

Procesos celulares modificados en *Aedes aegypti* infectados con *Wolbachia* y la susceptibilidad al virus dengue

Teresa López-Ordóñez, DSc,⁽¹⁾ Karla Ivonne Díaz-Rodarte, MSP,⁽¹⁾ Jorge Aurelio Torres-Monzón, DSc,⁽¹⁾ Mauricio Casas-Martínez, DSc,⁽¹⁾ Rogelio Danis-Lozano, DSc,⁽¹⁾ Clemente Mosso-González, DSc.^(1,2)

López-Ordóñez T, Díaz-Rodarte KI, Torres-Monzón JA, Casas-Martínez M, Danis-Lozano R, Mosso-González C. Procesos celulares modificados en *Aedes aegypti* infectados con *Wolbachia* y la susceptibilidad al virus dengue. *Salud Publica Mex.* 2023;65:136-143. <https://doi.org/10.21149/14154>

López-Ordóñez T, Díaz-Rodarte KI, Torres-Monzón JA, Casas-Martínez M, Danis-Lozano R, Mosso-González C. Modified cellular processes in *Aedes aegypti* infected with *Wolbachia* and susceptibility to dengue virus. *Salud Publica Mex.* 2023;65:136-143. <https://doi.org/10.21149/14154>

Resumen

Objetivo. Analizar la expresión diferencial de proteínas de *Aedes aegypti* infectados con *Wolbachia* y su asociación con el ciclo viral del virus dengue (DENV). **Material y métodos.** Se revisó una base de datos de proteínas de *Ae. aegypti* infectados y no infectados con *Wolbachia*, cepa wMel y se buscaron estas en revistas indizadas, que hablaran de la proteína y el ciclo viral de DENV. **Resultados.** La expresión diferencial de proteínas de los mosquitos durante la infección con *Wolbachia* intervienen en los procesos de entrada, replicación y salida del DENV. **Conclusiones.** Existen cambios en la expresión de proteínas de células infectadas con *Wolbachia*, que son necesarias para el ciclo de replicación de DENV, explicando porque algunos mosquitos infectados con *Wolbachia* son refractarios a la infección por DENV.

Palabras clave: *Wolbachia*; virus del dengue; *Aedes*; proteómica

Abstract

Objective. To analyze the differential expression of proteins of *Ae. aegypti* infected with *Wolbachia* and its association with the viral cycle of dengue virus (DENV). **Materials and methods.** We review a database of proteins from *Ae. aegypti* infected and uninfected with *Wolbachia* and we reviewed published articles in peer-reviewed journals that talk about participation in the protein and viral cycle of DENV. **Results.** We found proteins that expressed changes in *Wolbachia* infection, some increased and others decreased, which participate in the processes of entry, replication, and exit of DENV. **Conclusions.** There are changes in protein expression of *Wolbachia*-infected cells, which are necessary for the DENV replication cycle, explaining why some *Wolbachia*-infected mosquitoes are refractory to DENV infection.

Keywords: *Wolbachia*; dengue virus; *Aedes*; proteomics

Las enfermedades transmitidas por vectores (ETVs) tienen una alta morbimortalidad en la población; en México, las arbovirosis son un problema prioritario de salud.¹ Los métodos actuales para el control de la transmisión de arbovirosis no son suficientes para disminuir

el número de casos de dengue, Zika y chikungunya, por lo que se ha recurrido a nuevas estrategias como la utilización de la técnica del insecto estéril y la técnica del insecto incompatible (TII), en la que se utilizan machos de *Aedes aegypti* infectados con *Wolbachia*, en

(1) Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Regional de Investigación en Salud Pública. Tapachula, Chiapas, México.

(2) Conacyt-Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública. Tapachula, Chiapas, México.

Fecha de recibido: 27 de julio de 2022 • **Fecha de aceptado:** 6 de enero de 2023 • **Publicado en línea:** 22 de febrero de 2023

Autor de correspondencia: Dr. Clemente Mosso González. Centro Regional de Investigación en Salud Pública.

19 Poniente esquina 4ta. Av. Norte s/n, col. Centro. 30700, Tapachula, Chiapas.

Correo electrónico: clemente.mosso@insp.mx

Licencia: CC BY-NC-SA 4.0

los cuales, al reproducirse con una hembra silvestre sin *Wolbachia*, los huevos no eclosionan.² *Wolbachia* es una alfa-proteobacteria intracelular obligada, establecida en el citoplasma celular de una gran variedad de artrópodos, incluyendo mosquitos. Esta bacteria se transmite transováricamente y modifica la fisiología celular del hospedero, puede manipular su reproducción mediante la incompatibilidad citoplasmática³ y ciertas cepas de *Wolbachia* pueden reducir la transmisión de patógenos en los mosquitos infectados con esta bacteria.⁴ Dos de los principales factores que contribuyen a este fenotipo es la respuesta inmune y las especies reactivas del oxígeno.⁵

