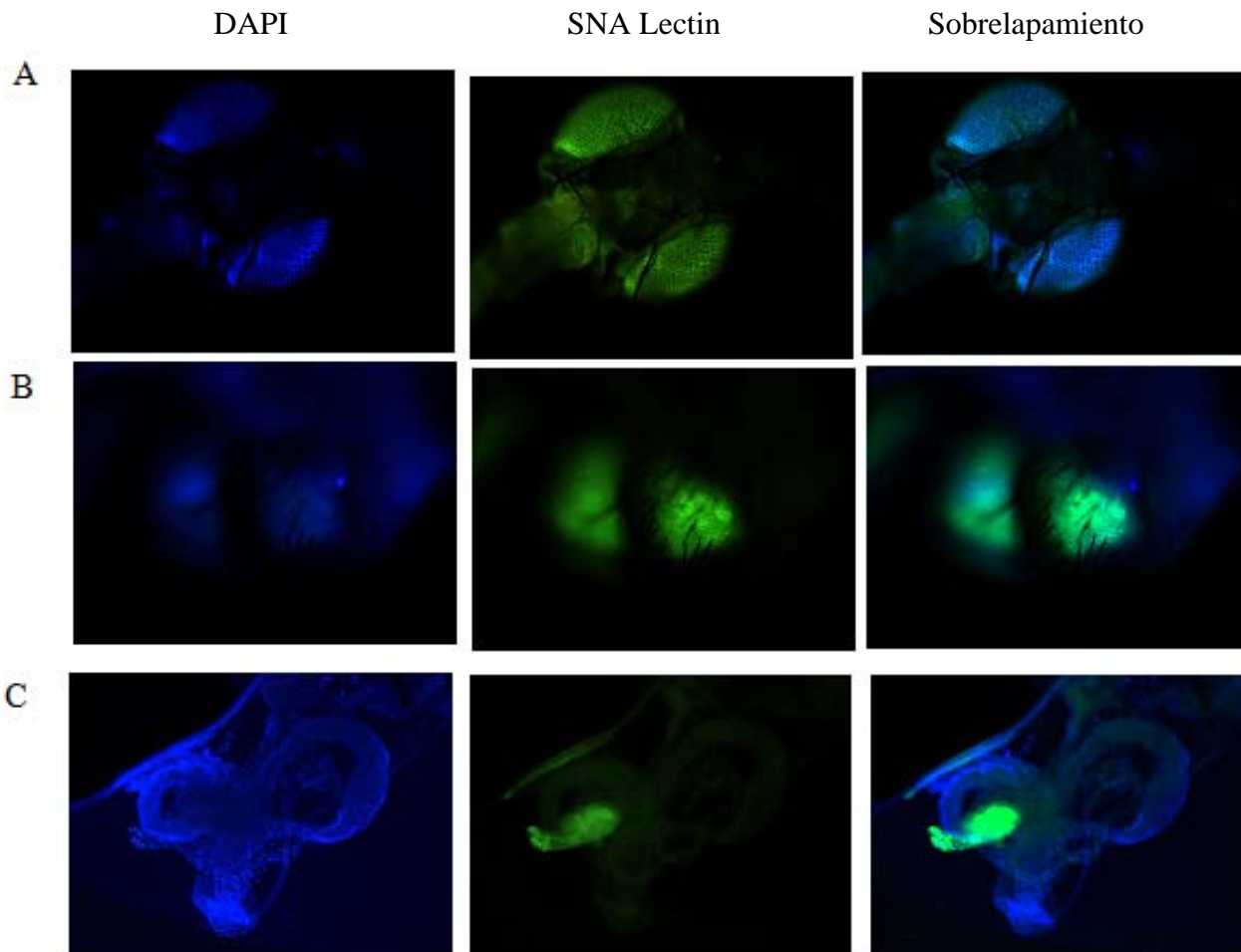
**Table 4 Panel de Lectinas.** Se muestra las lectinas usadas en este estudio, su peso molecular teórico, así como su afinidad.

## Apéndice G



Cromatograma obtenido a partir de HPLC de la muestra de estómagos de mosquitos *A. aegypti*, la concentración determinada se obtuvo calculando las unidades de área bajo la curva (121 802) del tiempo de retención en 8.875 minutos (tomanod como referencia la concentración estandarizada de ácido siálico en *zebra fish*  $0.0005 \mu\text{g} = 2\ 060\ 000$  unidades de área) por la dilución usada antes de la inyección al HPLC. Por lo que la concentración de ácido siálico es de  $0.00148 \mu\text{g}$  por estómago.

## Apéndice H



Control positivo de reconocimiento de Sia con lectina SNA en A) cabezas, B) abdomen y C) estómagos de *Drosophila melanogaster*.

## Apéndice I

Sitios de glicosilación teóricos de las glándulas salivales y de la saliva de *Aedes aegypti*. En las tablas se muestra potenciales sitios de glicosilación con sus posibles cadenas glicosiladas; se muestran potenciales sitios N-glicosilados y O-glicosilados (unicamente en la proteína D7), las abreviaturas de los carbohidratos incluyen Hex, Hexose; HexNAc: N-acetyl-hexosamine; NeuAc: N-acetylneuraminic acid; NeuGc: N-glycolylneuraminic acid; KDN: ketodeoxynonulosonic acid; Pent: pentose.

### Apyrase Salivary Gland Peptide sequence:

MAGRPGYSAV IFLYVVSVAV IARATDNMPP NKDVSKLFPPL TLIHINDLHA RFEETNMKSN  
 ACTQKDQCIA GIARVYQKIK DLLKEYESKN PIYLNAGDNF QGTLWYNLLR WNVTADFIK  
 LKPAAMTLGN HEFDHTPKGL APYLAELNKE GIPTIVANLV MNNDPDLKSS KIPKSIKLTV  
 GKRKIGIIGV LYDKTHEIAQ TGKVTLSNAV EAVRREAAAL KKDKIDIIVV LSHCSYEEDK  
 KIAAEAGDDI DVIVGAHSHS FLYSPDSKQP HDPKDKVEGP YPTIVESKNK RKIPIVQAKS  
 FGKYVGRLLT YFDDTGEVQH WEGYPVFIDH KVQQDPQILK DLVPWREKVE AIGSTVVGET  
 KIELDRDSCR DQECTLGVLVY ADGFADQYTN DTFRPFQAIQ AGNFRNPIKV GKITNGDIE  
 AAPFGSTADL IRLKGADIWD VAEHSFALDD EGRTNCLQVS GLRIVIDISK PIRSRVKKIE  
 VMDYTNPKSD ELKPLDKQAE YYIVVPSYLA DGKDGFSAMK RATARRTGPL DSDVFKNYVE  
 KIKKVDNLKL GRVIVCKGSK CT

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

### Peptides containing the motif 'N-X-S/T/C (X not P)':

position	#MC	peptide mass [M]	Peptide	modifications
59-65	0	750.33303	SNACTQK	
111-119	0	1092.56036	WNVTADFIK	
371-405	0	3955.84748	DQECTLGVLVYADGFADQYTN DTFRPFQAIQAGNFR	

### Apyrase Salivary Gland

User Mass	glycoform mass	$\Delta$ mass (Dalton)	Structure; Proposed compositions	type	peptide mass [M]	peptide sequence	theoretical glycopeptide mass
2105.0351	1011.328	0.139	(Hex) <sub>2</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>3</sub>	-	1092.56	111-119 WNVTADFIK	2104.896

1861.913 2	1110.396	0.177	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>1</sub> (Deoxyhexose) <sub>2</sub> (NeuAc) ) <sub>1</sub>	paucimannos e	750.333	59-65 SNACTQK	1861.736
2813.350 8	1703.64	0.148	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>4</sub> (Deoxyhexose) <sub>3</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	-	1108.55 5	111-119 WNVTADFI K	2813.203
4408.122 3	3656.973	-0.19	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> (Deoxyhexose) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>3</sub> (NeuGc) <sub>5</sub> (Pent) <sub>1</sub> (Sulph) <sub>3</sub>	paucimannos e	750.333	59-65 SNACTQK	4408.313
2073.074 2	963.318	0.194	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (NeuGc) <sub>1</sub>	-	1108.55 5	111-119 WNVTADFI K	2072.881
2343.113 1	1591.576	0.197	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> (Deoxyhexose) <sub>3</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>1</sub>	paucimannos e	750.333	59-65 SNACTQK	2342.916
2343.113 1	1233.368	0.183	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>1</sub> (Phos) <sub>1</sub>	paucimannos e	1108.55 5	111-119 WNVTADFI K	2342.93
2101.934 1	1008.328	0.038	(Hex) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>2</sub> (Pent) <sub>2</sub>	-	1092.56	111-119 WNVTADFI K	2101.896
3173.483 6	2079.788	0.128	(HexNAc) <sub>6</sub> (Deoxyhexose) <sub>3</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>1</sub>	-	1092.56	111-119 WNVTADFI K	3173.356
1336.669 7	585.191	0.138	(Hex) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>1</sub>	-	750.333	59-65 SNACTQK	1336.531
2234.114 1	1140.371	0.175	(Hex) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>2</sub> (Pent) <sub>3</sub>	paucimannos e	1092.56	111-119 WNVTADFI K	2233.939

### Serpin Salivary gland Peptide sequence:

MNLWIIIGFCS IYFACSVRSQ FTSVPVSFDS QNDHNEFSWN AFKKVFTDYK ENFVMSPYSL  
 RRLFSCFQGV KLLTSASGTN LQQELSNVLK ITPNQPSGQ DHRPYVEQWV RYSSAKYLNLR  
 TAMAVAIGSE KVSTVYESII NNCVIYTGHL QPSNAQRMGQ VINDALKNIT NNAVQNYLTD  
 TDINPNWKFF AIDSQFDGL WKYKFQEEFS ATCYFYASKE KKGLTKFLYL EEMLKYGNGFP  
 EWNVQAVDLP YHDQSPLSCL LVMPDGNYE SLINSMNQSR FKDVLSKLKE TKTTVRIPQF  
 GLQTTVPGRQ LLESMMGKVP FNQGVFKVFE QGQDVALGEI VQKMEMSMAA DGEKQAQSFV  
 DKRQDKQFTA HQPFLFVVYD RNELVPILVG LYLKTPPEAG MGLEDKQKCD DPPVGYQ

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form. Methionines have not been oxidized.

Peptides containing the motif 'N-X-S/T/C (X not P)':

position	#MC	peptide mass [M]	Peptide	modifications
132-157	0	2905.43921	VSTVYESI <b>INNC</b> VIYTGHLQ PSNAQR	
168-188	0	2447.17169	<b>NIT</b> NNAVQNYLTDTDINPNW K	

User Mass	glycoform mass	$\Delta$ mass (Dalton)	Structure; Proposed compositions	type	peptide mass [M]	peptide sequence	theoretical glycopeptide mass
<b>4890.2635</b>	983.657	0.16	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>3</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (NeuGc) <sub>3</sub>	-	2905.439	132-157 VSTVYESIINNCVIYTGHLQ PSNAQR	4890.103
	983.719	0.098	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>4</sub> (Deoxyhexose) <sub>2</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>2</sub>	-	2905.439	132-157 VSTVYESIINNCVIYTGHLQ PSNAQR	4890.165
<b>2917.2943</b>	453.148	-0.027	(Hex) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	-	2463.167	168-188 NITNNAVQNYLTDTDINPNW K	2917.322
<b>2981.4375</b>	533.105	0.154	(Hex) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Sulph) <sub>1</sub>	-	2447.172	168-188 NITNNAVQNYLTDTDINPNW K	2981.284
	533.115	0.143	(Hex) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Phos) <sub>1</sub>	-	2447.172	168-188 NITNNAVQNYLTDTDINPNW K	2981.294

### D7 Peptide sequence:

MFPPRKFLLS SFILAALHVT AAPLWDAKDP EQLRFITSRC MEDWYPKAKN PKAALQNLWG  
 WKLEPSDDQA TQCYTKCVLE KIGFYEPGEK RFGKVRVMQQ WETFHKYLNA DREKVHDLTS  
 TDFDFIPPLKS SSCSEVFEEAF KKVNGKHSET IRAILFGKGE SSKKYYQEGK VKIKQKEQSL  
 FMHCEALNYP KGSPQRKDLG GIRKYQMGSG IVFERHMECI FKGLRYMTSK NELDVDEIAR  
 DFIVVKKKPD AMKAMMKTK ANLKEKNPGK IAVHYKCLM NDSKVTNDFK EAFDYREVRS  
 KDYFAALTGK LKPYSRSDVR QVDDIDKIQ CS

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

**Peptides containing the motif 'N-X-S/T/C (X not P)':**

position	#MC	peptide mass [M]	peptide	modifications
278-284	0	809.34115	CLM <b>NDSK</b>	

**Potential N-glycosylation sites**



User Mass	glycoform mass	Δmass (Dalton)	Structure; Proposed compositions	type	peptide mass [M]	peptide sequence	theoretical glycopeptide mass
1395.5686	585.191	0.029	(Hex) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	-	866.363	278-284 CLMNDSK	1395.539
1824.8175	1014.294	0.175	(HexNAc) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	-	825.336	278-284 CLMNDSK	1824.642

#### Potential O-glycosylation sites

User Mass	glycoform mass	Δmass (Dalton)	Structure; Proposed compositions	type	peptide mass [M]	peptide sequence	theoretical glycopeptide mass
1320.644919	697.254	0.04	(HexNAc) <sub>2</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	-	622.244	35-39 FITSR	1320.605
1326.6054	703.217	0.037	(Hex) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (KDN) <sub>1</sub>	-	622.344	35-39 FITSR	1326.568
1249.6574	626.217	0.037	(HexNAc) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>1</sub>	-	722.36	285-290 VTNDFK	1349.584
1200.6177	437.153	0.019	(Deoxyhexose) <sub>1</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	-	762.439	311-316 LKPYSR	1200.599

**Putative 34 kDa secreted protein Peptide sequence:**

METSLPITVV FPIVLITGAQ TKPTQGSCTL TDEDISDIKS AVQKASKAAV NDIVLDPTLI  
 DKCPMLEKIT ASLKSVATEI VQMRDSAIST DQVDQLKQNF EDQVNQIVKS RDIFEKQSGT  
 QATKEHGEML ERM TALQVKV TELEQQIAKQ TASMYEDMAE LIFQRLQMNS TESVRSYTKH  
 MMEEKLEELM NKLETNYRIY LGALRFLNHM NDQELIGKVF DGILKRLGDM KADSDDVKEN  
 GRNLLVNLCC WTVNNDFLGK KYKERQVDLY RMAKLFYPKT YEKAANEADV RSRQFCEENF  
 PANLITWFAV SWNDRG

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form.

