

Tesis Doctoral

La entrada de virus dengue a líneas celulares humanas en la infección primaria en ausencia o presencia de anticuerpos

Carro, Ana Clara

2015-04-07

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Carro, Ana Clara. (2015-04-07). La entrada de virus dengue a líneas celulares humanas en la infección primaria en ausencia o presencia de anticuerpos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Carro, Ana Clara. "La entrada de virus dengue a líneas celulares humanas en la infección primaria en ausencia o presencia de anticuerpos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-04-07.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**La entrada de virus dengue a líneas celulares humanas en la infección
primaria en ausencia o presencia de anticuerpos**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Química Biológica

Ana Clara Carro

Directora de tesis: Prof. Dra. Elsa Damonte

Consejera de estudios: Prof. Dra. Elsa Damonte

Buenos Aires, 7 de Abril de 2015

Resumen: La entrada de virus dengue a líneas celulares humanas en la infección primaria en ausencia o presencia de anticuerpos

Actualmente, casi la mitad de la población mundial se encuentra en riesgo de contraer virus dengue (DENV), agente patógeno que puede causar una infección aguda febril autolimitada o progresar a formas más severas de enfermedad, con una tasa de mortalidad de 2,5 %. A pesar de representar un grave problema para la salud pública, no existen vacunas ni quimioterapias disponibles para DENV. La entrada del virus a la célula huésped es una interesante estrategia antiviral ya que permite bloquear el comienzo de la infección viral. En el caso de DENV, sólo se ha estudiado hasta el presente el modo de entrada en líneas celulares epiteliales o fibroblásticas de mamíferos y de mosquito, con resultados controversiales. El presente trabajo de tesis se enfocó en el estudio del mecanismo de entrada de este patógeno a células mieloides humanas, más representativas de la infección natural, y la implicancia que pudiese tener en la quimioterapia antiviral. Mediante la utilización de inhibidores químicos de las distintas vías endocíticas, medida de infectividad por formación de placas, determinaciones de RNA viral por RT-PCR en tiempo real y técnicas de microscopía de fluorescencia y electrónica, se demostró que los dos serotipos DENV-1 cepa Hawaii y DENV-2 cepa NGC utilizan una vía clásica de endocitosis dependiente de clatrina y dinamina para entrar en células humanas U937, de origen monocítico, y K562, de origen eritroleucémico. En la infección de ambas células en presencia de anticuerpos no neutralizantes anti-DENV, condiciones en que hay incremento de la infección in Vitro y pueden explicarse las formas más severas de la enfermedad in vivo, se observó que DENV-2 utiliza diferentes vías de entrada, mediadas o no por clatrina, según el receptor Fc γ R involucrado en el proceso. También se evaluó en los mismos sistemas la actividad antiviral del carragenano λ , polisacárido sulfatado que inhibe la adsorción e internalización de DENV-2 en células Vero, encontrándose también una relación entre la susceptibilidad antiviral y el tipo de receptor empleado para la entrada mediada por anticuerpos. Finalmente, se realizó un estudio de la dependencia de colesterol para la infección con DENV, concluyendo que el contenido adecuado de colesterol en la envoltura viral, no así en la membrana celular, sería determinante para lograr la fusión de ambas membranas y alcanzar una infección productiva. La caracterización de la vía de entrada en células mieloides y el rol del colesterol viral aporta nueva información para comprender los factores involucrados en la infección de DENV y favorecer el diseño y utilización de nuevas terapias antivirales más efectivas.

Palabras claves: virus dengue, entrada viral, endocitosis, clatrina, células mieloides humanas, infección mediada por anticuerpos, colesterol, fusión, desnudamiento viral, carragenano, antiviral.

Abstract: The entry of dengue virus into human cell lines during primary infection in the absence or presence of antibodies

At present, a high proportion of world population is at risk of infection with dengue virus (DENV), a pathogen causing either a mild febrile illness or more severe forms of disease, with 2.5 % mortality. Although DENV represents a serious health problem worldwide, no specific chemotherapy or vaccine is currently available. Virus entry is an attractive antiviral strategy to block initiation of infection. For DENV, the mode of entry into the host cell has been studied only in fibroblastic or epithelial cell lines, derived from mammals or mosquitoes, with controversial results. In the present study, the entry of DENV into human myeloid cell lines, a model more representative of the natural infection, was analyzed as well as the relationship between mode of entry and antiviral susceptibility to sulfated polysaccharides. By using biochemical inhibitors of endocytic routes, infectivity titrations by plaque formation, viral RNA determinations by quantitative RT-PCR, fluorescence and electron microscopy, a clathrin- and dynamin-mediated endocytosis was demonstrated for entry of both serotypes DENV-2 strain NGC and DENV-1 strain Hawaii into human myelomonocytic U937 and erithroleukaemic K562 cell lines. When both cells were infected with DENV-2 in the presence of non-neutralizing anti-DENV antibodies, conditions which allow an enhancement of infection in vitro and lead to severe forms of disease in vivo, the route of entry was clathrin-mediated or not, according to the receptor FcγR involved in the infective process. Furthermore, the antiviral activity in both cell systems of carrageenan, a sulfated polysaccharide known to inhibit DENV-2 adsorption and uncoating in Vero cells, was also evaluated. A relationship between antiviral susceptibility to carrageenan and the type of receptor employed for antibody-mediated entry was observed. Finally, studies about the cholesterol-dependence for DENV infection have shown that the envelope cholesterol is a critical factor in the fusion process for DENV entry whereas cell membrane cholesterol is not involved. The characterization of the mode of entry in myeloid cells and the role of viral cholesterol contributes to the knowledge of factors involved in DENV infection and the design and usage of new and more effective antiviral therapies.

Key words: dengue virus, viral entry, endocytosis, clathrin, human myeloid cells, antibody-mediated infection, cholesterol, fusion, viral uncoating, carrageenan, antiviral.

Agradecimientos

No somos únicos responsables de nuestros éxitos. Este trabajo tiene numerosas personas directa o indirectamente involucradas a las que deseo dar, por ello, mi sincero agradecimiento.

A Elsa, imprescindible guía académica, quien me dió toda la libertad que se puede tener y estuvo para ayudarme y apoyarme siempre que supe ir a buscarla.

A Cybele, que me abrió la puerta del laboratorio y confió en mí, iniciándome en el camino de la virología.

A Claudia, quien, además de ayudarme muchas veces con el trabajo, compartió conmigo necesarias terapias, café y mate cocido mediante, muchas mañanas y algunas tardes.

A Josefina, con quien supimos armar los momentos del hemisferio derecho cuando no podía avanzar con el trabajo.

A toda la gente del “labo de Viro” y del área de microbiología; a los que siempre estuvieron, a los que se fueron a crecer por otros lados, dejando en herencia muchas experiencias y a los que llegaron, renovando la energía del área y laboratorio. Es imposible agradecer a cada uno con estas palabras.

A la gente del laboratorio 3 y 10 del CM1, que me ayudó con el trabajo en alguna ocasión y supo aguantar mis risas y cantos muchas tardes y mates.

A Guille, soportador de mis momentos insoportables. Con él entendí aciertos y limitaciones de la academia para comenzar a acercarme a lo que quería.

A todos los amigos que me regaló esta facultad, con quienes compartí horas, estudio y discusiones, disfrutando del maravilloso ámbito que parte desde y hacia la facu que amamos.

A mi familia y demás amigos que, sin entender mucho de qué se trataba, supieron aguantar mis distancias y me apoyaron sin cuestionarlo.