El virus dengue es un virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, que codifica para una poliproteína que es procesada por proteasas celulares y virales en proteínas estructurales (C, prM y E) y no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5).⁶ El ciclo viral comprende entrada, replicación y salida; en cada proceso participan proteínas celulares, algunas indispensables para el ciclo viral, como las proteínas de vía endocíticas, como clatrina, anexina, Rho-GTPasas y ATPasa vacuolar. Para replicación, participan proteínas como algunas ribonucleasas y proteínas que estabilizan los complejos de replicación y, para salida, proteínas del complejo AP2, furina y tetraspaina.⁷⁻⁹

Para tratar de ampliar el conocimiento de los procesos de interacción entre virus-*Wolbachia* dentro de los mosquitos, en este reporte se analiza la expresión diferencial de proteínas en mosquitos *Ae. aegypti* infectados con *Wolbachia* durante la entrada, replicación y salida de DENV.

Material y métodos

Los datos analizados fueron obtenidos en ProteomeXchange (PXD006239), donde se siguió la siguiente metodología: se realizaron cinco réplicas independientes de intestinos medios de *Ae. aegypti* no infectado e infectado con *Wolbachia Mel*; éstos fueron marcados con el sistema "Tandem Mass Tag" (TMT), procesados por espectrofotometría de masas y analizados en el software ScaffoldQ+4.0. Las proteínas expresadas diferencialmente se determinaron aplicando la prueba de permutación con un nivel de significancia de $p < 0.05$ corregido por Benjamini-Hochberg para la estimación de la tasa de descubrimiento falso (FDR).¹⁰ Las proteínas se clasificaron de acuerdo con su grado de expresión, usando la expresión LOG2FOLD, que es una relación logarítmica de los valores de expresión de un gen o proteína con respecto a dos condiciones diferentes, en este caso, mosquitos infectados y no infectados con *Wolbachia*.¹¹ Se utilizó un rango de colores para agrupar el LOG2FOLD de mayor a menor, que va de azul a rojo, respectivamen-

te. Un LOG2FOLD de 1 es un aumento de dos veces en la expresión y 2 es un aumento de cuatro veces en la expresión de las proteínas. Por otro lado, un LOG2FOLD de -1 es una disminución de dos veces la expresión de proteínas. Cada proteína fue identificada por nombre a través de la búsqueda de su clave de identificación en la base de datos de secuencias genéticas GenBank de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH) y del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), y la descripción de su función se examinó por medio del repositorio de proteínas UniProt. A fin de explorar el proceso biológico del que forman parte las proteínas descritas, se hizo una búsqueda bibliográfica utilizando las palabras clave "protein name (trypsin 5G1)" "protein ID (AAEL013714)" "Flavivirus", "dengue virus", "replication", "entry" y "release". Se dio prioridad a los artículos originales que aportaron datos experimentales sobre el efecto del aumento y disminución de la expresión de la proteína de interés sobre el proceso celular a analizar.

Resultados

Se revisó un total de 3 474 proteínas expresadas diferencialmente en mosquitos *Ae. aegypti* infectados con *Wolbachia* cepa wMel; se agruparon por procesos en el ciclo de infección viral: entrada, replicación y salida de las células.

Entrada del virus dengue a las células con la cepa WMEL de *Wolbachia*

Con respecto a la entrada viral, se encontró disminuida (log2fold -0.20) una proteína con dominio de lectina tipo C que está involucrada en el anclaje de DENV a membrana celular con posterior unión a su receptor; sin la estabilización de la lectina, la búsqueda de receptor se dificulta y la entrada del virus a la célula disminuye.¹² Las proteínas asociadas con la vía de endocitosis mediada por clatrina se encuentran disminuidas en expresión por la infección con *Wolbachia*: la cadena pesada de clatrina, AP2 μ 1 y la proteína Rab 5 (log2fold -0.03). De igual forma, la Anexina B9 (log2fold -1.24) se encuentra disminuida, por lo tanto, la disminución de estas proteínas contribuye al efecto global de inhibición viral incidiendo en la etapa de entrada de DENV. Tres proteínas asociadas con la ATPasa vacuolar se encuentran comprometidas ante la presencia de *Wolbachia* en el mosquito y presentan diferentes grados de expresión. La v-ATPasa subunidad F (log2fold 0.21) y la v-ATPasa subunidad D (log2fold -0.12) forman en conjunto el rotor central en el dominio V1 del complejo y la proteína integral de membrana del ensamblaje de la v-ATPasa

muestra aumento de expresión (log2fold 0.44). La expresión heterogénea de estas proteínas puede representar un mecanismo compensatorio de la célula, la cual, al detectar la disminución de la subunidad F que forma el rotor central, aumenta la expresión de la otra subunidad de este rotor (subunidad D) (cuadro I).^{7,12-21}