Methionines have not been oxidized.

**Peptides containing the motif 'N-X-S/T/C (X not P)':**

position	#MC	peptide mass [M]	peptide	Modifications
166-175	0	1163.56046	LQM <b>N</b> STESVR	

User Mass	glycoform mass	Δmass (Dalton)	Structure; Proposed compositions	type	peptide mass [M]	peptide sequence	theoretical glycopeptide mass
3077.4256	912.682	0.176	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>3</sub> (Deoxyhexose) <sub>2</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>3</sub>	-	1163.56	166-175 LQMNSTESVR	3077.249
2929.3606	764.645	0.148	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>3</sub> (Deoxyhexose) <sub>3</sub> (NeuAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>2</sub>	-	1163.56	166-175 LQMNSTESVR	2929.213

**Allergen, putative [*Aedes aegypti*] Peptide sequence:**

MSNFFIFVAL LVVISPVQLG KSKDYCSSVF RKICENKGEH VGCRPKDFSD YPSCSNQHPK  
 LIRMKSSYKK YILKRHNELR NKLASGTMTS THGTFPSAMN MSELKWDSEL EKLAEYNVKQ  
 CTMNHDRCRS TDKFHDAGQN IYYSSWSQKR SSDKTNLIEE AIQAWWDEHK DFYIHEVANY  
 RGQSRGVLHF TAMALDYQTR VGCAISEYDY AGTGDTFLMT CNYSSWTWME KPIYKNGKAC  
 SKCKKCDKTY KSLCT

Maximum number of missed cleavages (MC): 0

All cysteines in reduced form  
 . Methionines have not been oxidized.

**Peptides containing the motif 'N-X-S/T/C (X not P)':**

position	#MC	peptide mass [M]	Peptide	modifications
83-105	0	2398.09668	LASGTMSTHGTFPSAM	NMS ELK

User Mass	glycoform mass	$\Delta$ mass (Dalton)	Structure; Proposed compositions	type	peptide mass [M]	peptide sequence	theoretical glycopeptide mass
4143.8039	1744.666	0.034	(HexNAc) <sub>5</sub> (Deoxyhexose) <sub>3</sub> (NeuAc) <sub>1</sub>	-	2398.097	83-105 LASGTMSTHGTFPSAMNM SELK	4143.77

## Apéndice J

A

guanylate cyclase beta 1 subunit [ <i>Aedes aegypti</i> ]	Sequence Coverage 11%	Score: 55	(M <sub>r</sub> ): 74014	1.0 Daltons		
870.531580	KVCHAVERS					
1179.600942	KTKAGVMSISERY					
1326.605443	KEPMISPTTFCKV					
1365.666608	KAQVSMEGQFLVRQ					
1493.747918	KAQVSMEGQFLVRQ					
1716.864091	RLLYSVLPKRVANELRH					
glycoform mass	Amass (Dalton)	Structure	type	peptide mass [M]	peptide sequence	theoretical glycopeptide mass
648.168	0.139	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> (Sulph) <sub>1</sub>	-	1067.55	648-656 INISSETYK	1716.725

B

hypothetical protein AaeL_AAEL011868 [ <i>Aedes aegypti</i> ]	Sequence Coverage 15%	Score: 39	(M <sub>r</sub> ): 56929	1.0 Daltons
825.083221	LLDHISK			
870.531580	ALLDHFR			
1234.667622	WLTNKMGLQK			
1311.630856	HVAVECPKCGR			
1365.666608	DYQLKCHMVR			
1493.747918	ISPNSALQQHRR			
1554.8291	EVEMLDVTESSCR			
1716.864091	MEVEMLDVTESSCR			

Similar to zinc finger protein, putative [*Aedes aegypti*]

C

hypothetical protein AaeL_AAEL000531 [ <i>Aedes aegypti</i> ]	Sequence Coverage 11%	Score: 33	(M <sub>r</sub> ): 50174	1.0 Daltons	
870.531580	LNQQLQK				
1165.607203	YDELEVELR				
1234.667622	EELIAFKEK				
1311.630856	VLKLELDTRPK				
1326.605443	HVKSECALLR				
1365.666608	AKYDELEVELR				
glycoform mass	Amass (Dalton)	structure	peptide mass [M]	peptide sequence	theoretical glycopeptide mass
445.089	0.177	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>1</sub> (Sulph) <sub>1</sub>	719.334	61-66 SDEELK	1165.43
547.121	0.166	(HexNAc) <sub>1</sub> (Pent) <sub>2</sub> (Sulph) <sub>1</sub>	617.313	167-171 SLNER	1165.441

Similar to tropomyosin [*Culex quinquefasciatus*]

Iones masa no semejantes a D7 y pertenecientes a otra posibles proteínas de *A. aegypti*

A) Similra a la subunidad 1 de Guanilato ciclasa, B) Similar a una proteína dedos de zinc putativa de *A. aegypti*, C) Iones masa similares a la secuencia de una proteína correspondiente a tropomiosina.

# Apéndice K

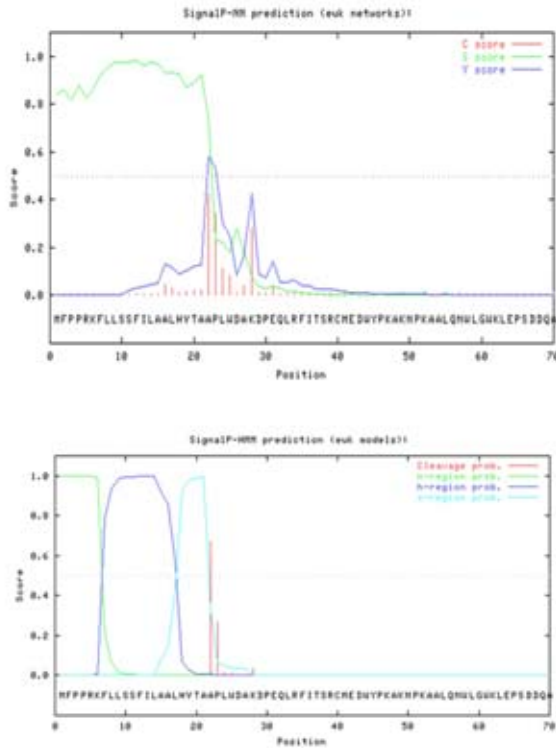
**A**

Score 478 for  
**D7 protein, putative *Aedes aegypti***

Nominal mass ( $M_r$ ): **39173**; Calculated pI value: **9.32**  
 NCBI BLAST search of gi|157113327 against nr

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
115 - 129	1729.0626	1720.0553	1720.9007	-31	0	<b>K.VHDLTSTEDFIPPLK.S</b> (Ions score 108)
115 - 129	1729.0720	1720.0655	1720.9007	-25	0	K.VHDLTSTEDFIPPLK.S (Ions score 100)
115 - 129	1729.0750	1720.0606	1720.9007	-23	0	K.VHDLTSTEDFIPPLK.S (Ions score 97)
205 - 296	1504.6613	1503.6540	1503.6994	-30	1	K.VTHDFKEMFDYR.E (Ions score 93)
205 - 296	1504.6616	1503.6543	1503.6994	-30	1	K.VTHDFKEMFDYR.E (Ions score 97)
205 - 296	1504.6655	1503.6503	1503.6994	-27	1	K.VTHDFKEMFDYR.E (Ions score 93)
291 - 296	800.3231	799.3150	799.3501	-43	0	K.ERFDYR.E (Ions score 41)
291 - 296	800.3247	799.3174	799.3501	-41	0	K.ERFDYR.E (Ions score 36)
291 - 296	800.3297	799.3224	799.3501	-35	0	K.ERFDYR.E (Ions score 38)

**B**



A) Analisis de MALDI-ToF de la proteína de 45 kDa de la saliva de *Aedes aegypti* la cual contiene residuos de ácido sialico y una al virus dengue. B) Modelo Neural y de Markov para el análisis de péptido señal en la secuencia de la proteína D7 de la saliva de *A. aegypti*. Se muestra el probable sitio de corte entre los aminoácidos 21 y 22 en ambos modelos.

## Publicaciones

## Research Article

# Sialic Acid Expression in the Mosquito *Aedes aegypti* and Its Possible Role in Dengue Virus-Vector Interactions

Jorge Cime-Castillo,<sup>1</sup> Philippe Delannoy,<sup>2</sup> Guillermo Mendoza-Hernández,<sup>3</sup> Verónica Monroy-Martínez,<sup>1</sup> Anne Harduin-Lepers,<sup>2</sup> Humberto Lanz-Mendoza,<sup>4</sup> Fidel de la Cruz Hernández-Hernández,<sup>5</sup> Edgar Zenteno,<sup>3</sup> Carlos Cabello-Gutiérrez,<sup>6</sup> and Blanca H. Ruiz-Ordaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Molecular Biology and Biotechnology Department, Biomedical Research Institute, National University of México (UNAM), 04510 México City, Mexico

<sup>2</sup> Structural and functional Glycobiology Unit, UMR 8576 CNRS, University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>3</sup> Biochemistry Department, Faculty of Medicine, UNAM, 04510 México City, Mexico

<sup>4</sup> CISEI, National Institute of Public Health, 62100 Cuernavaca, MOR, Mexico

<sup>5</sup> Infectomics and Molecular Pathogenesis Department, CINVESTAV-IPN, 07360 México City, Mexico

<sup>6</sup> Virology Department, National Respiratory Institute (INER), 14050 México City, Mexico

Correspondence should be addressed to Blanca H. Ruiz-Ordaz; bhro@unam.mx

Received 25 July 2014; Accepted 24 September 2014

Academic Editor: Michael J. Conway

Copyright © Jorge Cime-Castillo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Dengue fever (DF) is the most prevalent arthropod-borne viral disease which affects humans. DF is caused by the four dengue virus (DENV) serotypes, which are transmitted to the host by the mosquito *Aedes aegypti* that has key roles in DENV infection, replication, and viral transmission (vector competence). Mosquito saliva also plays an important role during DENV transmission. In this study, we detected the presence of sialic acid (Sia) in *Aedes aegypti* tissues, which may have an important role during DENV-vector competence. We also identified genome sequences encoding enzymes involved in Sia pathways. The cDNA for *Aedes aegypti* CMP-Sia synthase (CSAS) was amplified, cloned, and functionally evaluated via the complementation of LEC29.Lec32 CSAS-deficient CHO cells. *Aedes*CSAS-transfected LEC29.Lec32 cells were able to express Sia moieties on the cell surface. Sequences related to  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase were detected in the *Aedes aegypti* genome. Likewise, we identified Sia- $\alpha$ -2,6-DENV interactions in different mosquito tissues. In addition, we evaluated the possible role of sialylated molecules in a salivary gland extract during DENV internalization in mammalian cells. The knowledge of early DENV-host interactions could facilitate a better understanding of viral tropism and pathogenesis to allow the development of new strategies for controlling DENV transmission.

## 1. Introduction

Dengue fever (DF) is the most important and rapidly expanding arthropod-borne viral disease in tropical areas. Dengue virus (DENV) infection affects more than 100 million people worldwide each year, and 2.5 billion people live in areas of risk [1]. DF is caused by any of the four antigenically distinct dengue virus serotypes (DENV 1–4), which are transmitted to humans by the hematophagous mosquitoes *Aedes* (*Ae.*) *aegypti* and *Ae. albopictus*. The recent increase in

DF and dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome, now known as severe dengue, is associated with the vector's expansion to new geographic areas [2]. Severe dengue is a highly pathogenic disease, so the development of a dengue vaccine is a high priority for protecting people at risk, but no safe vaccine is available at present. Therefore, mosquito control is the primary option for preventing dengue outbreaks [3]. *Ae. aegypti* females have a key role in DENV-vector competence, which refers to the vector's permissiveness to infection, replication, and viral transmission [3, 4].

The female mosquito acquires DENV from an infected person during blood feeding. The virus undergoes its first replication cycle in the mosquito midgut, before spreading into the hemocoel and finally infecting the salivary glands (SGs). The transfer of infectious saliva into a human host (during a new blood feeding) is a key event during the DENV transmission cycle [4, 5]. Thus, it is very important to identify the molecules involved in the DENV-SG relationship because mosquito saliva is rich in glycoproteins that participate in different host responses (platelet activation, swelling, itching, and inflammation), as well as the binding and transport of vector-borne pathogens to host tissues, thereby allowing pathogens to infect and evade the host immune response [5]. In an ample range of disease models, including various hosts, mosquito species, and arthropod-borne viruses, mosquito saliva and/or mosquito feeding are associated with a potentiation of the arbovirus (arthropod-borne) infection. Host infection via vector saliva leads to an increase in viral transmission, host susceptibility, disease progression, and mortality [6]. The potential for mosquitoes to influence the course of West Nile virus (WNV) disease was investigated by assessing pathogenesis in the presence or absence of mosquito saliva [6]. Likewise, *in vitro* and *in vivo* models of saliva-mediated enhancement of DENV infectivity have been reported [7], but it is uncertain whether *Aedes* saliva glycosylated molecules contributes to DENV tissue infection. The *Aedes* sialome includes 136 putative secretory proteins, which could modify host responses [8]. During DENV-vector infection, the main genes upregulated in *Ae. aegypti* are related to carbohydrate expression [9], but the roles of glycans in vector competence are currently unknown. In addition, it is known that certain glycosidases affect the binding of DENV to mammalian (green monkey kidney and Vero) and mosquito (C636 and AP61) cell surfaces [10]. Previously, it was reported that  $\beta$ -glucosidase, sialidase, and heparinase reduce DENV attachment to mammalian cells but not to insect cells [10], and the inability of sialidase to affect DENV binding to insect cells is associated with a lack of mosquito sialyltransferase (ST), which is capable of transferring sialic acid (Sia) residues to mosquito glycoproteins [11]. Moreover, the occurrence of Sia in mosquito tissues is also unknown. However, the genetic and biochemical capacity for sialylation in *Drosophila melanogaster* supports a hypothesis that insect sialylation is a specialized and developmentally regulated process in insects [12–16]. This process is involved in the regulation of neural transmission in the nervous system of *D. melanogaster* [17, 18]. It is well known that sialylated glycoproteins modulate many important biological processes, including cellular and molecular recognition, subcellular and cellular trafficking, intercellular adhesion, and signaling and microbial attachment, among others [19]. In the present study, we detected the presence of a functional cytidine monophosphate- (CMP-)Sia synthase (CSAS) in *Ae. aegypti*, and we also demonstrated that DENV recognizes  $\alpha$ -2,6-linked Sia structures on the surface of mosquito tissues, which may play key roles during early DENV-vector interactions. Furthermore, we found that DENV is capable of interacting with secretory Sia-glycoproteins, which may be involved in

successful DENV-host tissue transmission. To our knowledge, these are the first demonstrations of the functional expression of an *Aedes* CSAS and the presence of Sia moieties in mosquito tissues, which may have important biological consequences for DENV-vector competence. Knowledge of specific early DENV-mosquito interactions could facilitate a better understanding of viral tropism and pathogenesis to allow the development of new effective strategies for the control of DENV transmission, as well as the improvement of antiviral agents and vaccines.