A Fran, mi compañero gran parte de este trabajo.

A Jime, la hermana que la vida me permitió elegir, necesaria para culminar esta etapa.

*Debemos tener un sentido de afirmación propia y universal,
sin menoscabo de lo extranjero,
pero también sin aceptación servil.*

*De nada sirven las conquistas de la técnica médica
si ésta no puede llegar al pueblo por los medios adecuados.*

Ramón Carrillo

El presente trabajo se realizó con la financiación proveniente de las siguientes instituciones:

- Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad de Buenos Aires (UBA)

INDICE

Abreviaturas	10
INTRODUCCIÓN	12
1. Dengue: la enfermedad.....	13
1.1 Emergencia, Reemergencia y Vector	15
1.2 Dengue en Argentina	16
2. Dengue: el agente etiológico.....	18
2.1 Estructura del virión.....	19
2.2 Ciclo de multiplicación viral	21
3. Entrada Viral	23
3.1 Receptores celulares.....	24
3.2 Internalización y penetración viral	26
3.3 Entrada de DENV	29
4. Rol del colesterol en la infección viral	32
5. Neutralización y ADE.....	34
5.1 Modelo de Neutralización	34
5.2 ADE	35
5.3 Entrada de DENV en la infección mediada por anticuerpos.....	37
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. <i>Células</i>	42
2. <i>Virus</i>	42
2. 1. Preparación de las suspensiones virales.....	43
2. 2. Ensayo de formación de placas de lisis.....	43
2. 3. Concentración de las suspensiones virales	44
3. <i>Curvas de crecimiento viral</i>	44
4. <i>Determinación de viabilidad celular</i>	44
5. <i>Evaluación del efecto de inhibidores químicos sobre procesos celulares</i>	45
5. 1. Ensayos de internalización de ligandos marcados con fluorocromos	45
5. 2. Tinción de células vivas con naranja de acridina	46
6. <i>Inhibidores químicos: determinación de su efecto sobre la entrada y la multiplicación viral</i>	46
6. 1. Mediante ensayos de inhibición del rendimiento viral.....	46
6. 2. Mediante RT-PCR en tiempo real.....	47

7. Microscopía electrónica de transmisión.....	48
8. Determinación de condiciones para la infección mediada por anticuerpos.....	48
8. 1. Anticuerpos.....	48
8. 2. Ensayo de neutralización.....	49
8. 3. Establecimiento del sistema de entrada de DENV-2 dependiente de Ac.....	49
8. 4. Bloqueo de la entrada mediada por anticuerpos.....	49
9. Efecto del carragenano- λ sobre la infección con DENV-2.....	50
9. 1. Actividad antiviral del carragenano- λ sobre la infección con DENV-2.....	50
9. 2. Efecto del tiempo de tratamiento con carragenano- λ sobre la actividad antiviral.....	50
10. Extracción y recuperación de colesterol de la envoltura viral.....	51
11. Medición de colesterol.....	52
12. Estudio del mecanismo de inactivación de MCD sobre DENV-2.....	52
12. 1. Adsorción viral.....	52
12. 2. Internalización viral.....	53
12. 3. Desnudamiento por fusión de las membranas viral y endosomal.....	53
12. 4. Síntesis de ARN viral.....	54
12. 5. Expresión de proteínas virales.....	54
13. Efecto del tratamiento con MCD sobre la antigenicidad viral.....	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
CAPITULO I. La entrada de virus dengue a células humanas mieloides.....	57
I.A. Estudio de la entrada de DENV-2 en la infección primaria en ausencia de anticuerpos.....	57
I.A.1- Cinética de crecimiento de DENV-2 en diferentes líneas celulares humanas mieloides.....	57
I.A.2- Caracterización de la vía endocítica para la entrada infectiva de DENV-2.....	58
I.A.3- Comparación con otro serotipo viral: la entrada de DENV-1.....	71
I.A.4. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-2 en células K562.....	73
I.B- Estudio de la entrada de DENV-2 en presencia de anticuerpos.....	74
I.B.1- Establecimiento de un sistema de infección con DENV-2 mediada por anticuerpos.....	74
I.B.2- Caracterización de la vía endocítica utilizada por DENV-2 para la infección mediada por anticuerpos.....	79
Discusión: Entrada viral primaria en ausencia de Ac.....	83
Discusión: Entrada viral mediada por Ac.....	86
CAPITULO II. Actividad antiviral de compuestos dirigidos a la entrada de DENV en la infección de células humanas en ausencia y presencia de anticuerpos.....	91
II.A- Actividad antiviral de carragenano- λ en la infección de células U937 y K562 con DENV-2.....	91
II.B- Actividad antiviral del carragenano- λ en la infección con DENV-2 mediada por anticuerpos.....	93
Discusión: Efecto del carragenano sobre la entrada viral.....	96
CAPITULO III. El colesterol en la entrada de DENV: requerimiento en la envoltura viral.....	100
III.1. Actividad virucida de MCD y nistatina.....	100
III.2. Efecto de la recuperación de colesterol en la membrana viral.....	103

<i>III.3. Mecanismo de bloqueo en la infección con viriones inactivados con MCD.....</i>	<i>105</i>
<i>III.4. Antigenicidad de la glicoproteína de envoltura en viriones inactivados</i>	<i>109</i>
<i>Discusión: Rol de colesterol viral para la infección productiva</i>	<i>110</i>
CONCLUSIONES.....	113
<i>Consideraciones finales.....</i>	<i>115</i>
BIBLIOGRAFÍA.....	116

Abreviaturas

Ac: anticuerpo
ADE: antibody-dependent enhancement
ADN: ácido desoxiribonucleico
AP-2: assembly polypeptide 2
ARN: ácido ribonucleico
ARNi: ARN de interferencia
ATCC: American Type Culture Collection
ATPasa: adenosín trifosfatasa
BSA: seroalbúmina bovina
C: proteína de cápside viral
CC50: concentración citotóxica 50 %
CD: cluster de diferenciación
CE50: concentración efectiva antiviral 50 %
DI, II, III: dominio I, II, III
DABCO: 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano
DE: desvío estándar
DENV: virus dengue
DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
E: glicoproteína de envoltura viral
Eps15: epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
FcR: receptor de fragmentos Fc
FITC: isotiocianato de fluoresceína
GAG: glicosaminoglicano
GEEC: GPI-enriched endosomal compartments
GFP: green fluorescent protein
GPI: glicosilfosfatidilinositol
GRP78/BiP: glucose-regulated protein 78 KDa/binding immunoglobulin protein
GTP: guanósín trifosfato
GTPasa: guanosina trifosfatasa
h: hora
HCV: virus de la hepatitis C
HIV-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
HPV-16: virus del papiloma humano tipo 16
HRP: peroxidasa de rábano
HS: heparán sulfato
HSP70/90: heat shock protein 70/90 KDa
HSV-1: virus herpes simplex 1
HW: Hawaii
IFN: interferón
IgG: inmunoglobulina G
IL: interleuquina
JVE: virus de la encefalitis japonesa
LCMV: virus de la coriomeningitis linfocitaria
LPS: lipopolisacárido bacteriano
M: proteína de membrana
MCD: metil- β -ciclodextrina