Replicación y ensamblaje del virus dengue

Posterior a la liberación de la cápside ocurre la replicación; el complejo AP3 regula la formación y transporte de lisosomos al unirse con proteínas virales o con sus-

tratos necesarios para la replicación del RNA viral en los sitios de replicación, por lo tanto, una disminución de expresión del complejo adaptador 3, como es observado en mosquitos infectados con *wMel* (AP-3 log2fold -0.23), puede conducir a un grado de inhibición del virus dengue al impedir o alterar la replicación del genoma viral. Otras proteínas se relacionan con la formación del espliceosoma: la ribonucleoproteína pequeña nuclear (snRNP) U4/U6 (log2fold -0.22) y la proteína asociada a U4/U6 U5 tri snRNP-1 (log2fold 0.54). *Wolbachia*, al aumentar la expresión U4/U6 U5 tri snRNP-1 asegura que la vía de procesamiento del pre RNA mensajero se

Cuadro I
PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE EN INTESTINOS MEDIOS DE MOSQUITOS *Aedes aegypti* INFECTADOS CON *wMel* QUE PARTICIPAN EN LA ENTRADA DEL VIRUS DENGUE EN CÉLULAS

Nombre	LOG2FOLD	Función	Virus	Línea celular/ organismo	Referencia
Proteína homóloga de unión a fosfatidiletanolamina	0.81	Se une a ATP, opioides y fosfatidiletanolamina.	DENV1-4	293T	14
Proteína integral de membrana de ensamblaje de la ATPasa vacuolar	0.44	Proteína requerida para el ensamblaje del complejo V0 de la ATPasa vacuolar.	DENV2	C6/36 HT, C6/36	13
Proteína miembro 9 de la familia de dominio TBC1	0.36	Puede actuar como una proteína activadora de GTPasa para las proteínas de la familia Rab.	DENV2	HeLa	15
Paxilina	0.32	Proteína del citoesqueleto implicada en la unión actina-membrana en los sitios de adhesión celular a la matriz extracelular (adhesión focal).	HCMV	Monocitos	16
Inhibidor de la disociación Rho-GDP	0.23	Regula la reacción de intercambio de GDP/GTP de las proteínas Rho al inhibir la disociación de GDP de ellas y la posterior unión de GTP a ellas.	DENV2	Huh7, Vero	17
Cadena pesada de clatrina	-0.01	Componente de las vesículas cubiertas de clatrina.	DENV1-4	Huh7, HepG2	18
ATPasa vacuolar sector VI subunidad D	-0.12	Subunidad rotatoria del dominio VI de la ATPasa vacuolar; su función es la hidrólisis de ATP.	DENV2	C6/36 HT, C6/36	13
Proteína con dominio de lectina tipo C	-0.2	Familia de proteínas que se unen a carbohidratos en presencia de calcio y pueden mediar interacciones proteína-proteína.	DENV1-4	Aedes aegypti	12
AP-2 complejo subunidad μ	-0.21	Regular la formación de las fosas recubiertas de clatrina, así como la unión de clatrina a receptores celulares en vesículas endocíticas.	DENV1-4	Huh7, HepG2	19
Actina 2	-0.38	Proteína globular que forma microfilamentos, uno de los componentes principales del citoesqueleto.	DENV2	HEK293T/17, ECV304	20
Anexina B9	-1.24	Proteína pleiotrópica involucrada en la endocitosis, fibrinolisis, formación de canales de iones e interacciones de la matriz celular.	DENV2	Vero	21

Nota: En gradiente de color de azul a rojo, de aumento a disminución, respectivamente.

lleve a cabo sin interferencia; este efecto, en el contexto de una infección viral, podría compensar el intento de secuestro por la proteína viral NS5 y con ello impedir la inhibición de la respuesta antiviral.^{22,23} Otros procesos necesarios para la replicación viral son las modificaciones postraduccionales; una de ellas es análoga a la ubiquitinación, cuya finalidad no es la degradación proteica sino la regulación de procesos celulares incluyendo la interacción proteína-proteína y proteína-DNA, la alteración de la ubicación de la proteína y la estabilización de proteínas modificadas. Algunas proteínas asociadas con la SUMOilación se encuentran alteradas, como el pequeño modificador tipo ubiquitina de pequeño tamaño (SUMO) 3 (log2fold 1.04) y la enzima conjugadora (Ubc9) de SUMO E2 (log2fold -0.23). La proteína SUMO E2 es necesaria para mediar el paso de conjugación en la vía de la SUMOilación, por consiguiente, una disminución en su expresión puede afectar la función e impedir que se realicen las modificaciones necesarias a la proteína NS5.^{24,25} La fosforilación de la proteína NS5 por la proteína cinasa C, en el dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA, es un mecanismo celular para restringir la replicación viral, con la consecuente reducción de la viabilidad de la célula. Estas consecuencias negativas sobre la replicación viral también han sido reportadas para el virus de la fiebre amarilla. Una disminución de la expresión de la proteína cinasa C, como la observada en este análisis, puede contribuir con el fenómeno de bloqueo viral observado en mosquitos *Ae. aegypti* infectados con *Wolbachia*.^{26,27}