## 2. Materials and Methods

**2.1. DENV Propagation and Titration.** DENV New Guinea C strain serotype 2 (DENV-2, kindly donated by Dr. Duane Gubler, CDC Fort Collins, CO, USA) was propagated in C6/36 cells, which were grown at 28°C in supplemented minimal essential medium (MEM). Confluent monolayers were infected for 2 h at a multiplicity of infection (MOI) of 1 and incubated for 5–7 days at 28°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere until cytopathic effects were observed, before titrating in a lytic plaque assay using LLC-MK2 cells, as described previously [20]. The virus titer was expressed as plaque-forming units (pfu) per milliliter.

**2.2. *Ae. aegypti* Maintenance, Salivary Glands, Midgut Isolation, and Tissue Extracts.** Female *Ae. aegypti* mosquitoes were cultured in an insectarium at the Center for Infectious Disease Research (CISEI-INSP), Mexico. The SGs and midguts of female mosquitoes (at least three days old and fed only with water) were dissected using a microneedle, placed in sterile tubes in groups of 20 pairs with 20  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS) and kept at –75°C. The tissues were lysed during five freeze-thaw cycles using liquid nitrogen and sonicated (ultrasonic 8849-00; Cole-Parmer, IL, USA) for 10 min before centrifugation at 3500 rpm to obtain tissue extracts. The protein concentration was determined using a micro-BCA (bicinchoninic acid) assay (Pierce, USA) at 562 nm with a spectrophotometer (Multiskan Ascent 354, Thermo LabSystem UK).

**2.3. *Ae. aegypti* Saliva Collection.** *Ae. aegypti* saliva was collected as described by Almeras et al. [21], with a small number of modifications. Female mosquitoes were sedated for 1 min at 4°C, and the proboscis of each mosquito was placed in a plastic pipette tip containing mineral oil. After 1 h salivation at room temperature (RT), the liquid was collected from the tip, and the saliva from 20 mosquitoes was pooled, before centrifugation at 10,000 rpm. The protein concentration was estimated using a micro-BCA assay.

**2.4. Carbohydrate Determination in *Ae. aegypti* Salivary Glands.** The salivary glands of female *Ae. aegypti* mosquitoes were dissected as described above, and the SG monosaccharides were analyzed according to Kamerling et al. [22] by GC/MS as trimethylsilyl methyl glycosides (by the Structural and Functional Glycobiology Unit of the University of Sciences and Technologies of Lille, France). Briefly, dry samples were methanolized in methanol/HCl



0.5 N, N-reacetylated, and trimethylsilylated in a mixture of N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and pyridine (1:1), before injection into a gas chromatograph with a BPX70 12 m × 0.22 mm diameter column (Chrompack).

**2.5. Identification of Sia in *Ae. aegypti* Midguts by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).** Midguts were homogenized in water, lyophilized, and incubated in 1 mL 0.1 M TFA at 80°C for 2 h. The samples were centrifuged at 5000 rpm for 15 min, and two volumes of cold ethanol were added to the supernatant. To obtain exact analytical data and to avoid false-positive results, the lyophilized Sias were dried, resuspended in 100 µL of water, and passed successively through 50 × 2 (200 × 400 mesh) and 50 × 8 (25×50 mesh) Dowex (100 µL) anion exchange columns (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). This sequential cation and anion exchange chromatography process was described in detail in a previous study [23]. The columns were eluted with three volumes of water. The total volume was dried, diluted in one volume of 0.01 M trifluoroacetic acid (TFA), and analyzed by HPLC using a Hewlett-Packard model 1100 liquid chromatography system (Palo Alto, USA), as follows. In the HPLC analysis, Sia was derivatized using 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene, according to Hara et al. [24], and separated isocratically in a C-18 reverse phase Sep-PaK HPLC column (250 × 4.6 mm, 5 µm; Vydac, Hesperia, CA, USA) using a solvent mixture of acetonitrile/methanol/water (7:9:84), followed by identification based on the elution positions of standard Neu5Ac derivatives.

**2.6. Lectin Histochemistry of *Ae. aegypti* SGs and Midguts.** *Ae. aegypti* SGs and midguts were placed on slides and fixed, and the tissues were then blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) for 30 min at RT, washed with PBS for 5 min, and immersed in PBS-Triton X-100 (0.2%) for 10 min. Next, they were washed with PBS-Ca<sup>2+</sup> (1 mM) for 10 min and incubated with different biotin-conjugated lectins, that is, *Maackia amurensis* lectin (MAA), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), or *Lens culinaris* hemagglutinin (LCH) (EY Laboratories, Inc, USA) at 1:100 dilutions for 2 h at 37°C. The slides were washed with PBS for 10 min and incubated in the dark with ExtrAvidin-fluorescein isothiocyanate (FITC; Zymed Inc., USA) at 1:60. The tissues were then rinsed with PBS-Ca<sup>2+</sup> (1 mM) for 5 min and with deionized water for 5 min. Finally, the samples were mounted with Vectashield 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vectashield, Vector Laboratories, CA, USA) and visualized using a Leica DM fluorescence microscope (DCF-300FX digital camera; Leica Microsystems Digital Imaging, Germany). To evaluate SNA-specific binding, mosquito SGs and different *D. melanogaster* tissues fixed on slides were pretreated with 0.5 IU *Clostridium perfringens* sialidase (Roche Diagnostics, Germany) for 30 min at RT. This sialidase was preincubated with casein and resorufin-labeled according to Twining [25] to prevent protease activity. Samples were incubated in the dark with biotinylated SNA lectin (1:100) and streptavidin-FITC (1:60). The fluorochromes were analyzed in two channels: green for lectins and blue for nuclei. The gut, SGs, and midgut

from *D. melanogaster* were dissected, fixed (as described previously [26]), and incubated with SNA lectin or sialidase. Finally, the images were digitized with the Leica IM1000 version 1.20 program (Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Switzerland).

**2.7. DENV-Lectin Binding Assays.** SGs were fixed on slides and incubated overnight with DENV (10<sup>7</sup> pfu) at 4°C. The samples were washed three times each for 10 min using PBS and incubated for 2 h at 37°C with the anti-DENV protein-E antibody (dengue type-2 virus MAB8702; Chemicon International, CA, USA) at a dilution of 1:300. Next, the samples were washed with PBS for 10 min and incubated for 20 min at RT in the dark with rhodamine-coupled anti-IgG antibody (Zymed Laboratories, Inc., USA) at a dilution of 1:3000. In the competition assays, SGs were incubated with lectins before the addition of DENV. To evaluate the possible participation of Sia in DENV-SG interactions, a DENV-SG competition assay was performed where DENV was preincubated for 1 h with soluble 200 mM Sia (N-acetylneuraminic acid; Sigma-Aldrich) or 1 mM fetuin (DIG Glycan Kit; Roche), before adding it to the SG. Images were acquired in three channels: green for lectins, red for anti-DENV, and blue for nuclei.

**2.8. Trypsin and Sialidase Assays of SGs and Glycoprotein Identification Using a Lectin Blot Assay.** SGs were treated with 0.5 IU of *C. perfringens* sialidase (Roche Applied Science, USA) for 30 min or with 0.075% trypsin (Sigma-Aldrich, Inc, USA) for 5, 15, or 30 min, before the glands were fixed and incubated with DENV. The SGs were incubated with SNA, MAA, or LCH lectins. Finally, images were obtained, as described earlier.

**2.9. SG Glycoprotein Detection by Blot Assay.** Glycoproteins in the SG protein extracts were identified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with a polyacrylamide gradient of 4–20%, which was then stained to detect all carbohydrates using a Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein Gel Stain kit (Molecular Probes, Invitrogen P21855), according to the supplier's protocol. The gel image was captured under a UV transilluminator (Kodak Gel Logic 1550). For the lectin blot assay, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Trans-Blot 162-0112, Bio-Rad), blocked with 1% BSA + 0.2% Tween-20 in PBS, and washed. The membranes were incubated with biotinylated SNA or *Canavalia ensiformis* agglutinin (ConA; EY Laboratories Inc., USA) at a dilution of 1:10 for 3 h at RT, followed by streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (43-4323; Zymed Laboratories Inc., USA) at a dilution of 1:3000 for 1 h at RT. The membranes were then washed with PBS and visualized with luminol (Western Blotting Reagent sc-2048; Santa Cruz Biotechnology, USA). Finally, the membranes were exposed to a film (Kodak).

**2.10. Virus Overlay Protein Binding Assays (VOPBA).** VOPBA was performed as described by Salas-Benito and del Angel [27]. Briefly, SG protein extracts or salivary proteins were

transferred to nitrocellulose membranes, blocked (1% BSA + 0.2% Tween-20 in PBS) for 1 h at RT, washed three times with PBS, and incubated overnight (4°C) with DENV (10<sup>7</sup> pfu) in 1% BSA in PBS + 1 mM CaCl<sub>2</sub>. The membranes were washed with PBS and incubated for 3.5 h at RT with a monoclonal antibody against DENV protein E (MAB 8702; Chemicon International, CA, USA) at a dilution of 1:300. Next, the membranes were washed twice with PBS + 50 mM NaCl and incubated for 1 h at RT with a secondary anti-mouse IgG antibody (1:5000) coupled with peroxidase (81-6520; Zymed Laboratories Inc.). Finally, the membranes were washed, treated with luminol, and exposed to film. To evaluate the role of Sia residues in interactions with DENV, the SG protein extracts and saliva were pretreated with 0.5 IU of *C. perfringens* sialidase (Roche) for 1 h before the overlay assay, as described earlier.

**2.11. DENV Infection of Mammalian Cells in the Presence of *Ae. aegypti* SG Protein Extract.** The internalization of DENV in mammalian cells (LLC-MK2 and wild-type Chinese hamster ovary cells CHO) was assessed in the presence or absence of SG extract protein, where DENV was metabolically labeled with [<sup>35</sup>S]-methionine at 37°C for 1 h. Confluent monolayers of mammalian cells were infected with labeled DENV at an MOI of 1 in the presence or absence of SG proteins extracted from 80 SGs, which were pretreated (or untreated) with 0.5 IU of *C. perfringens* sialidase for 1 h at RT. After infection, the medium was removed, and the cells were washed twice with citrate buffer (10 mM citric acid, 0.05% Tween-20, pH 6.0) and PBS to remove any nonspecifically associated virus after the incubation period, thereby avoiding counting virus that was not internalized. Cells were subsequently lysed and fixed on mats filters (Skatron Instruments, UK). The [<sup>35</sup>S]-methionine level was measured using an LS6500 Scintillation Counter (Beckman Coulter, USA).

**2.12. LC/ESI-MS/MS Analysis.** VOPBA protein bands were selected for protein identification by mass spectrometry (MS) analysis. The bands were carefully excised from Coomassie Brilliant Blue-stained gel and prepared for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Briefly, individual protein bands were destained, reduced, carbamidomethylated, digested with trypsin, and extracted from the gel using a standard in-gel digestion procedure [28]. The volumes of the extracts were reduced by evaporation in a vacuum centrifuge at RT, before adjusting to 20 µL with 1% formic acid. Peptide MS analysis was performed using a 3200 QTRAP System (Applied Biosystems/MDS, USA), which was equipped with a nanoelectrospray source and a nanoflow LC system (1100 Nanoflow Pump; Agilent, Waldbronn, Germany). Mass tuning of the hybrid triple quadrupole linear IT spectrometer was performed using [Glu]-fibrinopeptide B. Sample digests were injected into a Zorbax 300SB C18 column equilibrated with 2% ACN and 0.1% formic acid and separated using a linear gradient of 2% to 7% CAN with 0.1% formic acid over an 80 min period, at a flow rate of 300 nL min<sup>-1</sup>. The interface heater used for desolvation was held at 150°C,

and the spray voltage was 2.4 kV. Spectra were acquired in the automated mode by information-dependent acquisition. Precursor ions were selected in Q1 using the enhanced MS mode. The scan ranges for EMS were set to 400–1500 and 4000 amu s<sup>-1</sup>. Selected ions were subjected to an enhanced resolution scan at a low speed of 250 amu s<sup>-1</sup> over a narrow (30 amu) mass range, followed by an enhanced product ion scan (MS/MS). The precursor ions were fragmented by collision-activated dissociation in the Q2 collision cell using rolling collision energy. The fragmented ions were captured and mass analyzed in the Q3 linear IT. Database searches (Swiss-Prot, NCBIInr, or MSDB) and protein identification were performed using the MASCOT program (<http://www.matrixscience.com/>) with trypsin plus one missed cleavage and carboxyamidomethylation as a fixed modification and methionine oxidation as a variable modification, using a mass tolerance of 0.5 Da for the precursor MWs and 0.3 Da for the fragment MWs. The criteria used to accept a protein hit as a valid identification were two or more tryptic peptide matches with the protein sequence and at least one peptide with  $P < 0.05$ .