MEM: medio esencial mínimo
m.i.: multiplicidad de infección
min: minuto
MM: medio de mantenimiento
MyM: materiales y métodos
M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus
NGC: Nueva Guinea C
NS: proteína no estructural
PBS: buffer fosfato salino
p.i.: post-infección
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Pr-M: proteína precursora de M
PVDF: fluoruro de polivinilideno
PEV: vesícula endocítica primaria
RE: retículo endoplasmático
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción
SFB: suero fetal bovino
TBS: buffer Tris- salino
TBVE: virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
TG: trans golgi
TNF: factor de necrosis tumoral
TRITC: rodamina
UFP: unidad formadora de placa
UTR: región no traducible
VSV: virus de la estomatitis vesicular
WNV: virus del nilo del oeste



INTRODUCCIÓN

1. Dengue: la enfermedad

El dengue es una enfermedad infecciosa generada por el virus dengue (DENV) en humanos. Las manifestaciones clínicas de esta patología están relacionadas con una enorme cantidad de factores: la virulencia del virus, la edad, género, genotipo y las características de la inmunidad innata y adquirida del individuo parecen ser determinantes o, al menos, contribuyen a moldear la severidad de la infección (Whitehorn y Simmons, 2011; Halstead, 1970). Así, se ha descrito que la enfermedad generada por la infección con DENV puede ser asintomática o evolucionar a formas severas y potencialmente fatales conocidas, anteriormente, como síndrome de shock por dengue y dengue hemorrágico (Halstead, 1970). Desde el año 2009, sin embargo, sólo se clasifica a la enfermedad en sus formas de dengue o dengue grave (World Health Organization, 2009; Deen *et al.*, 2006).

Este virus se transmite a los seres humanos por la picadura de mosquitos *Aedes aegypti* infectados con DENV, después de un período de incubación extrínseca, es decir, en el mosquito, de entre 4 y 10 días. El virus multiplica en las personas infectadas y nuevos mosquitos se infectan al picarlas. Generalmente, después de que un mosquito infectado pica, y luego de un período de incubación intrínseca de entre 3 y 7 días, la persona comienza repentinamente con síntomas, que se suceden a lo largo de tres fases, una febril, otra crítica y, finalmente, una de recuperación. La fase febril de la enfermedad puede ser casi asintomática, sólo manifestada por fiebres superiores a los 39°C, o pueden comenzar a manifestarse algunos signos como dolor de cabeza, vómitos, manchas en la piel, petequias, trombocitopenia y elevación de transaminasas hepáticas. Luego de aproximadamente 5 días, los pacientes se recuperan o bien, una minoría, comienza a sufrir una etapa más crítica caracterizada por un síndrome sistémico vascular que incluye disminución del volumen plasmático, hemoconcentración, hipoproteinemia, efusión pleural, hiper e hipotensión alternadas, dolor abdominal, hepatomegalia y aumento de hematocrito con marcada trombocitopenia. La última etapa, si el paciente sobrevive las 24 o 48 h de la fase crítica, son 48 o 72 h de una fase de recuperación con reabsorción del líquido extravasado acompañada de las manchas en la piel que tardan 1 o 2 semanas en desaparecer, junto a una profunda fatiga (World Health Organization, 2009; Simmons *et al.*, 2012; Whitehorn y Farrar, 2011).

La diferencia entre los pacientes que se recuperan luego de la etapa febril y aquéllos que progresan a la forma más severa de la enfermedad se explica, actualmente, por la infección con

cepas de DENV más virulentas (Yacoub *et al.*, 2013) o bien, debido a la presencia de anticuerpos (Ac) en aquellos individuos que fueron anteriormente infectados por dengue (Kliks *et al.*, 1988; Sangkawibha *et al.*, 1984; Thein *et al.*, 1997). Esta última explicación, más comúnmente aceptada, es conocida como ADE (por sus siglas en inglés: Antibody- Dependent Enhancement) y postula que el tipo y concentración de Ac adquiridos en la infección por DENV puede, en determinadas condiciones, mediar un aumento de la infección viral (Halstead, 1970; Kliks *et al.*, 1989). Un factor determinante del fenómeno ADE es la existencia de cuatro serotipos virales (denominados DENV-1 a DENV-4) que, a pesar de que comparten casi idénticos perfiles epidemiológicos, son distintos en un 30- 35 % de su genoma y difieren en su neutralización (Chen y Vasilakis, 2011). La infección secuencial de un mismo individuo con diferentes serotipos de DENV puede conducir al ADE, como se explicará en 5.2.

Actualmente, DENV causa mayor morbilidad y mortalidad que cualquier otro arbovirus. En las últimas décadas ha aumentado enormemente su incidencia mundial. Más de 2.500 millones de personas —más del 40% de la población mundial— están en riesgo de contraer dengue. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que cada año se producen entre 50 y 100 millones de infecciones por DENV en el mundo (OMS, 2010). Otros trabajos, sin embargo, que utilizan para la estimación de la incidencia modelos matemáticos más complejos y contemplan factores como urbanización, tasas de viaje y nivel económico poblacional, estiman que la incidencia del DENV a nivel mundial podría llegar hasta los 390 millones de casos anuales (Bhatt *et al.*, 2013). En la Figura 11 se observa la zona de riesgo de la enfermedad a nivel mundial, que coincide con la zona más cálida del planeta, donde el mosquito *Aedes aegypti* sobrevive durante todo el año. De los casos informados, cada año, unas 500.000 personas, que padecen las formas más graves de la enfermedad —niños en una gran proporción—, necesitan hospitalización y la tasa de mortalidad alcanza aproximadamente al 2,5 % (Gubler, 2006; Bhatt *et al.*, 2013).

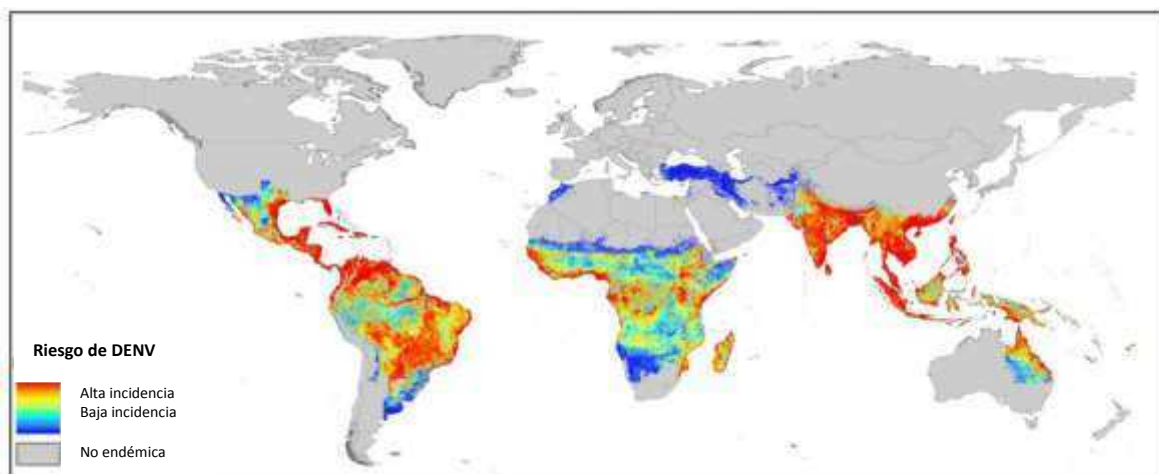


Figura 11: Distribución global de riesgo de DENV. Las áreas en riesgo están representadas en el mapa con una escala de colores que varía desde el azul (riesgo ausente) hasta el rojo (más alto riesgo). En gris están representadas las zonas donde el virus no es endémico o no existen datos al respecto. Mapa extraído y modificado de Simmons *et al.*, 2012.