La unión de la proteína C a las gotas lipídicas parece tener dos funciones: regulación de la disponibilidad de esta proteína para evitar su interacción temprana con el genoma viral y modulación del metabolismo de lípidos. Se ha sugerido, por el cambio de proteínas entre el retículo endoplásmico y las *lipid droplets*, la posibilidad de que el RNA viral interactúe con la proteína C en la superficie de las *lipid droplets* para formar la nucleocápside. Carvalho y colaboradores¹⁴ reportaron que la unión de la proteína C de DENV a estos organelos es dependiente de la concentración de potasio intracelular, observándose que la inhibición de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa producía el desprendimiento de la proteína C y con ello la disminución de la liberación de partículas virales. Este punto es interesante considerando el grado de expresión de la Na⁺/K⁺ ATPasa (log2fold -0.23) reportado en el presente estudio.^{14,28,29}

La translocación de la proteína C al núcleo requiere, entre otros factores, de la proteína activadora de la Ran GTPasa (Ran GAP), cuya expresión se encuentra disminuida en el presente reporte (log2fold -0.21), y del factor Ran de intercambio de nucleótidos de guanina (Ran GEF) que median el transporte núcleo-citoplasma.

La disminución en expresión de la Ran GAP podría interferir en el transporte a través del poro nuclear de la proteína C, sin mencionar la proteína NS5 que también es translocada al núcleo.^{30,31}

Por otro lado, la proteína C interactúa con las histonas asociadas con la formación del nucleosoma y con esta acción promueve la replicación viral, posiblemente modificando la maquinaria genética de la célula a favor de DENV. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 se encuentran disminuidas en expresión en respuesta a la presencia de *Wolbachia*. Colpitts y colaboradores³² reportaron la co-localización de la proteína C con las histonas, tanto en el núcleo como en el citoplasma, indicando que ésta se une a ellas antes de entrar al núcleo o se unen en el núcleo y posteriormente son llevadas al citoplasma. Ante esta situación, la célula busca compensar la pérdida de histonas funcionales (no unidas a la proteína C) y aumenta la producción de éstas (cuadro II).^{14,22,24-26,30,32-36}

Salida del virus dengue

Se mencionó con anterioridad la importancia del complejo adaptador AP-2 en la formación de las vesículas cubiertas de clatrina, proceso esencial para la entrada de DENV, no obstante, ésta también tiene un papel importante en la etapa de liberación del virus. La subunidad $\mu 1$ del complejo AP2 (AP2 $\mu 1$), al ser fosforilada por la proteína cinasa 1 asociada a AP-2, regula su unión a proteínas para transportarlas. Como se indicó previamente, esta subunidad del complejo se encuentra disminuida en expresión (log2fold -0.21) por la inducción de *Wolbachia*. El silenciamiento de AP2 $\mu 1$ inhibe la producción de DENV en células Huh7 transfectadas con RNA viral desnudo, asegurando con esto su participación en etapas posteriores a la entrada. Una explicación sugiere que el complejo AP2 $\mu 1$ regula positivamente a la 4 fosfato fosfatidilinositol 5 cinasa (PIP2K), que a su vez activa la síntesis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI(4,5)P₂) y esta última se une a la proteína EXO70, que es una subunidad del exocisto, complejo que media la unión de vesículas secretoras a la membrana plasmática antes de la fusión a la membrana mediada por receptores de proteínas de fijación soluble de NSF (SNAREs). Al silenciarse EXO70, en el contexto de una infección viral, se observó la atenuación de la producción viral sin influenciar la transcripción y traducción de DENV; además, se encontró que la expresión de la proteína aumenta a las 18 horas posterior a la infección y ésta era mayor en la co-expresión de la proteína E y la proteína pre-membrana (prM). Por lo tanto, una disminución en la expresión de AP2 $\mu 1$, como la observada en mosquitos infectados con *Wolbachia*, conduce a una perturbación del sistema secretor a través de la supresión de EXO70.³⁷⁻³⁹

Cuadro II
PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE EN INTESTINOS MEDIOS DE MOSQUITOS *Aedes Aegypti* INFECTADOS CON WME1 QUE PARTICIPAN EN LA REPLICACIÓN DE CÉLULAS DEL VIRUS DENGUE