**2.13. Analysis of the Protein Glycosylation Sites.** The sequence obtained from the MASCOT database was analyzed with Glycomod [29], which is available at <http://www.expasy.ch/tools/glycomod/>. This program explores the mass values of ions obtained experimentally with MALDI-ToF and their relationships with sequences in the MASCOT database. The search parameters specified N-glycosylated and O-glycosylated proteins, with modifications of oxidized methylation and cysteine-treated iodoacetamide, using a mass tolerance of 0.1 Da.

**2.14. *Ae. aegypti* RNA Purification.** Groups of 25 female mosquitoes were homogenized and sonicated with RNase-free water. The lysates were passed through a 0.9 mm needle. RNA extraction was performed using a Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany), and the RNA quality was evaluated using Agilent RNA Nano 6000 chips (Agilent 2100 Bioanalyzer).

**2.15. *Ae. aegypti* CSAS and ST Gene Synthesis.** BLINK and BLAST searches for CSAS and ST genes were performed using the NCBI tBLAST algorithm based on the CSAS (gi|24667125) and ST (gi|24762715) sequences of *D. melanogaster*. Putative CSAS (XP 001663017) and ST (XP 001649590) genes were identified in the *Ae. aegypti* genome and confirmed by VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>) as AAEL012868 and AAEL014772, respectively. cDNA synthesis was performed using 200 ng of RNA template (QPCR cDNA kit; Stratagene, USA) with random primers. Five microliters of cDNA was used in a 25 µL PCR reaction, which was amplified with Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) as follows: 95°C for 5 min; 38 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, 72°C for 1.5 min, and 72°C for 10 min, holding at 4°C. The following primers were used for *Ae.*CSAS gene synthesis: 5'aedsy (5'GTT GAA TTC CAT GCG GCT AGT TTT GAT 3'), 3'aedsy (5'AAT GGT ACC

TTA TTC TAC TGT GGA TCC 3'), 5'aedtr (5' CAC AAG CTT ATG TTG CGT GAC CTT TCG 3'), 3'aedtr (5' CTA GGT ACC TCA ACA TCC ACT GTT GCT 3'), 5'Act (5' TGG TTA CTC GTT CAC CA 3'), and 3'Act (5' GGC ATA CAG ATC CTT TCG GA 3').

The forward primer 5'aedtr included an *EcoRI* site and the first six codons of *Ae.CSAS*. The 3'aedtr primer contained a *KpnI* site and the last six codons of *Ae.CSAS*. The 5'aedtr forward primer contained a *HindIII* site and the first six codons of the hypothetical *Ae. aegypti* ST sequence, and 3'aedtr included a *KpnI* site and the last six codons of the same sequence. The *Ae. aegypti* actin gene was used as a housekeeping control.

**2.16. *Ae. aegypti* CSAS cDNA Cloning and Sequencing.** The CSAS PCR product was cloned using a Topo vector (Invitrogen) and transformed into *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$ . The cloned cDNA was evaluated by PCR using M13 forward (-20) and reverse primers. The CSAS cDNA was nicked at the *EcoRI* and *KpnI* sites, and subcloned using a p3XFlag-CMV-10 (Sigma-Aldrich) vector. The plasmid sequence was confirmed by PCR using the primers 5'p3 FLAG (5'-GTTGACGCAAATGGGCGGTAG-3') and 3'p3 FLAG (5'-CTTGCCCTTGCTCCATACCAC-3'), as follows: 96°C for 5 min; 38 cycles at 96°C for 45 s, 50°C for 45 s, 72°C for 1 min, and 72°C for 10 min, holding at 4°C. The 786 bp CSAS product was sequenced (Genoscreen, Lille, France).

**2.17. Complementation of CSAS-Deficient Cells with *Ae.CSAS*.** Wild-type CHO cells and LEC29.Lec32 cells, which were deficient in CMP-Neu5Ac synthase, were grown in MEM containing 10% FBS in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. One million LEC29.Lec32 cells were transfected with lipofectamine reagent (Invitrogen) using 5  $\mu$ g of the p3XFlag-CMV-10 vector with the *Ae.CSAS* insert or the empty vector as a control. Cells were harvested at 36 h posttransfection. *Ae. aegypti* Sia expression was evaluated by FACS analysis. Cells were detached and incubated for 1 h at 4°C with biotin-conjugated MAA, washed, and incubated for 1 h on ice with Alexa Fluor 488 conjugated streptavidin (Invitrogen). Appropriate isotype and secondary antibody controls were used. In the FACS analysis, 10,000 cells were analyzed using a FACSCalibur system (Becton Dickinson, USA). *Ae.CSAS* expression was also evaluated by histochemistry; that is, WT CHO and LEC29.Lec32 cells were grown on slides and transfected as described previously. Cells were incubated with MAA lectin and Alexa Fluor conjugated antibody and stained in parallel with DAPI.

**2.18. Hemagglutination Assay with DENV.** The assay was performed as described by Goldsmith (see [30] and Casals and Brown [31]). DENV was propagated in C6/36 cells, purified by ultracentrifugation (see Methods in the paper), and suspended in borate solution (pH 9). Borate solution was used as the negative control. In a microtiter plate, a series of twofold dilutions of the viral stock was generated, which was followed by the addition of a suspension of chicken erythrocytes (4% in borate solution) and incubation of the samples for 1 h at 4°C. The hemagglutination activity was

expressed as a titer defined as the reciprocal of the maximal dilution that gave positive hemagglutination. A parallel assay was performed using the influenza virus.

**2.19. Sialidase-Treated Erythrocytes.** Sialidase-treated erythrocytes were obtained according to Sano and Ogawa [32]. Briefly, native chicken erythrocytes (10%, v/v) were mixed with an equal volume of the incubation buffer (0.1 M acetate buffer containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 5.5) containing sialidase from *Clostridium perfringens* (1 U/mL), which was preincubated with casein and resorufin to prevent protease activity. The sample was incubated at 37°C for 1 h with occasional careful shaking. The cells were washed by centrifugation using cold PBS (pH 7) and stored as a 10% suspension at 4°C until use. The HA assay was carried out as previously described. A parallel assay was performed using the influenza A virus.

**2.20. Statistical Analysis.** Data were expressed as the mean and standard deviation and compared using a Mann-Whitney *U* test with Statistical Analysis Software version 8 (SAS Institute, USA). The significance level was set at  $P < 0.05$ . To identify the D7 protein in MASCOT, and the score for an MS/MS match was based on the absolute probability ( $P$ ) that the observed match between the experimental data and the database sequence was a random event. We used a probability-based MOWSE score; that is, the reported score was  $-10 \log(P)$ , where  $P$  was the probability that the observed match was a random event, and the protein scores were significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

**3.1. Identification of Sia in *Ae. aegypti* Mosquito Tissues and Genes Involved in the Sia Synthesis Pathway.** The total carbohydrate composition of the *Ae. aegypti* SG protein extract was determined by gas chromatography, which showed that the most abundant monosaccharide was N-acetylgalactosamine, with an average of 170  $\mu$ g per 10 salivary glands, followed by mannose (84  $\mu$ g), N-acetylglucosamine (42  $\mu$ g), galactose (16  $\mu$ g), and Sia (Neu5Ac with 7  $\mu$ g). We also assessed the presence of Sia in midguts using HPLC by referring to the retention times of standard Sia derivatives [33]. Sia was determined at a concentration of 1.4  $\mu$ g per single midgut. As a consequence of the presence of Sia in different mosquito tissues, we evaluated the possible existence of genes encoding enzymes involved in Sia synthesis pathways. The sialylation process requires the biosynthesis of glycosyl-nucleotide cytidine 5'-monophosphate-N-acetylneuraminic acid (CMP-Neu5Ac) by CSAS and enzymes from the ST family, which transfer Sia to a glycoprotein or glycolipid acceptor substrate. Therefore, using the available genome database of *D. melanogaster*, we searched for the amino acid (aa) sequences of both enzymes, that is, CSAS (gi|24667125) and D.SialT6 ST (gi|24762715), and we performed BLAST and BLink analyses of the *Ae. aegypti* genome using the NCBI genome database. We detected hypothetical sequences for both proteins, that is, CSAS (XP\_001663017; *Ae.CSAS*) and ST (XP\_001649590; *Ae.ST*), in the *Ae. aegypti* genome,

which were validated in the VectorBase database. The *Ae. aegypti* ST gene sequence was identified and associated with the ST6Gal,  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6Gal) family, which is closely related to *D. melanogaster* D.ST6 and orthologous to the common ancestral gene that was present before the split of ST6Gal I and ST6Gal II [34]. We used these sequences to generate a complementary DNA (cDNA) that comprised 786 bp for *Ae.CSAS* and another of 1396 bp for *Ae.ST* (Figure 1(a)). Likewise, we obtained *Ae. aegypti* cDNAs for *Ae.CSAS* and *Ae.ST* from the SGs and midguts (Figure 1(b)). The *Ae.CSAS* cDNA was cloned into the p3XFlag-CMV vector. Two clones, that is, C4 synthase and C8 synthase, were sequenced, analyzed, and compared with previously reported CSAS sequences (See Figure S1 in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/504187>). Both clones contained the start point of an open reading frame for a protein containing 261 aas, with a molecular mass of 29.8 kDa and a theoretical isoelectric point of 6.72. We detected a polymorphism site in the *Ae.CSAS* gene (Figure 1(c)). In clone 4, a point mutation from A (residue 183) to T changed an aspartic acid (D) residue into glutamic acid (E).

**3.2. Evaluation of *Ae.CSAS* Complementation of CHO Sia-Deficient Cells.** To determine the functional activity of *Ae.CSAS*, a p3XFlag-CMV vector containing the *Ae.CSAS* insert was transfected into CHO LEC29.Lec32 cells [35], which were deficient in CSAS expression and did not express sialoglycoconjugates. Sia expression was evaluated by a flow cytometry (FACS) assay using MAA, which recognizes Sia in  $\alpha$ -2,3-linkages, because CHO cells mainly express  $\alpha$ -2,3-STs [36]. We observed that *Ae.CSAS*-transfected cells expressed  $\alpha$ -2,3-linked Sia (Figure 1(d), blue line) at a similar level to the parental CHO cells, which were used as a positive control (Figure 1(d), magenta line). The intensity of fluorescence in the nontransfected CHO LEC29.Lec32 subpopulation was similar to that in the negative control (Figure 1(d), green and black lines). In addition, nearly 30% of the LEC29.Lec32-transfected cells were able to express Sia (Figure 1(d) shows the fluorescence intensity percentages). To confirm the functional activity of *Ae.CSAS*, we tested for the presence of Sia in *Ae.CSAS*-transfected CHO LEC29.Lec32 cells using an affinity cytochemical assay with MAA lectin. Sia expression was observed on the cell surface of *Ae.CSAS*-transfected CHO LEC29.Lec32 cells (Figure 1(e)), as shown by the FACS assay. These results demonstrate the functional expression of *Ae.CSAS* in *Ae. aegypti*.

**3.3. DENV-Sia Interaction in *Ae. aegypti* Tissues.** The *Ae. aegypti* ST gene is related to the ST6Gal family [37]; thus, we evaluated gene expression based on the presence of  $\alpha$ -2,6-Neu5Ac moieties on the surface of mosquito tissues (SG, head, and midguts) using affinity cytochemistry and confocal microscopy assays with the lectin SNA, which recognizes Sia in  $\alpha$ -2,6-linkages. We observed strong SNA staining in the different mosquito samples (Figure 2(a)). *D. melanogaster* tissues were used as the positive control and are well known [15] to express  $\alpha$ -2,6-linked Neu5Ac moieties (Figure 2(b)). No MAA binding was observed in *Ae. aegypti* tissues, which indicates that *Ae. aegypti* does not express  $\alpha$ -2,3-ST (similar

to *D. melanogaster*, Figure S2). To validate the SNA binding assay, SGs were pretreated with *C. perfringens* sialidase and incubated with SNA lectin. In the absence of sialidase treatment, strong SNA staining was observed in *Ae. aegypti* mosquito and *D. melanogaster* tissues (Figures 2(a) and 2(b)). However, the SNA binding decreased after sialidase treatment of the mosquito and *D. melanogaster* tissues (Figure 2(c)).

SG is the main tissue where DENV is replicated and amplified in the mosquito before transmission to its vertebrate host; thus, we evaluated the possible role of Sia in DENV-SG interaction. We performed a binding assay with *Ae. aegypti* SG in the presence of different lectins (SNA, LCH, or ConA). Figure 3(a) shows that there was a positive DENV-SG interaction in the absence of SNA lectin. However, DENV binding decreased when  $\alpha$ -2,6-Sia residues were blocked with SNA (Figure 3(b)), whereas the blocking of mannose residues with ConA or LCH did not modify the DENV-SG interaction (Figure 3(b); DENV-midgut interaction Figure S3). To confirm the possible role of Sia during DENV-SG binding, SGs were pretreated with *C. perfringens* sialidase at 30 min prior to DENV addition. We observed a large decrease in the DENV-SG interaction when the SGs were pretreated with sialidase (Figure 3(c)). To evaluate the specific role of Sia in DENV-SG binding, we performed a DENV-SG competition assay using free Neu5Ac and sialylated glycoprotein fetuin. We observed that the DENV-SG interaction decreased in the presence of fetuin, and it was lost in the presence of free Neu5Ac (Figure 3(c)), thereby suggesting the involvement of Sia in DENV-SG recognition. SGs were pretreated with trypsin for 5, 15, or 30 min to determine whether the sialylated molecules related to DENV-SG were proteins (Figure 3(d)). The interaction with DENV decreased after 15 min of incubation and it was abolished completely at 30 min. These data suggest the possible participation of sialylated glycoproteins in DENV tissue attachment.