1.1 Emergencia, Reemergencia y Vector

La emergencia o reemergencia de dengue como un problema de salud pública coincide con la dispersión del mosquito vector del virus a lo largo de toda la franja tropical y subtropical del globo. El principal vector de DENV, el mosquito *Aedes aegypti*, tiene sus orígenes en África y ha comenzado su expansión durante el tráfico de esclavos que sucedió entre los siglos XV y XIX. Este vector se distribuyó también por Asia y otras ciudades portuarias con los intercambios comerciales y la expansión del transporte marítimo en los más recientes siglos XVIII y XIX (Simmons *et al.*, 2012; Gubler, 2006). Sin embargo, en esos momentos, se mantuvo como una enfermedad menor y esporádica, geográficamente restringida a áreas pequeñas. En general, era muy poco conocida y escapaba de la atención de la pobre vigilancia médica que existía en las poblaciones indígenas que lo padecían (Monath, 1994). La Segunda Guerra Mundial y, en particular, el transporte de los mosquitos *Aedes sp.* alrededor del mundo, cambiaron la dispersión y el conocimiento de la enfermedad. La diseminación del virus conjuntamente con el vector se vio aumentada al terminar la guerra debido al rápido crecimiento poblacional y urbanización, así como los constantes viajes y emigraciones que se sucedieron. El pobre estado sanitario, la necesidad de almacenar agua doméstica y la situación de viviendas hacinadas, crearon condiciones favorables para la cría de *A. aegypti*. Esta especie, que inicialmente sólo se encontraba en áreas forestales, evolucionó domesticándose y cambiando su hábitat hacia zonas mucho más pobladas donde se diseminaría el

virus (Monath, 1994). Además, la existencia de un segundo vector viral, el *A. albopictus*, ha profundizado la emergencia al extenderse también dramáticamente en los años recientes (Lambretchs *et al.*, 2010).

En los años 50 se documentó, por primera vez, un caso de dengue grave durante la epidemia que tuvo lugar en las Islas Filipinas y Tailandia. Pero no fue hasta 1981 que América informó un caso de dengue grave en Cuba (Kourí *et al.*, 1986), y un gran número de casos comenzó a aparecer en el Caribe y América Latina. Anteriormente, a principios de los años 50, en esos lugares habían surgido programas efectivos de control de *Aedes* pero se vieron interrumpidos debido a la falta de financiamiento (Halstead, 2006; CDC, 2013) y prohibición en el uso de DDT, un insecticida barato y, en poco más de 10 años, el mosquito logró reinfestar la mayoría de los países de Centro y Sudamérica (Monath, 1994). Desde 1981 hasta 2005, 28 países de América han informado casos confirmados de dengue grave, entre ellos Brasil, Colombia, Ecuador, Honduras, México y Venezuela (Gubler, 2006; Torres y Castro, 2007).

A pesar de la enorme incidencia del virus, no existen actualmente vacunas o quimioterapias antivirales (Damonte *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2013) por lo que los programas sanitarios han tenido como blanco la eliminación del vector de hábitats domésticos mediante el uso de agentes químicos, larvicidas o insecticidas, además de programas de concientización de la población para eliminar lugares de cría del mosquito *Aedes sp.*. Actualmente, se sabe que es necesario un enfoque integrado del manejo del vector que incluya soluciones tanto ambientales como sociales para lograr controlar al virus de forma efectiva (Tapia-Conyer *et al.*, 2012; Gómez-Dantés y Willoquet, 2009).

1.2 Dengue en Argentina

Resumiendo su historia, el comienzo de dengue en el país ubica los primeros casos reportados en 1905 y 1911, y el primer brote del que se tiene registro en el año 1916, afectando a las provincias de Corrientes y Entre Ríos con aproximadamente 15.000 casos. En los años 60, el vector *Aedes aegypti* se erradicó del país y de todo el continente, pero reapareció en la década del 80 en algunos puntos de América del Sur, y con él nuevos brotes de dengue (Vezzani y Carbajo, 2008). En el año 1998, noventa años después de los primeros casos reportados, el dengue

comenzó a presentarse en forma de brotes esporádicos, con casos autóctonos en las provincias de Salta, Formosa, Jujuy, Corrientes y Misiones (Avilés *et al.*, 2000). Desde el año 2002 al presente, comenzaron a sucederse una serie de brotes anuales con casos autóctonos en la región norte del país. En el brote ocurrido en el año 2003 se detectó, por primera vez, que circulaban en el país tres de los cuatro serotipos conocidos (Masuh, 2008).

Las condiciones climáticas y las ineficaces acciones implementadas desde 1999 para controlar el vector, ya sea porque no son adecuadas o porque no tienen la fuerza y el convencimiento necesario para ser implementadas, derivaron en un mapa más amplio de distribución del vector en nuestro país. Como se observa en el mapa de la figura 12, el mosquito ha ganado territorio en las regiones este y sur del país. Según estudios realizados, su punto de distribución más occidental se encuentra en Guaymallén (Provincia de Mendoza) y su límite sur en Santa Rosa (Provincia de La Pampa) (Vezzani y Carbajo, 2008).



Figura 12. Distribución del *Aedes sp.* en la República Argentina. La distribución de *Aedes aegypti* se indica en color gris claro, mientras que las zonas en donde se encuentra presente *Aedes albopictus* se marcan en gris oscuro. Tomado de Vezzani y Carbajo, 2008

El año 2009 trajo consigo una gran epidemia. Después de la aparición de casos autóctonos en las provincias de Salta y Jujuy, el dengue se diseminó hacia el sur y este del país. Las particulares condiciones climáticas y la catástrofe natural de Tartagal (Provincia de Salta) en ese año, las pobres condiciones sanitarias en el norte del país, la inmigración de bolivianos luego de la

gran epidemia sufrida en ese país a fines del 2008 y las pobres estrategias para controlar el vector derivaron en una epidemia que afectó a 14 jurisdicciones (Provincias de Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Chaco, Entre Ríos, La Rioja, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán, Salta, Jujuy, Corrientes y Catamarca y Ciudad Autónoma de Buenos Aires), arrojando por primera vez un total de 26.644 enfermos. El hecho más significativo en términos de salud pública fue que, por primera vez, se produjeron en nuestro país 5 muertes debido al dengue, 3 de ellas por casos de dengue grave (Seijo *et al.*, 2009).

Con más de 80 partes de vigilancia epidemiológica anuales, guías y formación de equipos de salud y diagnóstico, políticas y publicidades para concientizar a la sociedad como “Sin mosquito no hay dengue”, el Ministerio de Salud de la Nación Argentina ha venido desarrollando tareas para prevenir un nuevo brote. De todas formas, la situación continúa siendo compleja y las medidas tomadas son insuficientes: al hecho de que 22 millones de argentinos vivan en zonas endémicas o con riesgo de dengue, se suma el aumento de la intensidad de transmisión en los países vecinos como Bolivia, Perú, Paraguay y Brasil donde los casos de dengue anuales confirmados superó en el año 2014 al millón de personas (Parte de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud de la Nación Argentina, 2015). En todo el país, en el año 2014 se han notificado y estudiado 3270 casos de pacientes con síntomas compatibles con dengue de los cuales se ha confirmado la enfermedad en 490 de ellos.

2. Dengue: el agente etiológico

El agente etiológico fue aislado por primera vez por Hotta en 1943 y Sabin en 1944. Como todos los virus, está formado por una estructura proteica, llamada cápside, que rodea y protege su genoma para ser replicado en la célula huésped. Además posee una envoltura, formada por una bicapa lipídica y proteínas, que rodea a la cápside y determina muchas de sus características infectivas.