Nombre	LOG2FOLD	Función	Virus	Línea celular/ organismo	Referencia
Pequeño modificador relacionado con ubiquitina-3	1.04	Participa en un proceso de modificación post-traduccional reversible que regula una amplia variedad de procesos celulares.	DENV2	HEK293T	25
Factor de iniciación de la traducción eucariota 4E	0.99	Proteína de unión a la cap que, junto con otras proteínas, permite el reclutamiento de ribosomas y el inicio de la traducción.	DENV2	BHK	33
Proteína ribosómica 60S L18a	0.79	Proteína ribosómica que es componente de la subunidad 60S.	DENV2	Huh7	34
Proteína asociada con U4/U6.U5 tri-snRNP-I	0.54	El tri-snRNP se combina con un sustrato precursor de mRNA unido a U1 y U2 snRNP y se transforma en un espliceosoma catalíticamente activo.	DENV2	Huh7,A549	22
Enzima de conjugación de ubiquitina E2	0.35	Acepta ubiquitina del complejo E1 y cataliza su unión covalente a otras proteínas.	DENV2	HEK293T	24
Homología a arginina nmetiltransferasa	0.31	Arginina metiltransferasa que metila los nitrógenos de guanidino de los residuos de arginilo presentes en las proteínas.	DENV2	Aag2,Aedes aegypti	35
Proteína cinasa C	0.3	Participa en el control de la función de otras proteínas a través de la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de aminoácidos de serina y treonina en estas proteínas.	DENV2	HepG2	26
Proteína ras activadora de GTPasa	-0.21	Proteína que se asocia al complejo de poro nuclear y participa en la regulación del transporte nuclear.	Flavivirus, DENV2	C6/36	30
Pequeña ribonucleoproteína nuclear U4 / U6 (Prp31)	-0.22	Proteína requerida para el ensamblaje del complejo tri-snRNP U4/U5/U6, uno de los componentes básicos del empalme.	DENV2	A549, Huh7, HEK-293, HeLa	22
ATPasa sodio/potasio subunidad β2	-0.23	Ayuda a mantener el potencial de reposo, afecta el transporte y regula el volumen celular.	DENV2	HepG2	14
SUMO-enzima de conjugación E2	-0.23	La conjugación de SUMO con las proteínas blanco produce alteraciones en la función o cambios en la ubicación intracelular.	DENV2	HEK293T	24
Complejo AP-3 subunidad delta	-0.24	AP-3 tiene una función en el transporte de proteínas selectivas en la vía endolisosómica.	DENV2, JEV, WNV	BHK-21, Vero, PS	36
Histonas I H1, H2B	-0.52	Una de las histonas principales involucradas en la estructura de la cromatina.	DENV1-4	Huh7	32
Histona 3 H3	-0.65	Una de las histonas principales involucradas en la estructura de la cromatina.	DENV1-4	Huh7	32

Nota: En gradiente de color de azul a rojo, de aumento a disminución, respectivamente.

La v-ATPasa interactúa con la proteína pre-membrana a nivel de los residuos de aminoácidos (76-80) del péptido pr de DENV y esta unión parece ser necesaria para establecer un ambiente adecuado dentro de la vesícula y así facilitar la secreción del virus. Este mecanismo proporciona otra explicación sobre la importancia de la persistencia del péptido pr posterior a la escisión de la proteína pre-M por la furina celular. En el presente estudio, tres proteínas asociadas con la v-ATPasa se encontraron alteradas en intestinos de mosquito *A. aegypti* infectados con *Wolbachia*, entre las cuales se encuentran

las subunidades que forman el rotor central de la enzima. La v-ATPasa subunidad D se encuentra disminuida en expresión (log2fold -0.12) y la v-ATPasa subunidad F se encuentra aumentada (log2fold 0.21), además de la proteína integral de membrana del ensamblaje de la v-ATPasa que también presenta un aumento de expresión. Los cambios de expresión en la estructura de la v-ATPasa inducidos por *Wolbachia* pueden alterar la función de la enzima a nivel de hidrólisis de ATP y con ello comprometer el papel de este complejo en la salida de DENV (cuadro III).^{9,17,36,37,40-42}

Cuadro III
PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE EN INTESTINOS MEDIOS DE MOSQUITOS Aedes aegypti INFECTADOS CON wMEL QUE PARTICIPAN EN LA SALIDA DEL VIRUS DENGUE