**3.4. Detection of *Ae. aegypti* SG Glycoproteins by Blot Assays.** To confirm the presence of total sugars in the SG protein extracts from *Ae. aegypti* and to characterize the putative glycoprotein(s) that may recognize DENV, we separated the SG proteins by electrophoresis and stained them to detect any carbohydrates. The SG protein extracts were transferred to nitrocellulose membranes and subjected to a western blot assay. The membrane was also incubated with ConA or SNA lectins (Figures 4(b) and 5(a), lane 9). For the control assay, we used a carbohydrate staining kit (Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein Gel Stain Kit, Molecular Probes; Figure 4(a), lane 1), and we observed a range of glycoproteins from 29 kDa to 116 kDa, with more intense bands of 29, 45, and 66 kDa. When we incubated the SG protein extracts proteins with ConA, we observed a glycoprotein of 50–60 kDa, which has not been identified previously with the carbohydrate staining kit. We also observed an increase in the intensity of the band at 97 kDa. Therefore, these proteins could have contained mannose and glucose residues (Figure 4(b)). The interaction with SNA produced several bands that ranged from 10 to 97 kDa (Figure 5(a), lane 9), so these proteins could possess Sia motifs. In agreement, we observed no significant changes

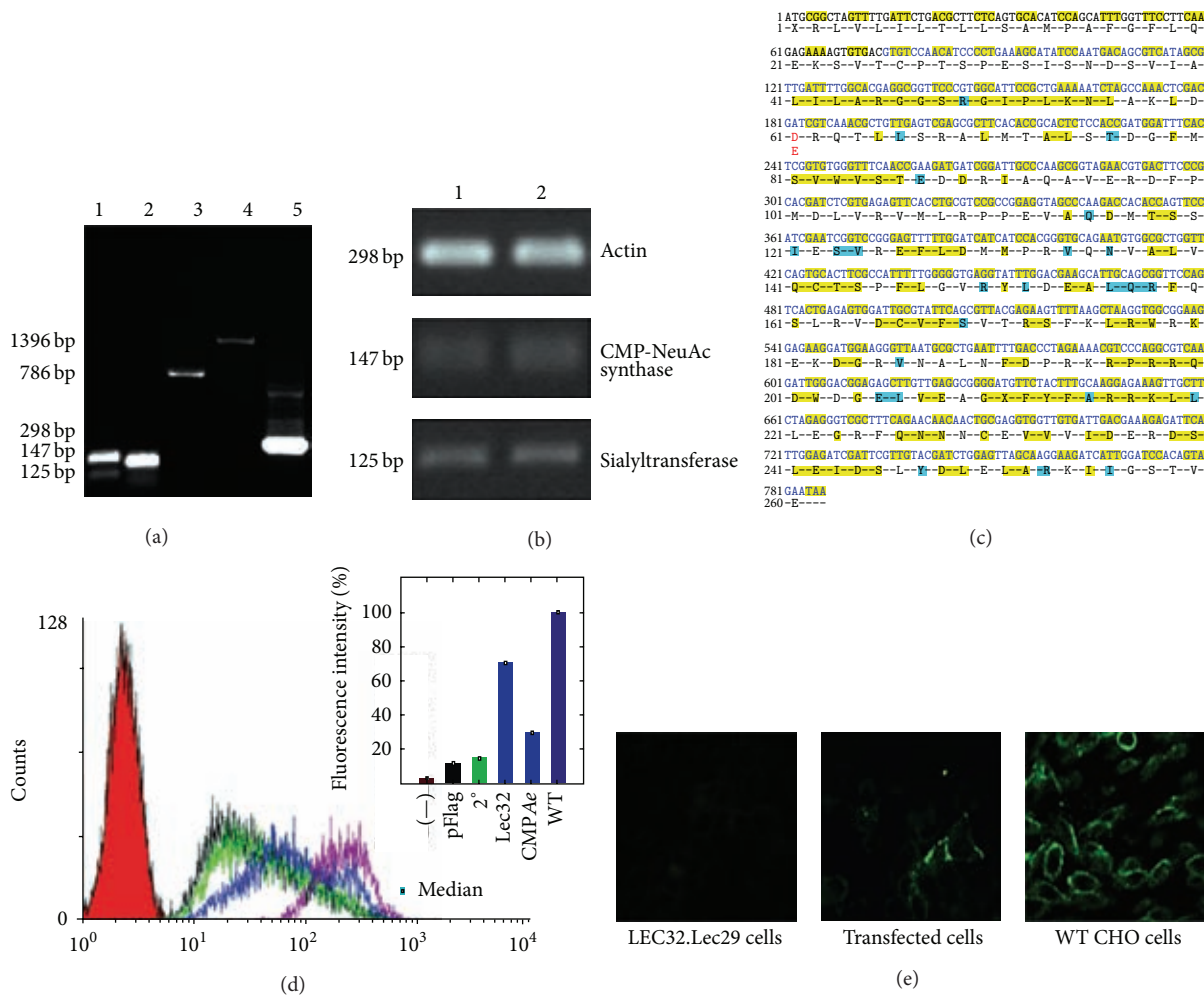


FIGURE 1: *Ae.CSAS* functional expression evaluation. (a) RT-PCR analysis of *Ae.CSAS* and *Ae.ST*. The figure shows the bands obtained with the internal and external primers of each enzyme using a whole extract of *Ae. aegypti* mosquito. Lanes 1-2: *Ae.CSAS* (147 bp) and *Ae.ST* (125 bp) sequences obtained using the internal primers. Lanes 3-4: *Ae.CSAS* (786 bp) and *Ae.ST* (1396 bp) complete sequences obtained with the external primers. Lane 5: *Ae. actin* (298 bp) was used as a housekeeping gene control. (b) RT-PCR analysis of *Ae.CSAS* and *ST* using total RNA from five pairs of *Ae. aegypti* SGs (lane 1) and five midguts (lane 2): *Ae.CSAS* (147 bp); *Ae.ST* (125 bp); and actin control (298 bp). (c) cDNA and aa sequences of *Ae.CSAS*. Identical residues in yellow show multiple alignments with different sequences from other organisms (Figure S1), whereas conserved residues are indicated in blue. (d) Flow cytometry analysis using LEC29.Lec32 untransfected and transfected cells with *Ae.CSAS*, which were incubated with MAA lectin to evaluate Sia expression. Red: isotype control; black: LEC29.Lec32 cells transfected with empty p3XFlag-CMV vector (negative control); green: untransfected cells in the presence of secondary antibody only; blue: LEC29.Lec32 transfected with *Ae.CSAS* cDNA; and magenta: wild-type CHO cells (positive control for the expression of  $\alpha$ -2,3Sia). The bars show the percentage of fluorescence intensity. Approximately 30% of LEC29.Lec32-transfected cells expressed Sia (blue bar) compared with 100% Sia expression in the positive control CHO cells (magenta bar). (e) Affinocytochemistry and confocal microscopy assays using MAA lectin staining to assess Sia expression. Left: LEC29.Lec32-transfected cells with an empty pFlag vector. Center: LEC29.Lec32-transfected cells with the *Ae.CSAS* pFlag vector. Right: wild-type CHO positive control transfected with an empty pFlag vector.

when we pretreated the SG protein extracts with sialidase (Figure 5(a), lanes 2 and 3).

**3.5. Identification of DENV Attachment Glycoproteins in *Ae. aegypti* SGs and Saliva.** To identify putative sialylated glycoproteins involved in DENV-SG interactions, different VOPBAs were performed using *Ae. aegypti* SGs and saliva. We observed that DENV interacted with different SG proteins with approximate molecular weights (MWs) of 115, 95, 65, 62, 51, 37, 34, 32, 17, 15, and 9-10 kDa (Figure 5(a), lane 10).

The proteins with MWs from 65 to 9 kDa were also observed in the samples detected with SNA lectin (Figure 5(a), lane 9). To test the possible participation of Sia in DENV-mosquito protein interactions, we performed a parallel VOBPA assay, where we pretreated protein extracts from the SGs or saliva with sialidase. Interestingly, DENV protein binding was partially or totally abolished in both cases (Figure 5(a), lane 11; Figure 5(b), lane 2). It was also interesting that the SG proteins of 95 and 65 kDa, which did not interact with SNA lectin (Figure 5(a), lane 9), were not affected in the VOBPA

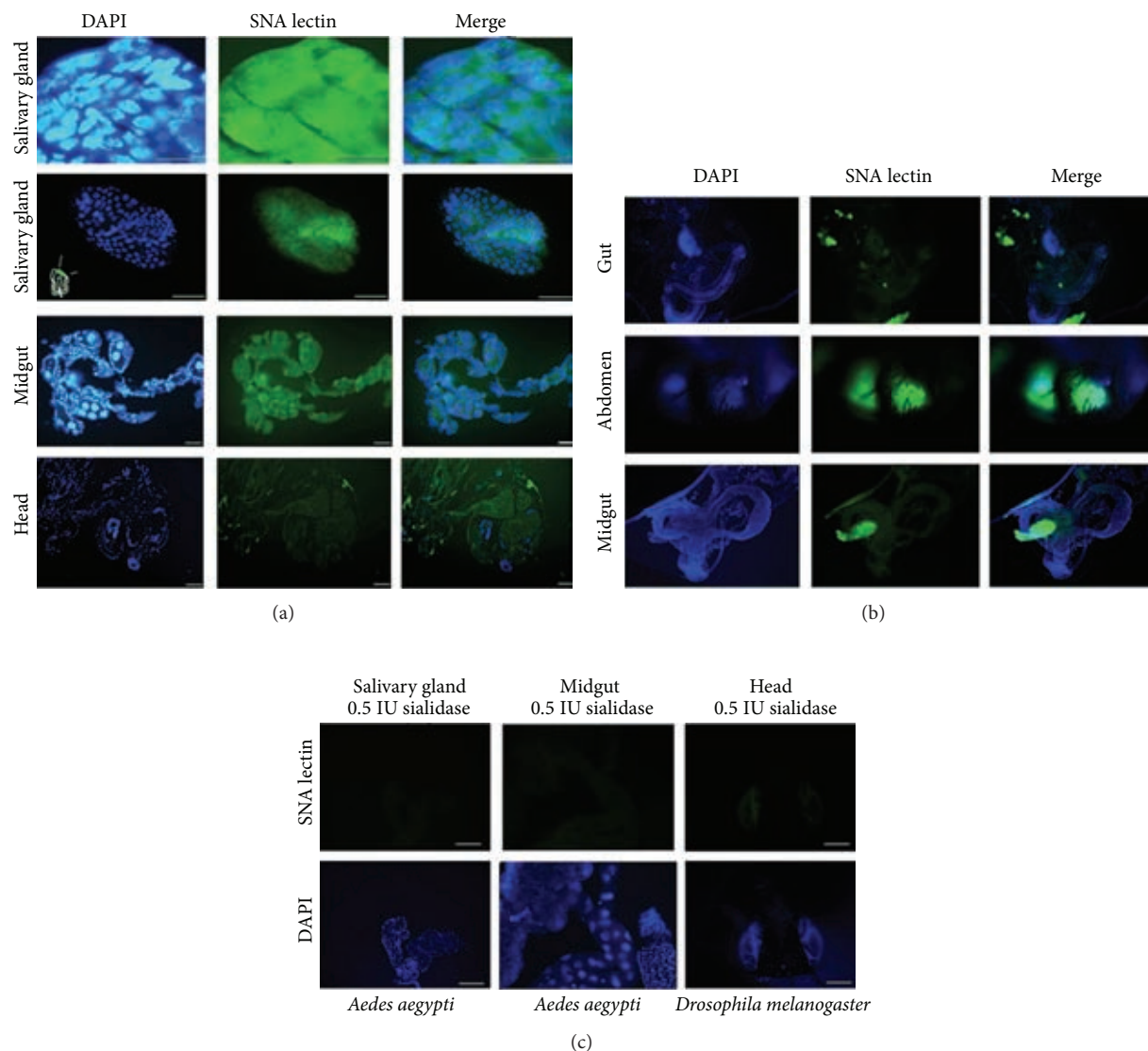


FIGURE 2: Lectin histochemistry of *Ae. aegypti* tissues. (a) Results of  $\alpha$ -2,6-linked Sia detection in *Ae. aegypti* SG, midgut, and head incubated with SNA lectin (1:100) and stained with FITC. SG, upper panel: 60x microscopic magnification, lower panel: 40x lens. The inner box in the SG-DAPI panel shows the SG region analyzed. To identify Sia, the midgut and head transverse sections were evaluated with SNA lectin (green) (20x magnification). (b) Results for the  $\alpha$ -2,6-linked Sia positive control in *D. melanogaster* abdomen, gut, and midgut using SNA lectin, which are similar to those for *Ae. aegypti* tissues. (c) SNA staining of mosquito SG and midgut pretreated with 0.5 IU sialidase for 30 min before SNA incubation. The control comprised *D. melanogaster* heads pretreated with sialidase. Blue: nuclei stained with DAPI. Green: (FITC) SNA lectin interaction.

pretreated with sialidase (Figure 5(a), lane 11). In the saliva-DENV binding assay, we observed a protein with a MW of 45 kDa (Figure 5(b), lane 3), which was also present in the samples with SNA lectin (Figure 5(b), lane 1), but it was eliminated when we used sialidase in the VOPBA (Figure 5(b), lane 2). Thus, we propose that the DENV-mosquito SG interaction is at least partially dependent on the presence of Sia residues. We used the sialylated glycoprotein fetuin as a positive control for SNA lectin (Figure 5(a), lanes 4 and 12), whereas asialofetuin (Figure 5(a), lanes 5 and 13) and fetuin pretreated with *C. perfringens* sialidase were used as the negative controls (Figure 5(a), lanes 6 and 14).