DENV pertenece a la familia *Flaviviridae* (del latín *flavus*: amarillo), así llamada por la ictericia que induce el virus de la fiebre amarilla. Esta familia está constituida por tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. Muchos de los virus que forman parte de la familia tienen una

gran importancia sanitaria a nivel mundial, como el virus del Nilo del oeste (WNV), el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBVE), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV) y el ya mencionado virus de la fiebre amarilla (Burke y Monath, 2001; Lindenbach y Rice, 2001). Si bien los miembros de esta familia poseen características que los diferencian entre sí, comparten muchas similitudes relacionadas a la morfología del virión, organización genómica e, incluso, estrategias de replicación del genoma viral (Lindenbach y Rice, 2001).

El género *Flavivirus*, al que pertenece DENV, está compuesto por casi 80 virus, muchos de los cuales son patógenos humanos transmitidos por artrópodos que causan fiebres hemorrágicas y encefalitis. Todos tienen en común su tamaño que ronda los 40- 60 nm de diámetro, la glicoproteína E en su envoltura, el genoma compuesto por ARN de polaridad positiva que posee entre 10 y 11 kB y se traduce en una única poliproteína y otras características de su ciclo de multiplicación (Lindenbach y Rice, 2001).

2.1 Estructura del virión

Con un diámetro aproximado de 50 nm, las partículas de DENV están compuestas por un genoma de ARN de 10,7 Kb y tres proteínas estructurales (C, M y E). En la figura I3 se puede observar un esquema de los componentes del virión. Los viriones maduros poseen múltiples copias de la proteína de cápside (C) de 11 kDa que, en íntima relación con el genoma viral, forma una nucleocápside no tan organizada como la bicapa lipídica que la rodea. Esta bicapa lipídica deriva de la célula huésped de la cual brotó el virión y en ella se observan 180 copias de las proteínas M y E ancladas a la membrana. La proteína M de 8 kDa presente en los viriones maduros es, en realidad, el remanente que queda en la membrana viral luego de que la proteasa celular furina corta a la proteína prM (de 21 kDa), precursora de M. Las células infectadas con DENV liberan tanto viriones infectivos como una gran cantidad de partículas no infecciosas e inmaduras, ya que contienen sin clivar prM. Finalmente, la glicoproteína E de 53 kDa posee tres dominios estructurales distintos que, actualmente, son parte de diversos modelos teóricos que pretenden explicar su rol e importancia en la entrada viral a la célula huésped y la forma en que media la fusión de las membranas celular y viral (Rodenhuis *et al.*, 2010b; Kuhn *et al.*, 2002). En su forma

madura, esta proteína se encuentra formando dímeros, en el que cada monómero tiene tres dominios formados principalmente de láminas β (figura 14) y están conectados a la membrana lipídica por medio de un tallo anclado y dos dominios de transmembrana antiparalelos. El dominio central (DI) contiene el extremo amino-terminal de la proteína y se encuentra flanqueado, por un lado, por un dominio de dimerización alargado (DII), que posee el péptido de fusión en su extremo distal, y, por el otro, por el dominio III. DIII consiste en un dominio tipo inmunoglobulina que, se cree, contiene los sitios de interacción con los receptores celulares (Modis *et al.*, 2003; 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2005). En esta conformación de dímeros ubicados de forma antiparalela, el péptido de fusión de un monómero queda oculto entre los dominios DI y DIII del otro monómero que compone el dímero (figura 14), por lo que queda inaccesible para la interacción con membranas (Modis *et al.*, 2003; 2004; Zhang *et al.*, 2004).

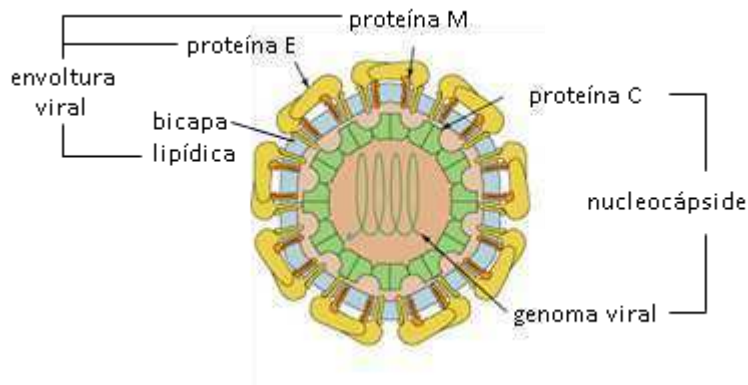


Figura 13. Componentes estructurales de dengue. Esquema de la partícula viral madura. Se señalan los principales componentes del virión.

Dentro de la estructura de la envoltura viral y la nucleocápside se encuentra el genoma viral (figura 13). Este genoma es un ARN de cadena simple y de polaridad positiva, tiene una estructura de cap tipo I (m7GpppAmpN2) en su extremo 5' pero no tiene cola poliadenilada en 3' (Clyde *et al.*, 2006). Su genoma, una vez que alcanza el citoplasma celular, puede ser leído directamente como un ARN mensajero. Posee un único marco de lectura abierto y es traducido dando una poliproteína que se cliva mediante proteasas, tanto virales como celulares, en las 3 proteínas estructurales anteriormente nombradas y 7 no estructurales (NS). Las proteínas NS incluyen una ARN polimerasa dependiente de ARN (NS5), una helicasa/proteasa (NS3) y otras proteínas que forman parte del complejo de replicación del genoma viral. El ARN viral contiene también varias secuencias y estructuras conservadas en las regiones 5' y 3' que no se traducen

(UTR), como por ejemplo secuencias complementarias de ciclación o un *stem loop* en el 3' terminal que regulan la traducción, la síntesis de ARN y la replicación viral (Harris *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2006).

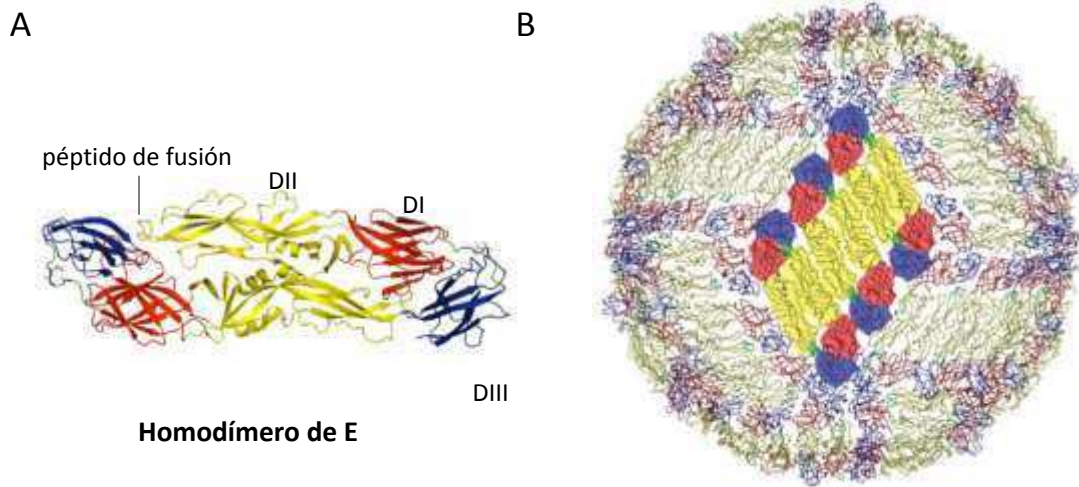


Figura 14. Estructura y organización de la proteína E en la superficie viral. La proteína E está formada por tres dominios: DI (rojo), DII (amarillo) y DIII (azul) (A). A la derecha se observa la organización en dímeros de la proteína E y el péptido de fusión (verde). Estos homodímeros de E están agrupados en trímeros en la superficie de un virión maduro (B). Ambas imágenes extraídas de Mukhopadhyay *et al.*, 2005.