Nombre	LOG2FOLD	Función	Virus	Línea celular/ organismo	Referencia
Proteína putativa homóloga de unión a actina	0.45	Proteína que se une a actina.	DENV2	ECV304	41
Proteína integral de membrana del ensamblaje de la ATPasa vacuolar	0.44	Proteína requerida para el ensamblaje del complejo V0 de la ATPasa vacuolar en el retículo endoplásmico.	DENV2	HepG2	40
Enzima de conjugación de ubiquitina E2	0.35	Acepta ubiquitina del complejo E1 y cataliza su unión covalente a otras proteínas.	DENV2	Aedes aegypti	42
Inhibidor de la disociación Rho-GDP	0.23	Regula la reacción de intercambio de GDP/GTP de las proteínas Rho al inhibir la disociación de GDP de ellas y la posterior unión de GTP a ellas.	DENV2	Huh7, Vero	17
ATPasa vacuolar sector VI subunidad D	-0.12	Subunidad rotatoria del dominio VI de la ATPasa vacuolar; el dominio VI es un complejo periférico de 650 kDa ubicado en el lado citoplásmico de la membrana y cuya función es la hidrólisis de ATP.	DENV2	HepG2	40
AP-2 complejo subunidad mu	-0.21	Componente del complejo 2 de proteína adaptadora asociada con clatrina que regulan la formación de las fosas recubiertas de clatrina, así como la unión de clatrina a receptores celulares en vesículas endocíticas.	DENV1-4	Huh7	37
Proteína parecida a la ubiquitina 4A-B	-0.23	El sistema de la ubiquitina está implicado en la degradación de proteínas reguladoras, involucrado en la respuesta inmune, desarrollo y muerte celular programada.	DENV2	Aedes aegypti	42
Tetraspanina	-0.31	Familia que actúa como proteínas de andamiaje, anclando múltiples proteínas en un área de la membrana celular.	DENV 2 y 3	Mo-DCs, HaCaT, HUVECs, C6/36, Aag2	9
Actina 2	-0.38	Proteína globular que forma microfilamentos, uno de los componentes principales del citoesqueleto.	DENV2	ECV304	41
Homóloga a la proteína putativa AP-I sigma	-0.54	Proteína requerida para el rearreglo de membranas; regula el transporte de la membrana plasmática basolateral de la red trans-Golgi.	DENV2, JEV, WNV	BHK-21, Vero, PS	36

Nota: En gradiente de color de azul a rojo, de aumento a disminución, respectivamente.

Diseminación del virus dengue

Se ha observado que los exosomas que provienen de células infectadas con DENV poseen en su interior partículas parecidas a las virales y son capaces de infectar otras células, indicando la relevancia de esta vía secretora en la diseminación del virus. Asimismo, se encontró un dominio de tetraspanina que contiene glicoproteína (Tsp29Fb) tanto en células como vesículas extracelulares provenientes de líneas celulares de mosquito de *Ae. aegypti* (Aag2) y *Ae. albopictus* (C6/36), capaz de interactuar directamente con la proteína E viral y cuya expresión aumenta en la infección por DENV. Por otra parte, Yang y colaboradores⁴³ reportaron la formación de tetraspanina C189 en respuesta a la infección por DENV y su transporte de una célula a otra acompañando al virus. El silenciamiento de esta proteína disminuyó la transmisión de DENV entre células, sugiriendo un papel importante de la tetraspanina C189 en la diseminación intercelular de la progenie viral. En los intestinos medios de *A. aegypti* infectados con *wMel* se encontró una disminución de la expresión de tetraspanina (log₂fold -0.31); si bien se conocen múltiples miembros de la familia de las tetraspaninas, muchos de ellos han sido recientemente caracterizados. La disminución de esta proteína en el contexto de una infección por DENV puede conducir a una disminución en la diseminación del virus y con ello contribuir al efecto de bloqueo viral (cuadro III).^{9,43,44}

Discusión

La simbiosis entre *Wolbachia* y células de *Ae. aegypti* resulta en alteraciones en la expresión de proteínas para poder llevar a cabo su replicación, siendo ésta una bacteria intracelular obligada, por lo que manipula la expresión de un amplio grupo de proteínas, tanto hacia el aumento como hacia la disminución.⁴⁵ Por otra parte, para una infección productiva por DENV en mosquitos, se requiere infección y replicación en los intestinos de éstos, donde es necesaria la maquinaria celular; cuando esta maquinaria ya está siendo modificada por otro organismo,⁴⁶ pueden darse tres fenómenos: que cada uno de los organismos haga uso de diferentes proteínas, que en este caso sería una infección productiva de parte de ambos, o que uno ayude a la replicación del otro y, por último, que ambos necesiten las mismas proteínas o recursos de la célula infectada. En este trabajo se prestó atención a las proteínas de las que se reporta de manera individual su implicación en la disminución de la infección por dengue y que estuvieran alteradas en células infectadas con *Wolbachia*, tales como proteínas de vía endocítica, como la lectina, Rabs y la ATPasa vacuolar,

proteína indispensable para la liberación de la nucleocápside de DENV. Otras proteínas que se encuentran alteradas son las de vías de procesamiento del RNA, fosforilación de la proteína NS5 de DENV y la formación de las gotas de lípidos, necesarias para formar los complejos de replicación de DENV y la tetraspanina en salida y diseminación. Este análisis aporta evidencias de cambios celulares importantes en células infectadas con *Wolbachia*, que confieren resistencia a una posterior infección por DENV.