**3.6. Identification of *Ae. aegypti* SG and Saliva Glycoproteins by LC/ESI-MS/MS.** The different DENV-SG and DENV-saliva binding proteins observed in the VOPBAs were identified by LC/ESI-MS/MS analysis. The identities of the SG and saliva proteins are shown in Table 1. The DENV-SG binding proteins were as follows: (1) *Aedes* apyrase, which is a protein that hydrolyzes ATP and ADP to adenosine, thereby inhibiting ADP-dependent platelet aggregation; (2) *Aedes* salivary serpin, which is an anticoagulant molecule that inhibits coagulation factor Xa [38]; and (3) the *Aedes* long form of the D7 salivary protein. D7 is the most abundant subfamily of salivary proteins, and they are classified as

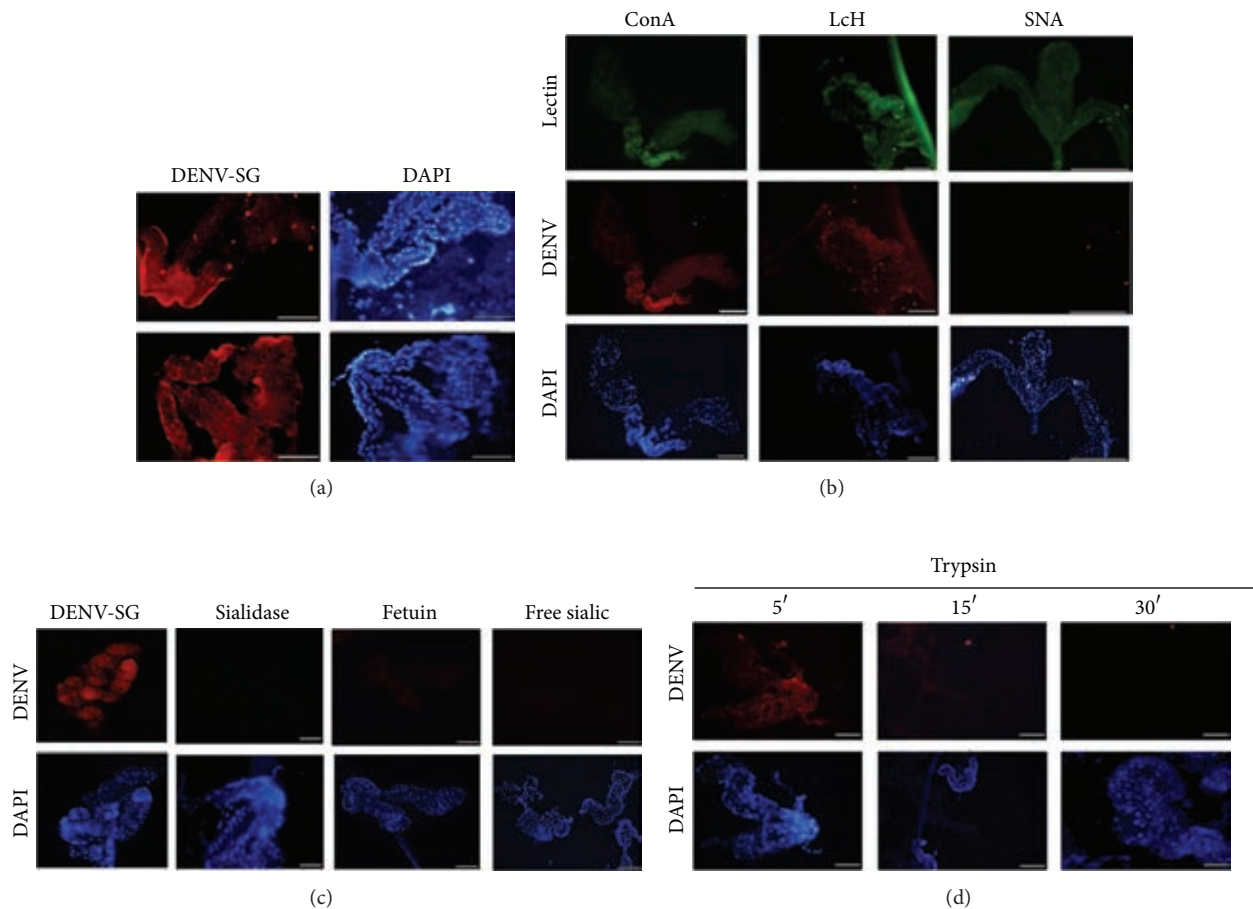


FIGURE 3: DENV interaction with *Ae. aegypti* SG. (a) DENV interaction with *Ae. aegypti* SGs. SGs from *Ae. aegypti* were incubated with DENV and stained with anti-DENV E antibody and rhodamine-coupled anti-IgG antibody. (b) DENV-SG competence assays using ConA, LcH, and SNA lectins, which were added to SG before incubation with DENV. The interaction with DENV was blocked when DENV was incubated in the presence of lectins that recognized Sia. With LcH and ConA lectins, the magnification = 10x and with SNA lectin = 20x. Scale bar = 10  $\mu$ m. (c) DENV-SG interaction in the absence or presence of sialidase. SGs were untreated or pretreated with *C. perfringens* sialidase for 30 min before adding DENV. The DENV-SG interactions in the presence of Sia competitors, fetuin (1 mM) and free Sia (200 nM), are also shown, where the DENV-SG interaction was blocked. (d) DENV-SG interaction in SGs pretreated with trypsin for 5, 15, or 30 min before adding DENV. There was a decrease in the DENV-SG interaction after 15 min, and it was lost completely at 30 min. Scale bar = 10  $\mu$ m. Blue: nuclei stained with DAPI. Red: DENV stained with an antibody against viral protein E and a secondary antibody coupled to rhodamine. Green: (FITC) SNA lectin interaction.

odorant pheromone-binding proteins, although they also function as scavengers of biogenic amines [39]. They also include (4) the *Aedes* 30-kDa SG allergen. Glycosylated proteins are associated with allergies [40]. Another one of the DENV-SG binding proteins is (5) the *Aedes* putative 34 kDa secreted salivary protein, which is distributed widely in mosquito saliva. The protein product of the 34 kDa family had significant matches with cytoskeletal proteins such as actin and myosin, mainly because of the presence of a repeated charged aa [41]. Another one of the DENV-SG binding proteins is (6) the *Aedes* 14.5 kDa salivary protein, which has an unknown function. Another one of the DENV-SG binding proteins is (7) the *Aedes* short form of the D7 salivary protein, which can bind biogenic amines such as serotonin, histamine, and epinephrine [41]. The sequestration of biogenic amines during mosquito feeding is an important

function that inhibits platelet aggregation, vasoconstriction, and inflammation. Another one of the DENV-SG binding proteins is (8) the *Aedes* putative C-type lectin. In mammalian cells, two membrane C-type lectins, DC-SIGN and L-SIGN, interact with DENV via high-mannose glycans on viral glycoproteins [42], while another C-type lectin, the mannose receptor, interacts with the DENV envelope protein, which may enhance viral attachment to phagocytes [43]. It has also been demonstrated that the *Ae. aegypti* C-type lectin recognizes West Nile virus *in vivo* and *in vitro* during cell infection [44]. Another one of the DENV-SG binding proteins is (9) the *Aedes* beta subunit protein translocation complex. Silencing of the *Drosophila* and human ortholog gene (Sec61) of the beta subunit protein significantly reduces DENV infections in the S2 cell line and HuH-7 cells [45]. The ion masses and the sequences of the SG proteins involved

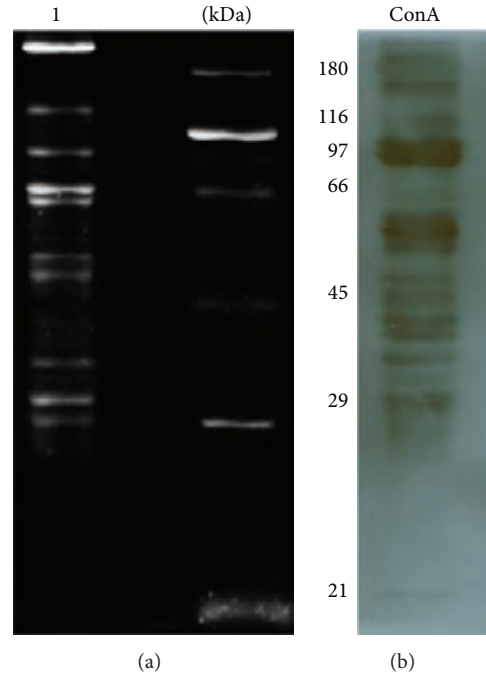


FIGURE 4: SDS-PAGE assay of the glycoproteins from *Ae. aegypti* SG protein extracts. (a) Total carbohydrates stained with Pro-Q Emerald, where the molecular weights are shown on the right. (b) Western blot assay using ConA lectin, which binds to glycoproteins that contain mannose or glucose residues.

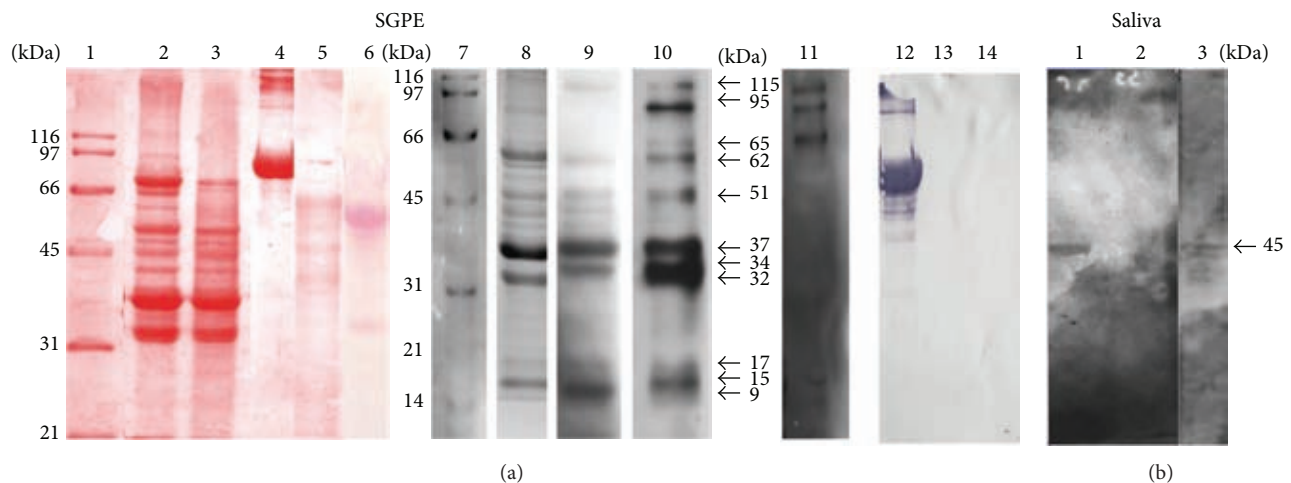


FIGURE 5: DENV overlay assay with *Ae. aegypti* SG protein extract (SGPE) and *Aedes* saliva in the presence or absence of *C. perfringens* sialidase. (a) DENV-SGPE interactions. Lanes 1–6 show nitrocellulose membranes stained with Ponceau red. Lane 1: MW markers; lane 2: SGPE; lane 3: SGPE pretreated with sialidase; lane 4: fetuin glycoprotein; lane 5: asialofetuin; and lane 6: fetuin pretreated with sialidase. Lanes 7–12 show the blot and overlay assays of SGPE. Lane 7: MW markers; lane 8: SGPE; lane 9: blot of SGPE with SNA lectin; lane 10: DENV overlay with SGPE; lane 11: DENV overlay with SGPE pretreated with sialidase; lane 12: blot of fetuin glycoprotein with SNA lectin; lane 13: blot of asialofetuin with SNA lectin; and lane 14: blot of SNA lectin with fetuin pretreated with sialidase. (b) DENV-saliva interactions. Lane 1: blot of mosquito saliva with SNA lectin; lane 2: DENV overlay with saliva pretreated with sialidase; and lane 3: overlay of DENV-saliva proteins.

in DENV interactions were evaluated using Glycomod to determine whether the proteins were putative glycoproteins with Sia motifs (Supplementary File 1).

The 45-kDa saliva protein that interacts with specific lectins for Sia as well as with DENV is similar to the peptide

ion mass of the protein NCBI: gi|157113327 [Vectorbase: AAEL006417-RA], which is a putative molecule in the D7 family of *Ae. aegypti*. It had a 35% match in its primary sequence, with a score of 178 and an expected value of  $6.4^{-13}$  ( $P < 0.05$ ). Based on the analysis of the sequence



TABLE 1: Identification of DENV-2 binding proteins from *Ae. aegypti* SGs and saliva proteins.

Protein name	NCBI accession number	MW (kDa)		Number of matched peptides	Score	Sequence coverage (%)
		Gel	Database			
<b>SG protein extract</b>						
Apyrase [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 556272	62.820	62.691	14	404	19%
Salivary serpin [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 94469320	51.617	47.765	49	712	60%
D7 protein, putative [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 157113327	37.200	38.603	46	862	44%
Long form D7Bclul salivary protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 16225992	37.200	38.579	5	86	15%
D7 protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 159557	37.200	37.005	3	51	9%
Putative 34 kDa secreted protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 18568296	34.833	36.154	18	547	33%
Putative 34 kDa family secreted salivary protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 94468336	34.833	35.698	20	533	33%
30 kDa salivary gland allergen Aed a 3 [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 2114497	32.628	27.130	37	479	55%
Allergen, putative [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 157133926	32.628	29.529	13	216	31%
Short form D7Cclu23 salivary protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 16225995	16.947	17.676	10	150	24%
Putative salivary C-type lectin [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 94468370	16.947	17.202	5	104	17%
Putative 14.5 kDa salivary protein [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 94468650	14.862	17.039	6	117	40%
Protein translocation complex beta subunit, putative [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 157138304	9.397	10.329	2	75	24%
<b>Saliva</b>						
D7 Protein putative [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gi 157113327	45.23	39.173	18	178	35%

Proteins were identified by LC/ESI-MS/MS analysis after gel trypsin digestion. The table shows the protein name, the NCBI accession number, the theoretical (database) and observed (gel) MWs, the number of peptide sequences matched in the MASCOT database, the corresponding percentage sequence coverage, and the MASCOT score. The criteria used for accepting a protein as a valid identification were two or more tryptic peptide matches with the protein sequence and at least one peptide with  $P < 0.05$ .

of the putative D7 protein from *Ae. aegypti*, we identified a transmembrane region between aa residues 7 (phenylalanine) and 24 (leucine) from the amino terminus (Figure S4). Therefore, it can be considered as a membrane protein, although it has been suggested that members of this family of proteins are secreted in the salivary glands of various mosquitoes [46, 47]. We also noted that the D7 protein contains potential N-glycosylation sites, specifically in the region of aas 278–284 (Supplementary File 1). There were two possible combinations of carbohydrates involving Sia: the first was combined with hexose, and the second with N-acetylglucosamine or N-acetylgalactosamine. We evaluated the potential Sia-glycosylation sites some of which have little differences in terms of the ionic masses obtained with MALDI-ToF (experimental mass), the theoretical mass of the glycopeptides, and the carbohydrate mass. In addition, we only considered differences of  $<0.05$  Da, and three peptide regions in the D7 protein had these characteristics. Between residues 35–39, there were two possible combinations of O-linked glycosylation via the hydroxyl groups of serine and threonine: the first combination involved the binding of Sia to two molecules of N-acetylglucosamine or N-acetylgalactosamine; and the second involved a combination with hexose, NeuAc, and ketodeoxynonulosonic acid.