2.2 Ciclo de multiplicación viral

El ciclo de multiplicación de DENV se inicia con la entrada de las partículas virales a la célula huésped. Estos primeros pasos que incluyen la adsorción e internalización de la partícula viral (figura I5A y B), por medio de la unión a receptores y la utilización de una vía de entrada celular, son uno de los principales objetos de estudio de esta tesis y, por lo tanto, serán explicados en detalle más adelante. La internalización de los viriones y la fusión de la envoltura viral y la membrana celular (figura I5B y C) permiten el desnudamiento del genoma viral para que éste alcance el citoplasma celular y pueda ser traducido.

La traducción del genoma viral (I5D) en un único marco de lectura genera una poliproteína que es co- y post- traduccionalmente procesada por proteasas celulares y virales en las tres proteínas estructurales (C, prM y E) antes explicadas y las 7 NS en el orden 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2BNS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (Lindenbach y Rice, 2001).

Luego de la traducción y plegado de cada proteína, las proteínas NS comienzan la replicación del genoma viral sintetizando cadenas de polaridad negativa. Estas cadenas son, a su vez, usadas como molde para la síntesis de las moléculas de ARN de polaridad positiva que formarán el genoma de los nuevos viriones (figura I5E). Tanto la traducción como la replicación del genoma de los virus ARN positivos ocurren asociadas a estructuras membranosas (Miller y Krijnse-Locker, 2008) y, en particular, en el caso de DENV estos procesos ocurren en estrecha asociación a membranas y vesículas derivadas del retículo endoplasmático (Welsch *et al.*, 2009).

Las moléculas de ARN de polaridad positiva sintetizadas para la replicación serían empaquetadas por la proteína C formando las nucleocápsides virales (Welsch *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la proteína C se acumula en organelas citoplasmáticas denominadas *lipid droplets*. Estas organelas podrían servir para secuestrar a la proteína C en los pasos tempranos del ciclo viral, evitando un efecto inhibitorio sobre la replicación del genoma, y a su vez podrían servir de andamio para el ensamblado de las nucleocápsides virales (Samsa *et al.*, 2009). Por su parte, las proteínas prM y E que se encuentran ancladas a la membrana del retículo forman heterodímeros que se orientan hacia el lumen (figura I5F). Los heterodímeros se organizan en trímeros y estas interacciones parecen ser responsables de inducir la curvatura de la superficie que guía la brotación de los viriones (Zhang *et al.*, 2004). No está claro cómo está sincronizado esto con la formación de la nucleocápside ya que aún no se conocen interacciones entre las proteínas C y prM/E.

Las partículas virales formadas en el retículo aún no son infectivas y maduran a lo largo de su viaje por la vía secretoria. El pH moderadamente ácido (5.8-6) del trans-Golgi dispara la disociación de los 60 heterodímeros de prM/E, permitiendo la formación de 90 homodímeros. Esta reorganización estructural de la partícula permite a una furina celular realizar el clivaje proteolítico de prM generando la proteína M y el péptido pr (figura I5G) (Yu *et al.*, 2008; Zybert *et al.*, 2008). De esta manera, las partículas de DENV alcanzan el medio extracelular maduras y listas para la entrada a una nueva célula y próxima infección (figura I5H).

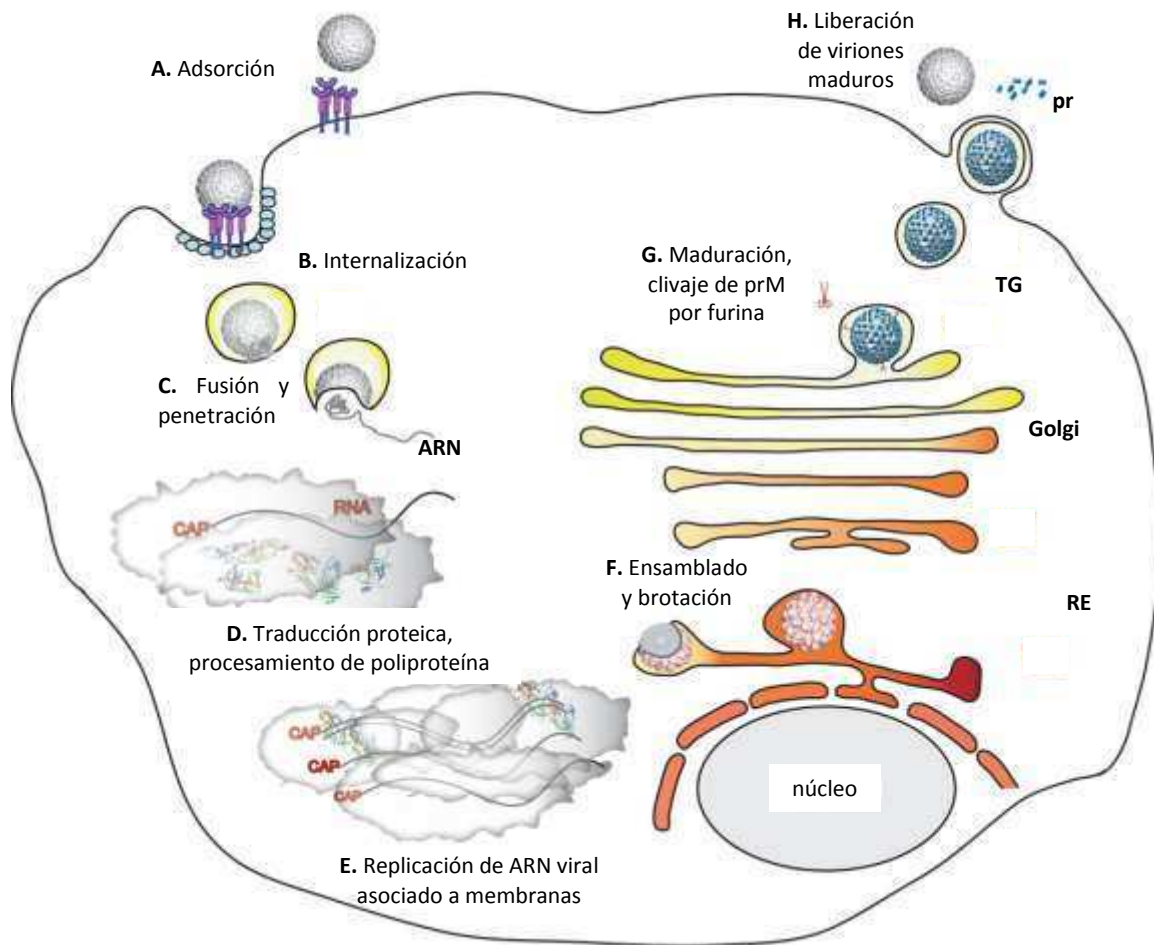


Figura 15. Ciclo de multiplicación viral de DENV. Esquema extraído de Perera *et al.*, 2008. RE: retículo endoplasmático; TG: trans-golgi.