Declaración de conflicto de intereses. Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Fernández-Salas I, Danis-Lozano R, Casas-Martínez M, Ulloa A, Bond JG, Marina CF, et al. Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. *Antiviral Res.* 2015;124:30-42. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.10.015>
2. Zheng X, Zhang D, Li Y, Yang C, Wu Y, Liang X, et al. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature.* 2019;572(7767):56-61. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1407-9>
3. Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(10):741-51 [citado 2021 agosto 16, 2021]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1969>
4. Ahmad NA, Mancini M-V, Ant TH, Martínez J, Kamarul GMR, Nazni WA, et al. *Wolbachia* strain wAlbB maintains high density and dengue inhibition following introduction into a field population of *Aedes aegypti*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2021;376(1818):20190809. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0809>
5. Pan X, Zhou G, Wu J, Bian G, Lu P, Raikhel AS, et al. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(1):E23-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116932108>
6. Barnard TR, Abram QH, Lin QF, Wang AB, Sagan SM. Molecular determinants of flavivirus virion assembly. *Trends Biochem Sci.* 2021;46(5):378-90 <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.12.007>
7. Mosso C, Galván-Mendoza JJ, Ludert JE, del Angel RM. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology.* 2008;378(1):193-9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.05.012>
8. Randall G. Lipid droplet metabolism during dengue virus infection. *Trends Microbiol.* 2018;26(8):640-2. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.010>
9. Reyes-Ruiz JM, Osuna-Ramos JF, De Jesús-González LA, Hurtado-Monzón AM, Farfan-Morales CN, Cervantes-Salazar M, et al. Isolation and characterization of exosomes released from mosquito cells infected with dengue virus. *Virus Res.* 2019;266:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.015>
10. Geoghegan V, Stainton K, Rainey SM, Ant TH, Dowle AA, Larson T, et al. Perturbed cholesterol and vesicular trafficking associated with dengue blocking in *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* cells. *Nat Commun.* 2017;8(1):1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00610-8>
11. Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet.* 2002;32(Suppl 4):496-501. <https://doi.org/10.1038/ng1032>
12. Liu Y, Zhang F, Liu J, Xiao X, Zhang S, Qin C, et al. Transmission-blocking antibodies against mosquito c-type lectins for dengue preven-