The second peptide with the potential to be O-glycosylated was in the region of aas 285–290, where a threonine residue could be linked to pentose, N-acetylglucosamine, or N-acetylgalactosamine, and Sia residues. Finally, there was a serine residue in the region of aas 311–316, where the difference between the experimental mass and theoretical mass was only 0.019 Da. Therefore, it is possible that a Sia residue linked to a deoxyhexose occurs in this region.

**3.7. DENV Infection of Mammalian Cells in the Presence of *Ae. aegypti* SG Protein Extracts.** It is known that *Ae. aegypti* saliva enhances West Nile and Cache Valley virus infections, but it is unknown whether *Aedes* saliva can modulate DENV infections [6]. Based on our detection of interactions between DENV and salivary glycoproteins, we evaluated the possible participation of the *Ae. aegypti* SG protein extract in the modulation of DENV infection in different mammalian cell lines (LLCMK2 and CHO WT) using a DENV internalization assay, in the presence or absence of SG extracts. We found that DENV infection was enhanced in the presence of SG extract in both mammalian cell lines (Figure 6(a)). CHO cells appeared to be more permissive (fourfold enhancement; Figure 6(a), lane 7) than LLCMK2 (twofold enhancement; Figure 6(a), lane 3). We pretreated the SG protein extract with

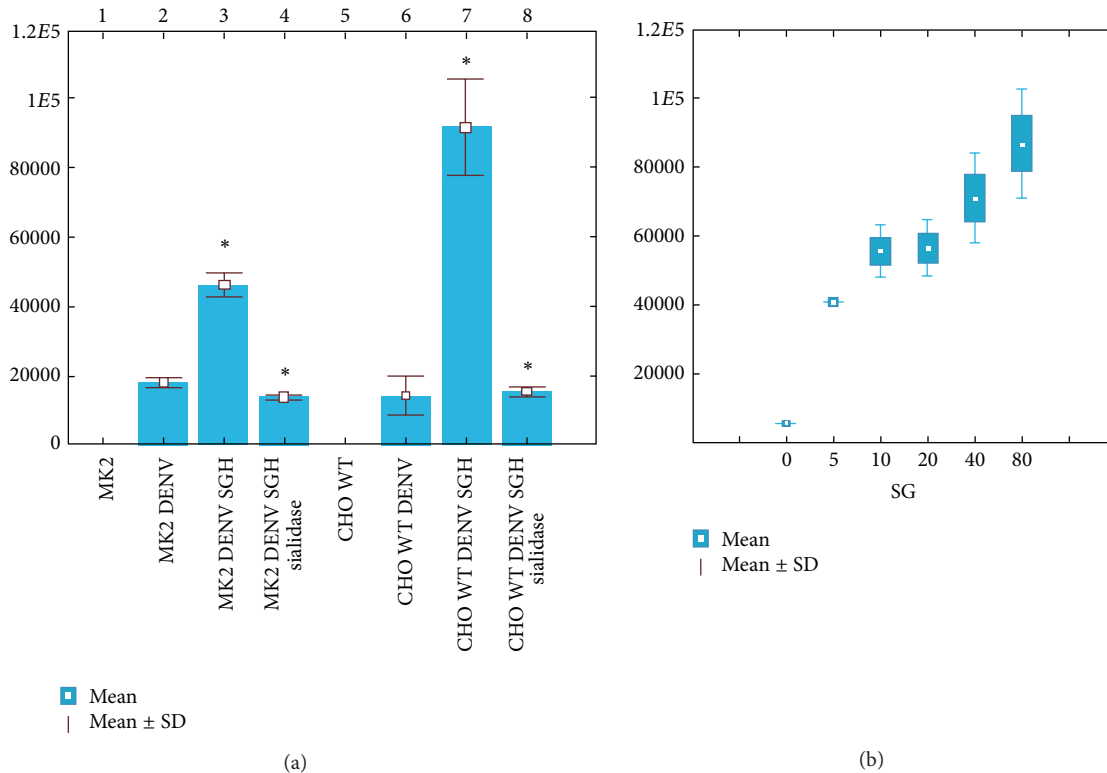


FIGURE 6: DENV-mammalian cells internalization assay. (a) DENV internalization by LLC-MK2 and CHO cells. The plot shows the internalization of  $[^{35}\text{S}]$ -methionine-radiolabeled DENV by LLC-MK2 and CHO cells in the absence (lanes 2 and 6) and presence (lanes 3 and 7) of *Ae. aegypti* SG protein extract (SGH) and in the presence of SGH pretreated with sialidase before DENV incubation (lanes 4 and 8). DENV was mixed with SGH (from 80 SGs), which was pretreated or untreated with sialidase, before infecting mammalian cells with the DENV-SGH mixture. In the plot, the y-axis shows the counts per min of internalized DENV, \* $P < 0.05$ . (b) DENV internalization by CHO cells in the presence of different amounts of SGH. The plot shows that DENV internalization was enhanced by the presence of the protein extract from five SGs, which was dose dependent.

sialidase before the internalization assay to evaluate the possible participation of Sia during DENV cell internalization, and we observed the effect on DENV internalization, which was reduced in sialidase-pretreated samples (Figure 6(a), lanes 4 and 8). The internalization of DENV in CHO cells in the presence of different amounts of SG protein extract was dose dependent, as shown in Figure 5(b). These results support a general hypothesis that molecules in mosquito saliva and secretory SG proteins can potentiate pathogen-host transmission and that Sia residues play a role during DENV internalization in mammalian cells.

#### 4. Discussion

Sialylation is a biologically important modification of glycoconjugates, which is observed mainly in the deuterostome lineage. However, the occurrence of this process in protostomes is less clear [19]. Using the available *Ae. aegypti* genome database, we identified two putative genes encoding enzymes (*Ae.CSAS* and *Ae.ST*) implicated in the *Ae. aegypti* sialylation pathway. The cDNA of *Ae.CSAS* was amplified, cloned, and functionally evaluated by the complementation of CSAS-deficient LEC29.Lec32 CHO cells. Sia moieties were present at the cell surface in *Ae.CSAS*-transfected CHO

LEC29.Lec32 cells. The identification of a functional Sia synthase in *Ae. aegypti* indicates that *Aedes* mosquitoes have the biosynthetic capacity for endogenous Sia production. Our data are consistent with previous studies [12–16] of the expression of a functional *D. melanogaster* CSAS and the presence of  $\alpha$ -2,6-linked Sia moieties in *D. melanogaster*. Sia is distributed widely in nature at the nonreducing termini of glycoproteins, glycolipids, or secreted glycoconjugates, and it may be attached to different acceptors via  $\alpha$ -2,3,  $\alpha$ -2,6, or  $\alpha$ -2,8-linkages, which are determined by the specificity of different STs [48]. In this study, we demonstrated the presence of *Ae. aegypti* ST cDNAs in different *Ae. aegypti* tissues (Figures 1(a) and 1(b)) and observed the presence of  $\alpha$ -2,6-linked Sia moieties (in a lectin binding assay) at the tissue level. These data are consistent with a report where it was shown that arthropods STs, including *Ae. aegypti* ST, are associated with the ST6Gal ST family, which is orthologous to the common ancestral gene that was present before the split of ST6Gal I and ST6Gal II in vertebrates [34].

To our knowledge, this is the first report of the presence of Sia glycans in *Ae. aegypti* tissues. The type of Sia linkage also plays a key role in the specific recognition of different viruses, because  $\alpha$ -2,3- or  $\alpha$ -2,6-specificity could define the cell and host tropism [49]. For example, human influenza

A virus hemagglutinin binds primarily to Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal structures, whereas avian influenza virus binds specifically to Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal [50]. This specificity limits the cell tropism and viral host range significantly. The participation of  $\alpha$ -2,6-Sia structures during early DENV-vector interactions may have key roles in DENV infection, host tropism, and viral pathogenesis.

It was reported that *Anopheles* salivary glands contain several glycoconjugates in the surface, which are critical for recognition of different pathogens [51–53]. Perrone et al. [54] suggested that the salivary gland carbohydrate complexity reflects the functional diversity of this tissue. By lectin-binding assay, the authors detected the presence of  $\alpha$ -D-mannose,  $\alpha$ -D-N-acetyl-galactosamine,  $\beta$ -D-gal-(1,3) N-acetyl-galactosamine,  $\beta$ -D-galactose, N-acetyl-galactosamine,  $\alpha$ -L-fucose, and  $\beta$ -N acetyl-glucosamine. Likewise, different oligosaccharide structures such as Man3GlcNAc2, Man3 (Fuc) 1-2GlcNAc2 were detected [55]. Recently, Francischetti et al. [56] demonstrated the presence of sulfated glycans in the salivary gland of *Anopheles gambiae*. Because of the glycan complexity in the vector salivary glands and in order to ensure that sialic acid detection in *Aedes aegypti* mosquito tissues was specific, the role of Sia in DENV-SG binding was evaluated by a DENV-SG competition assay using free sialic acid and also the sialylated glycoprotein fetuin. We observed that the DENV-SG interaction decreased in the presence of fetuin, and it was lost in the presence of free sialic acid (Figure 3(c) and supplementary Figure 5(B)–5(E)). In the same way, we observed in a hemagglutination assay of dengue virus with sialylated red blood cell (chicken erythrocytes) an inhibitory effect in presence of free sialic acid. Moreover, the Sia participation in DENV-sialic acid interaction was confirmed by the loss of hemagglutination activity in the presence of desialylated erythrocytes (Supplementary Table 1).

DENV cellular infection is a multistep process that involves different molecules, some of them present in *Aedes* tissues like the laminin receptor, the tubulin like protein, HSP90 protein, unknown proteins of Mw: 35, 40–45, 48, 74, and 80 KDa and several detergent-soluble proteins of salivary glands with Mw: 35–80 KDa [57]. However, neither evaluated the possible participation of Sia glycoconjugates [58, 59], and the occurrence and participation of Sia in interactions among mosquito tissues and DENV have not been considered previously.

However, the participation of Sia in *Plasmodium gallinaceum* ookinetes-midgut interactions has been documented previously. Zieler et al. [60] reported that the chemical modification of the midguts from *Ae. aegypti* mosquito with a periodate concentration of <1 mmol inhibit the adhesion of ookinetes in the midguts, and they also found that free N-acetylneuraminic acid competed for ookinete binding to midguts. Interestingly, Barreau et al. [61] found that wheat-germ agglutinin (WGA) lectin, which binds residues of N-acetylglucosamine, blocks the interaction between *Plasmodium gallinaceum* sporozoites and the surface of *Ae. aegypti* SGs. WGA is a *Triticum vulgare* lectin that specifically

recognizes N-acetylglucosamine residues, but it also has regions that interact with Sia residues. These reports suggest the possible participation (and presence) of sialic acid in the interactions between mosquito tissue and *Plasmodium*. Colpitts et al. [9] reported that Sia residues are important for the recognition of DENV in mammalian (Vero and LLC-MK2) cells, and a large number of DENV binding molecules are known [58, 62–66]. However, there have been no evaluations of the possible role during DENV-vector-host transmission.

In the present study, we found that a sialylated saliva glycoprotein (45 kDa Figure 5(b) lane 1) of *Ae. aegypti* forms complexes with DENV. This protein belongs to the D7 proteins family and is secreted in the saliva [21]; thus, it could be implicated in DENV host transmission. The modulation of DENV infection in different mammalian cells by *Aedes* salivary extracts and the observation that desialylated salivary proteins decrease DENV internalization highlight the key roles played by sialylated molecules during DENV vector-host interactions (Figure 5(c)). Several studies have demonstrated the effects of arthropod saliva on vertebrate responses in a wide range of disease models using various hosts, arboviruses, and mosquito species [5, 6, 67, 68]. In all cases, an increase in virus transmission, modification of host susceptibility, or disease progression were observed. The enhancement of infection as a result of SG extracts is attributed to the modulation of host immune response, reduction of T-lymphocytes, and antiviral activity [69]. In the current study, we detected enhanced DENV internalization in presence of *Aedes* SG extracts, but the virus internalization decreased when the salivary proteins were pretreated with sialidase. In agreement with our results, Surasombatpatana et al. [70, 71] observed enhanced DENV infection of human keratinocytes in the presence of SG extracts. Recently, Conway et al. [7] reported that the *Aedes aegypti* saliva serine protease activity enhances dissemination of DENV into the mammalian host, although the role of Sia was not considered. Identification of molecules that mediate infectivity enhancement will allow for the production of vector-based vaccines and therapeutics that will target arthropod saliva components and interfere with viral transmission, as is exemplified by antimaxadilan (MAX) and anti-SP15 vaccines [72, 73]. These data may represent a general property for other vector-borne pathogens as is the case of *Plasmodium*. The knowledge of early DENV-host interactions could lead to a better understanding of viral tropism and pathogenesis and provide information for the development of new strategies for the control of DENV transmission.

To our knowledge, this is the first report of the participation of Sia structures during early interactions between DENV and *Ae. aegypti* mosquito tissues.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Jorge Guevara of the National Institute of Neurology for his support with the lectin immunohistochemistry assays and Gerardo Hurtado and Dr. Victoria Pando of the INSP for the initial D7 MALDI-TOF assay. They also thank Miguel Tapia Rodríguez for his excellent support of the confocal assay. And they also thank Dr. P. Stanley from the Albert Einstein College of Medicine at Yeshiva University, NY, for kindly providing LEC29.Lec32 cells. Jorge Cime was a Ph.D. student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia Tecnología (CONACYT), México. This study was supported by CONACYT and PAPIIT-UNAM grants.