3. Entrada Viral

En general, las partículas virales liberadas de una célula infectada tienen una estructura muy estable y altamente organizada que las convierte en partículas resistentes para realizar exitosamente la transmisión de célula a célula o huésped a huésped en el espacio extracelular (Yamauchi y Helenius, 2013). Una vez alcanzado el blanco a infectar, la interacción del patógeno con la célula es un proceso complejo. Primero deben superar la barrera física que representa la membrana plasmática. Para eso, reconocen y unen un receptor celular de manera específica, lo que determina su capacidad de infectar o no a la célula. Posteriormente, algunos virus envueltos tienen la habilidad de penetrar a la célula por fusión directa con la membrana plasmática. Otros,

en cambio, necesitan una internalización dependiente de vesículas y un descenso del pH para liberar su genoma viral al citosol (Mercer *et al.*, 2010). Todas las vías de entrada comprenden la sincronización de complejos procesos tanto de forma temporal como a distintas escalas, que involucran cientos de proteínas celulares (Barrow *et al.*, 2013; Hogle, 2002).

En el caso de los flavivirus, la entrada a la célula está coordinada por la actividad de la proteína E anclada en la membrana viral. Los dominios de esta glicoproteína están involucrados y son muy importantes, además, para el ensamblado de los viriones, la adsorción celular o unión a receptores, la fusión de las membranas celular y viral y, posiblemente, la evasión inmune en el ciclo de multiplicación de DENV (Kaufmann y Rossmann, 2011).

3.1 Receptores celulares

Los receptores celulares pueden ser proteínas, carbohidratos y/o lípidos. Muchos virus pueden usar más de un receptor para su adsorción e incluso pueden unir secuencialmente múltiples receptores para infectar una célula. Por lo tanto, es útil diferenciar entre receptores de adsorción, que simplemente permiten a los virus acercarse a la membrana celular, y los receptores de entrada, que median realmente la entrega del genoma viral al citoplasma.

Se explicó que la especificidad de unión al receptor celular es un factor determinante del tropismo viral y, por lo tanto, de la naturaleza de la enfermedad que provoca el virus. Esta especificidad del receptor determina además indirectamente la elección de la vía de entrada y, si fuese necesario, la ruta intracelular que el virus tomará.

En el caso de DENV, se demostró que es capaz de infectar *in vitro* células de origen humano (por ejemplo K562, HepG2, ECV304), de mosquito (como C6/36), de mono (Vero, BS-C-1, LLC-MK2), de hámster (BHK y CHO) y murinas (tal como P388D1). *In vivo*, el primer blanco de infección son las células del sistema inmune como las células dendríticas, monocitos y macrófagos (Kou *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2000). El amplio rango de células susceptibles indica que el virus debe unirse a alguna molécula ubicua de la superficie celular o, al menos, debe utilizar múltiples receptores para mediar la infección dependiendo de la célula que infecte (Rodenhuis-

Zybert *et al.*, 2010b). En este sentido, en los últimos años se propuso una gran cantidad de moléculas como candidatos a receptor del DENV y se identificaron diversos factores como responsables de la entrada. En células de mosquito se ha mostrado que DENV interactúa con dos proteínas de 45 y 74 kDa relacionadas con proteínas del choque térmico (HSP) (Salas- Benito *et al.*, 2007) y otra de 48 kDa no identificada (Chee y AbuBakar, 2004). En células de mamífero, en cambio, se identificaron como potenciales receptores HSP70 y HSP90 (Reyes del Valle *et al.*, 2005), proteínas asociadas a CD14 (Chen *et al.*, 1999), GRP78 (Jindadamrongwech *et al.*, 2004), DC-SIGN (Navarro- Sanchez *et al.*, 2003; Tassaneetrithep *et al.*, 2003) y otras proteínas de 37/ 67 kDa no tan caracterizadas (Moreno- Altamirano *et al.*, 2002), entre varios candidatos propuestos.

Además de las proteínas antes mencionadas, en células de mamífero se identificó como receptor al polisacárido heparán sulfato (Chen *et al.*, 1997; Germi *et al.*, 2002; Hilgard y Stockert, 2000; Dalrymple y Mackow, 2011). El heparán sulfato es un glicosaminoglicano (GAG) muy presente en los proteoglicanos de la superficie celular y en la matriz extracelular de varios tipos celulares. Está constituido por cadenas de carbohidratos polianiónicos formados por unidades repetitivas de disacáridos conteniendo ácido urónico o ácido L-idurónico y un derivado de glucosamina variablemente O-sulfatado (Esko y Selleck, 2002). Se ha observado que la interacción de DENV con GAGs requiere de una forma altamente sulfatada de heparán sulfato (Chen *et al.*, 1997). En base al reporte del heparán sulfato como posible receptor primario, se evaluaron distintos tipos estructurales de polisacáridos sulfatados como inhibidores de DENV. Estos estudios demostraron una susceptibilidad variable de acuerdo al serotipo, en el orden DENV-2>DENV-3>DENV-4>DENV-1 y una falta de susceptibilidad antiviral en células de mosquito C6/36 (Talarico *et al.*, 2005). A diferencia de lo descrito para otros virus envueltos susceptibles a la acción antiviral de los polisulfatos que sólo interfieren con la unión del virus al receptor, se encontró que estos compuestos actuaban tanto sobre la unión de DENV a la célula como sobre su internalización (Talarico y Damonte, 2007).

Esta información ha permitido proponer un proceso con varios pasos. El primero sería una interacción de las partículas virales con diversos factores de unión presentes en la superficie celular, moléculas abundantes y de baja afinidad, como el heparán sulfato o DC-SIGN, que sirven como unión inicial para concentrar las partículas virales en la superficie celular. Gracias a estas uniones las partículas de DENV podrían moverse a lo largo de la superficie celular mediante la

interacción con distintos receptores o incluso migrar como complejos virus-receptor hasta conseguir la segunda unión de los viriones. Esta segunda interacción sería la unión a receptores menos abundantes pero con alta especificidad por la proteína E de DENV y permitiría la internalización de la partícula viral a la célula (Acosta *et al.*, 2008b; Marsh y Helenius, 2006; Mercer *et al.*, 2010).

3.2 Internalización y penetración viral

La transferencia del genoma viral y sus proteínas asociadas a través de la barrera de la membrana celular hacia el citosol se llama penetración. Para los virus envueltos, esta penetración incluye la fusión de las membranas viral y celular, mientras que los virus no envueltos generan un poro en la membrana de la célula a través del cual inyectan el genoma viral.

Muy pocos virus envueltos parecen dirigir su nucleocápside hacia el citosol fusionando directamente su membrana viral con la membrana plasmática de la célula. Así por ejemplo, el virus Sendai (Pedroso de Lima *et al.*, 1992), el virus herpes simplex (Milne *et al.*, 2005; Eisenberg *et al.*, 2012) y algunos retrovirus como HIV (McClure *et al.*, 1988; Côté *et al.*, 2012) fusionan su envoltura con la membrana de la superficie celular. La mayoría de los virus envueltos, en cambio, utilizan vías endocíticas celulares para su internalización y realizan la fusión de membranas dentro del endosoma. En este caso, la maquinaria de fusión molecular se activa con la exposición de los viriones a bajo pH en el lumen de los endosomas (White *et al.*, 1980; Yoshimura *et al.*, 1982) o por clivaje proteolítico con enzimas endosomales como catepsinas (Chandran *et al.*, 2005).