- tion. *PLoS Pathog.* 2014;10(2):e1003931. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003931>
13. Sessions OM, Barrows NJ, Souza-Neto JA, Robinson TJ, Hershey CL, Rodgers MA, et al. Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature.* 2009;458(7241):1047-50. <https://doi.org/10.1038/nature07967>
14. Carvalho FA, Carneiro FA, Martins IC, Assuncao-Miranda I, Faustino AF, Pereira RM, et al. Dengue virus capsid protein binding to hepatic lipid droplets (LD) is potassium ion dependent and is mediated by LD surface proteins. *J Virol.* 2012;86(4):2096-108. <https://doi.org/10.1128/JVI.06796-11>
15. Krishnan MN, Sukumaran B, Pal U, Agaisse H, Murray JL, Hodge TV, et al. Rab 5 Is required for the cellular entry of dengue and west Nile viruses. *J Virol.* 2007;81(9):4881-5. <https://doi.org/10.1128/JVI.02210-06>
16. Nogalski MT, Chan G, Stevenson EV, Gray S, Yurochko AD. Human cytomegalovirus-regulated paxillin in monocytes links cellular pathogenic motility to the process of viral entry. *J Virol.* 2011;85(3):1360-9. <https://doi.org/10.1128/JVI.02090-10>
17. Cuartas-López AM, Hernández-Cuellar CE, Gallego-Gómez JC. Disentangling the role of PI3K/Akt, Rho GTPase and the actin cytoskeleton on dengue virus infection. *Virus Res.* 2018;256:153-65. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.08.013>
18. Loerke D, Mettlen M, Yasar D, Jaqaman K, Jaqaman H, Danuser G, et al. Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *Hughson F, ed. PLoS Biol.* 2009;7(3):0628-39. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000057>
19. Ang F, Wong APY, Ng MML, Chu JJH. Small interference RNA profiling reveals the essential role of human membrane trafficking genes in mediating the infectious entry of dengue virus. *Virology.* 2010;7(24):1-17. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-24>
20. Jitboam K, Phaonakrop N, Lisbittikul S, Thepparit C, Roytrakul S, Smith DR. Actin interacts with dengue virus 2 and 4 envelope proteins. *PLoS One.* 2016;11(3):1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151951>
21. Tjota M, Lee SK, Wu J, Williams JA, Khanna MR, Thomas GH. Annexin B9 binds to β (H)-spectrin and is required for multivesicular body function in *Drosophila*. *J Cell Sci.* 2011;124(17):2914-26. <https://doi.org/10.1242/jcs.078667>
22. De Maio FA, Rizzo G, Iglesias NG, Shah P, Pozzi B, Gebhard LG, et al. The Dengue virus NS5 protein intrudes in the cellular spliceosome and modulates splicing. *PLoS Pathog.* 2016;12(8):1-29. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005841>
23. Nguyen THD, Galej WP, Bai XC, Savva CG, Newman AJ, Scheres SHW, et al. The architecture of the spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP. *Nature.* 2015;523(7558):47-52. <https://doi.org/10.1038/nature14548>
24. Su C-I, Tseng C-H, Yu C-Y, Lai MMC. SUMO Modification stabilizes dengue virus nonstructural protein 5 to support virus replication. *J Virol.* 2016;90(9):4308-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00223-16>
25. Zhao J. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(23):3017-33. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7137-4>
26. Noppakunmongkolchai W, Poyomtip T, Jittawuttipoka T, Luplertlop N, Sakuntabhai A, Chinnaronk S, et al. Inhibition of protein kinase C promotes dengue virus replication. *Virology.* 2016;13(35):1-13. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0494-6>
27. Bhattacharya D, Hoover S, Falk SP, Weisblum B, Vestling M, Striker R. Phosphorylation of yellow fever virus NS5 alters methyltransferase activity. *Virology.* 2008;380(2):276-84. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.013>
28. Byk LA, Gamarnik AV. Properties and functions of the dengue virus capsid protein. *Annu Rev Virol.* 2016;3(1):263-81 [citado enero 25, 2022]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27501261/>
29. Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000632. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000632>
30. Lopez-Denman AJ, Mackenzie JM. The IMPORTance of the nucleus during flavivirus replication. *Viruses.* 2017;9(1):1-14. <https://doi.org/10.3390/v9010014>
31. Johansson M, Brooks AJ, Jans DA, Vasudevan SG. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- β and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol.* 2001;82(4):735-45. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-735>
32. Colpitts TM, Barthel S, Wang P, Fikrig E. Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells. *PLoS One.* 2011;6(9):e24365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024365>
33. Edgil D, Polacek C, Harris E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J Virol.* 2006;80(6):2976-86. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.6.2976-2986.2006>
34. Cervantes-Salazar M, Angel-Ambrocio AH, Soto-Acosta R, Bautista-Carbajal P, Hurtado-Monzon AM, Alcaraz-Estrada SL, et al. Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. *Virology.* 2015;484:113-26. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.05.017>
35. Duong FHT, Christen V, Berke JM, Penna SH, Moradpour D, Heim MH. Upregulation of protein phosphatase 2Ac by hepatitis C virus modulates NS3 helicase activity through inhibition of protein arginine methyltransferase 1. *J Virol.* 2005;79(24):15342-50. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15342-15350.2005>
36. Agrawal T, Schu P, Medigeshe GR. Adaptor protein complexes-1 and 3 are involved at distinct stages of flavivirus life-cycle. *Sci Rep.* 2013;3(1813):1-9. <https://doi.org/10.1038/srep01813>
37. Tongmuang N, Yasamut U, Noisakran S, Sreekanth GP, Yenchitsomanus P, Limjindaporn T. Suppression of μ 1 subunit of the adaptor protein complex 2 reduces dengue virus release. *Virus Genes.* 2020;56(1):27-36. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01710-x>
38. Krauss M, Kukhtina V, Pechstein A, Haucke V. Stimulation of phosphatidylinositol kinase type I-mediated phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate synthesis by AP-2 μ -cargo complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(32):11934-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510306103>
39. Chen Z, Lin X, Zhang Z, Huang J, Fu S, Huang R. EXO70 protein influences dengue virus secretion. *Microbes Infect.* 2011;13(2):143-50. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.10.011>
40. Duan X, Lu X, Li J, Liu Y. Novel binding between pre-membrane protein and vacuolar ATPase is required for efficient dengue virus secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;373(2):319-24. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.041>
41. Wang JL, Zhang JL, Chen W, Xu XF, Gao N, Fan DY, et al. Roles of small GTPase Rac1 in the regulation of actin cytoskeleton during dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(8):e809. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.000809>
42. Choy MM, Sessions OM, Gubler DJ, Ooi EE. Production of infectious dengue virus in *Aedes aegypti* is dependent on the Ubiquitin Proteasome Pathway. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(11):1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004227>
43. Yang CF, Tu CH, Lo YP, Cheng CC, Chen WJ. Involvement of tetraspanin C189 in cell-to-cell spreading of the dengue virus in C6/36 cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(7):1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003885>
44. Vora A, Zhou W, Londono-Renteria B, Woodson M, Sherman MB, Colpitts TM, et al. Arthropod EVs mediate dengue virus transmission through interaction with a tetraspanin domain containing glycoprotein Tsp29Fb. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(28):E6604-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720125115>
45. Reyes JIL, Suzuki Y, Carvajal T, Muñoz MNM, Watanabe K. Intracellular interactions between arboviruses and *Wolbachia* in *Aedes aegypti*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11(690087):1-15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.690087>
46. Molina-Cruz A, Gupta L, Richardson J, Bennett K, Black IV W, Barillas-Mury C. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(5):631-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15891140/>