## References

- [1] World Health Organization (WHO), *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, WHO, Geneva, Switzerland, 2009, <http://www.who.int/topics/dengue/en/>.
- [2] D. J. Gubler, "The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle?" *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 27, no. 5, pp. 319–330, 2004.
- [3] S. B. Halstead, "Dengue virus-mosquito interactions," *Annual Review of Entomology*, vol. 53, pp. 273–291, 2008.
- [4] J. R. Anderson and R. Rico-Hesse, "Aedes aegypti vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 75, no. 5, pp. 886–892, 2006.
- [5] R. G. Titus, J. V. Bishop, and J. S. Mejia, "The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission," *Parasite Immunology*, vol. 28, no. 4, pp. 131–141, 2006.
- [6] B. S. Schneider and S. Higgs, "The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 102, no. 5, pp. 400–408, 2008.
- [7] M. J. Conway, A. M. Watson, T. M. Colpitts et al., "Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host," *Journal of Virology*, vol. 88, no. 1, pp. 164–175, 2014.
- [8] S. Thangamani and S. K. Wikel, "Differential expression of *Aedes aegypti* salivary transcriptome upon blood feeding," *Parasites and Vectors*, vol. 2, no. 1, article 34, 2009.
- [9] T. M. Colpitts, J. Cox, D. L. Vanlandingham et al., "Alterations in the aedes aegypti transcriptome during infection with west nile, dengue and yellow fever viruses," *PLoS Pathogens*, vol. 7, no. 9, Article ID e1002189, 2011.
- [10] B. K. Thaisomboonsuk, E. T. Clayson, S. Pantuwatana, D. W. Vaughn, and T. P. Endy, "Characterization of dengue-2 virus binding to surfaces of mammalian and insect cells," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 72, no. 4, pp. 375–383, 2005.
- [11] V. Stollar, "Togaviruses in cultured arthropod cells," in *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*, R. W. Schlesinger, Ed., pp. 76–84, Academic Press, New York, NY, USA, 1980.
- [12] J. Roth, A. Kempf, G. Reuter, R. Schauer, and W. J. Gehring, "Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*," *Science*, vol. 256, no. 5057, pp. 673–675, 1992.
- [13] K. Kim, S. M. Lawrence, J. Park et al., "Expression of a functional *Drosophila melanogaster* N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) phosphate synthase gene: evidence for endogenous sialic acid biosynthetic ability in insects," *Glycobiology*, vol. 12, no. 2, pp. 73–83, 2002.
- [14] K. Koles, K. D. Irvine, and V. M. Panin, "Functional characterization of *Drosophila* sialyltransferase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 6, pp. 4346–4357, 2004.
- [15] K. Aoki, M. Perlman, J.-M. Lim, R. Cantu, L. Wells, and M. Tiemeyer, "Dynamic developmental elaboration of N-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 12, pp. 9127–9142, 2007.
- [16] K. Viswanathan, N. Tomiya, J. Park et al., "Expression of a functional *Drosophila melanogaster* CMP-sialic acid synthetase: Differential localization of the drosophila and human enzymes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 23, pp. 15929–15940, 2006.
- [17] E. Repnikova, K. Koles, M. Nakamura et al., "Sialyltransferase regulates nervous system function in *Drosophila*," *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 18, pp. 6466–6476, 2010.
- [18] R. Islam, M. Nakamura, H. Scott et al., "The role of *Drosophila* cytidine monophosphate-sialic acid synthetase in the nervous system," *Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 30, pp. 12306–12315, 2013.
- [19] A. Varki, "Glycan-based interactions involving vertebrate sialic acid-recognizing proteins," *Nature*, vol. 446, no. 7139, pp. 1023–1029, 2007.
- [20] C. Cabello-Gutiérrez, M. E. Manjarrez-Zavala, A. Huerta-Zepeda et al., "Modification of the cytoprotective protein C pathway during Dengue virus infection of human endothelial vascular cells," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 101, no. 5, pp. 916–928, 2009.
- [21] L. Almeras, A. Fontaine, M. Belghazi et al., "Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes," *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 10, no. 4, pp. 391–402, 2010.
- [22] J. P. Kamerling, G. J. Gerwig, J. F. Vliegthart, and J. R. Clamp, "Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides," *Biochemical Journal*, vol. 151, no. 3, pp. 491–495, 1975.
- [23] G. Reuter and R. Schauer, "Determination of sialic acids," *Methods in Enzymology*, vol. 230, pp. 168–199, 1994.
- [24] S. Hara, M. Yamaguchi, Y. Takemori, K. Furuhashi, H. Ogura, and M. Nakamura, "Determination of mono-O-acetylated N-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography," *Analytical Biochemistry*, vol. 179, no. 1, pp. 162–166, 1989.
- [25] S. S. Twining, "Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes," *Analytical Biochemistry*, vol. 143, no. 1, pp. 30–34, 1984.
- [26] E. Tian, L. Zhang, and K. G. T. Hagen, "Fluorescent lectin staining of drosophila embryos and tissues to detect the spatial distribution of glycans during development," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1022, pp. 99–105, 2013.
- [27] J. S. Salas-Benito and R. M. del Angel, "Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus," *Journal of Virology*, vol. 71, no. 10, pp. 7246–7252, 1997.

- [28] M. Kinter and N. E. Sherman, "The preparation of protein digests for mass spectrometric sequencing experiments," in *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, New York, NY, USA, 2000.
- [29] C. A. Cooper, E. Gasteiger, and N. H. Packer, "GlycoMod—a software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data," *Proteomics*, vol. 1, no. 2, pp. 340–349, 2001.
- [30] R. S. Goldsmith, "Assay of dengue virus in monkey kidney cells by detection of hemagglutinin in the culture medium," *American Journal of Epidemiology*, vol. 84, no. 2, pp. 343–351, 1966.
- [31] J. Casals and L. V. Brown, "Hemagglutination with arthropod-borne viruses," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 99, no. 5, pp. 429–449, 1954.
- [32] K. Sano and H. Ogawa, "Hemagglutination (inhibition) assay," in *Lectin Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1200, pp. 47–52, 2014.
- [33] R. Schauer, G. V. Srinivasan, B. Coddeville, J.-P. Zanetta, and Y. Guérardel, "Low incidence of N-glycolylneuraminic acid in birds and reptiles and its absence in the platypus," *Carbohydrate Research*, vol. 344, no. 12, pp. 1494–1500, 2009.
- [34] K. Koles, E. Repnikova, G. Pavlova, L. I. Korochkin, and V. M. Panin, "Sialylation in protostomes: a perspective from *Drosophila* genetics and biochemistry," *Glycoconjugate Journal*, vol. 26, no. 3, pp. 313–324, 2009.
- [35] B. Potvin, T. S. Raju, and P. Stanley, "lec32 is a new mutation in Chinese hamster ovary cells that essentially abrogates CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase activity," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 51, pp. 30415–30421, 1995.
- [36] P. Stanley, T. Shantha Raju, and M. Bhaumik, "CHO cells provide access to novel N-glycans and developmentally regulated glycosyltransferases," *Glycobiology*, vol. 6, no. 7, pp. 695–699, 1996.
- [37] D. Petit, A.-M. Mir, J.-M. Petit et al., "Molecular phylogeny and functional genomics of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransferases that explain ubiquitous expression of st6gal1 gene in amniotes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 49, pp. 38399–38414, 2010.
- [38] K. R. Stark and A. A. James, "Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa- directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 33, pp. 20802–20809, 1998.
- [39] E. Calvo, B. J. Mans, J. F. Andersen, and J. M. C. Ribeiro, "Function and evolution of a mosquito salivary protein family," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 4, pp. 1935–1942, 2006.
- [40] F. E. R. Simons and Z. Peng, "Mosquito allergy: recombinant mosquito salivary antigens for new diagnostic tests," *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 124, no. 1–3, pp. 403–405, 2001.
- [41] J. M. C. Ribeiro, B. Arcà, F. Lombardo et al., "An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito *Aedes aegypti*," *BMC Genomics*, vol. 8, article 6, 2007.
- [42] W. B. Klimstra, E. M. Nangle, M. S. Smith, A. D. Yurochko, and K. D. Ryman, "DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell and mammalian cell-derived viruses," *Journal of Virology*, vol. 22, no. 77, pp. 12022–12032, 2003.
- [43] J. L. Miller, B. J. M. de Wet, L. Martinez-Pomares et al., "The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages," *PLoS Pathogens*, vol. 4, no. 2, article e17, 2008.
- [44] G. Cheng, J. Cox, P. Wang et al., "A C-type lectin collaborates with a CD45 phosphatase homologue to facilitate West Nile virus infection of mosquitoes," *Cell*, vol. 142, no. 5, pp. 714–725, 2010.
- [45] O. M. Sessions, N. J. Barrows, J. A. Souza-Neto et al., "Discovery of insect and human dengue virus host factors," *Nature*, vol. 458, no. 7241, pp. 1047–1050, 2009.
- [46] B. Arcà, F. Lombardo, M. de Lara Capurro et al., "Trapping cDNAs encoding secreted proteins from the salivary glands of the malaria vector *Anopheles gambiae*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 4, pp. 1516–1521, 1999.
- [47] B. Arcà, F. Lombardo, A. Lanfrancotti et al., "A cluster of four D7-related genes is expressed in the salivary glands of the African malaria vector *Anopheles gambiae*," *Insect Molecular Biology*, vol. 11, no. 1, pp. 47–55, 2002.
- [48] A. Harduin-Lapers, "Comprehensive analysis of sialyltransferases in vertebrate genomes," *Glycobiology Insights*, vol. 2, pp. 29–61, 2010.
- [49] F. Lehmann, E. Tiralongo, and J. Tiralongo, "Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 63, no. 12, pp. 1331–1354, 2006.
- [50] Y. Suzuki, T. Ito, T. Suzuki et al., "Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses," *Journal of Virology*, vol. 74, no. 24, pp. 11825–11831, 2000.
- [51] J. D. G. Brennan, M. Kent, R. Dhar, H. Fujioka, and N. Kumar, "Anopheles gambiae salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 25, pp. 13859–13864, 2000.
- [52] A. A. James, "Blocking malaria parasite invasion of mosquito salivary glands," *The Journal of Experimental Biology*, vol. 206, no. 21, pp. 3817–3821, 2003.
- [53] A. K. Ghosh and M. Jacobs-Lorena, "Plasmodium sporozoite invasion of the mosquito salivary gland," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 12, no. 4, pp. 394–400, 2009.
- [54] J. B. Perrone, J. DeMaio, and A. Spielman, "Regions of mosquito salivary glands distinguished by surface lectin-binding characteristics," *Insect Biochemistry*, vol. 16, no. 2, pp. 313–318, 1986.
- [55] J. S. Li, C. J. Vavricka, B. M. Christensen, and J. Li, "Proteomic analysis of N-glycosylation in mosquito dopachrome conversion enzyme," *Proteomics*, vol. 7, no. 15, pp. 2557–2569, 2007.
- [56] I. M. Francischetti, D. Ma, J. F. Andersen, and J. M. Ribeiro, "Evidence for a lectin specific for sulfated glycans in the salivary gland of the malaria vector, *Anopheles gambiae*," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 9, Article ID e107295, 2014.
- [57] K. I. P. J. Hidari and T. Suzuki, "Dengue virus receptor," *Tropical Medicine and Health*, vol. 39, no. 4, pp. 37–43, 2011.
- [58] A. Cabrera-Hernandez and D. R. Smith, "Mammalian dengue virus receptors," *Dengue Bulletin*, vol. 29, pp. 119–133, 2005.
- [59] D. R. Smith, "An update on mosquito cell expressed dengue virus receptor proteins," *Insect Molecular Biology*, vol. 21, no. 1, pp. 1–7, 2012.
- [60] H. Zieler, J. P. Nawrocki, and M. Shahabuddin, "Plasmodium gallinaceum ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of *Aedes aegypti* by interaction with a carbohydrate ligand," *The Journal of Experimental Biology*, vol. 202, no. 5, pp. 485–495, 1999.

- [61] C. Barreau, M. Touray, P. F. Pimenta, L. H. Miller, and K. D. Vernick, "Plasmodium gallinaceum: sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary glands in inhibited by anti-gland antibodies and by lectins," *Experimental Parasitology*, vol. 81, no. 3, pp. 332–343, 1995.
- [62] M. Y. Mendoza, J. S. Salas-Benito, H. Lanz-Mendoza, S. Hernández-Martínez, and R. M. del Ángel, "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, no. 1, pp. 76–84, 2002.
- [63] R. F. Mercado-Curiel, H. A. Esquinca-Avilés, R. Tovar, Á. Díaz-Badillo, M. Camacho-Nuez, and M. de Lourdes Muñoz, "The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells," *BMC Microbiology*, vol. 6, article 85, 2006.
- [64] R. F. Mercado-Curiel, W. C. Black IV, and M. D. L. Muñoz, "A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*," *BMC Microbiology*, vol. 8, article 118, 2008.
- [65] V.-M. Cao-Lormeau, "Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands," *Virology Journal*, vol. 6, article 35, 2009.
- [66] M. D. L. Muñoz, G. Limón-Camacho, R. Tovar, A. Díaz-Badillo, G. Mendoza-Hernández, and W. C. Black, "Proteomic identification of dengue virus binding proteins in *Aedes aegypti* mosquitoes and *Aedes albopictus* cells," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 875958, 11 pages, 2013.
- [67] R. G. Titus and J. M. C. Ribeiro, "Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance leishmania infectivity," *Science*, vol. 239, no. 4845, pp. 1306–1308, 1988.
- [68] L. M. Styer, K. A. Kent, R. G. Albright, C. J. Bennett, L. D. Kramer, and K. A. Bernard, "Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts," *PLoS Pathogens*, vol. 3, no. 9, article e132, 2007.
- [69] B. S. Schneider, L. Soong, L. L. Coffey, H. L. Stevenson, C. E. McGee, and S. Higgs, "Aedes aegypti saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 7, Article ID e11704, 2010.
- [70] P. Surasombatpattana, S. Patramool, N. Luplertlop, H. Yssel, and D. Missé, "Aedes aegypti saliva enhances dengue virus infection of human keratinocytes by suppressing innate immune responses," *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, no. 8, pp. 2103–2105, 2012.
- [71] P. Surasombatpattana, P. Ekchariyawat, R. Hamel et al., "Aedes aegypti saliva contains a prominent 34-kDa protein that strongly enhances dengue virus replication in human keratinocytes," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 134, no. 1, pp. 281–284, 2014.
- [72] R. V. Morris, C. B. Shoemaker, J. R. David, G. C. Lanzaro, and R. G. Titus, "Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 9, pp. 5226–5230, 2001.
- [73] J. G. Valenzuela, Y. Belkaid, M. K. Garfield et al., "Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 194, no. 3, pp. 331–342, 2001.