Existen al menos cinco rutas de internalización (figura 16) que son utilizadas por aquellos virus que entran a la célula por endocitosis:

Fagocitosis y Macropinocitosis: estas vías de entrada difieren del resto principalmente porque requieren una gran reorganización del citoesqueleto. La fagocitosis no es normalmente usada por los virus para entrar a la célula, sino que es más bien utilizada por bacterias o grandes partículas que requieren para su internalización grandes protuberancias de membrana celular. Esta vía de entrada es utilizada por células especializadas como macrófagos, monocitos o

neutrófilos para eliminar patógenos y restos celulares. Los patógenos pueden ser reconocidos directamente por receptores fagocíticos como el receptor de manosa, los receptores *scavenger* o indirectamente por los receptores de la porción Fc de los anticuerpos y receptores de complemento que opsonizan a los patógenos (Aderem y Underhill, 1999; Goodridge *et al.*, 2012). Los factores normalmente involucrados en esta vía incluyen a la actina, RhoA, tirosina-quinasa, colesterol y dinamina-2. Según el tipo celular puede existir una dependencia por otros factores como AP2, Arf6, Cdc42 y Rac1 (Melendez y Tay, 2008; Swanson, 2008). Se ha descrito que esta vía es utilizada por el mimivirus, un patógeno de amebas, y el herpes simplex virus-1 para la infección de fibroblastos de córnea (Clement *et al.*, 2006; Ghigo *et al.*, 2008).

La macropinocitosis es inducida por factores de crecimiento y es un mecanismo no específico para la internalización de grandes volúmenes de fluidos extracelulares (Jones, 2007). Dependiendo de la extensión de la membrana celular, el diámetro de los macropinosomas puede llegar hasta 10 μm . La formación de la Vescícula Endocítica Primaria (PEV) requiere del intercambio Na^+/H^+ , de las GTPasas Rho, de varias quinasa celulares y colesterol (Kerr y Teasdale, 2009). El herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi utilizaría esta vía endocítica para la entrada a la célula (Raghu *et al.*, 2009).

Endocitosis dependiente de clatrina: Muchas partículas utilizan para la internalización esta vía de entrada que es una de las mejores caracterizadas. El modelo clásico de esta entrada tiene tres actores protagónicos: las moléculas de clatrina, el complejo proteico AP-2 y la proteína dinamina. Para la formación de las PEVs, la clatrina se recluta hacia la membrana plasmática en respuesta a señales de internalización y forma una invaginación característica que puede visualizarse al microscopio electrónico. La fisión de las vesículas de la membrana celular requiere de la GTPasa dinamina. La complejidad de la vía endocítica dependiente de clatrina queda en evidencia al comprender la enorme cantidad de moléculas, cofactores, adaptadores y enzimas involucradas en la formación de vesículas recubiertas de clatrina (Benmerah y Lamaze, 2007; Robinson, 2004). Se ha demostrado que más de 90 quinasa están involucradas en la internalización del virus de estomatitis vesicular (VSV) en células Hela para regular la entrada mediada por clatrina (Pelkmans *et al.*, 2005). Esta vía de entrada a la célula fue descrita por primera vez para el virus Semliki Forest en el año 1980 (Helenius *et al.*, 1980). Posteriormente se mostró que es utilizada por muchos virus más, entre ellos el adenovirus 2 y 5 (Bantel-Schaal *et al.*,

2002), HCV (Meertens *et al.*, 2006), Influenza A (Rust *et al.*, 2004), Sindbis (Glomb-Reinmund y Kielian, 1998), VSV (Johannsdottir *et al.*, 2009), el parvovirus canino (Suikkanen *et al.*, 2002) y el rinovirus humano 2 (Snyers *et al.*, 2003).

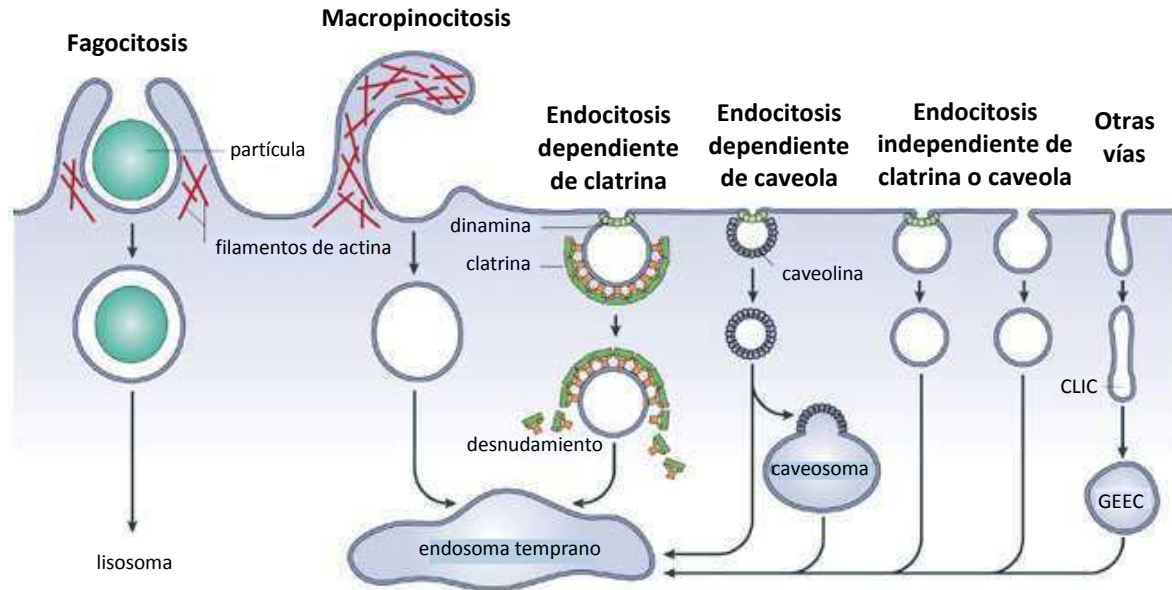


Figura 16. Vías de internalización celular. Esquema extraído y modificado de Lopez y Arias, 2010. CLIC (por sus siglas en inglés clathrin-independent carriers), GEEC (GPI-anchored-protein-enriched endosomal compartment).

Endocitosis dependiente de caveolas/lipid-rafts: *Lipid-rafts* es una definición general utilizada para referir a paquetes de lípidos, principalmente compuestos de colesterol y glicoesfingolípidos (como esfingomielina, ceramida y gangliósidos) que forman dominios ordenados en la membrana celular. Por otro lado, las caveolas (del latín: pequeñas cuevas) son invaginaciones de la membrana celular en forma de botella que tienen un diámetro aproximado de 70 nm. La formación y organización de estas PEVs requiere de caveolina, una proteína dimérica que une colesterol y glicoesfingolípidos, con una composición similar a la de los *lipid-rafts* y forma una superficie estriada en la caveola, además de depender de una compleja señalización que incluye tirosina-quinasas y fosfatasa (Pelkmans, 2005). Los virus más estudiados que hacen uso de esta vía pertenecen a la familia de poliomavirus, entre ellos los virus SV40 y dos patógenos humanos los virus BK y JC. Todos ellos tienen diferentes gangliósidos como receptores (Low *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2003). También se ha sugerido la participación de las caveolas en la internalización del picornavirus echovirus 1 (Pietiäinen *et al.*, 2004).

Endocitosis independiente de clatrina o caveola: Hay una gran cantidad de información que muestra la existencia de mecanismos de internalización viral que no utilizan las vías reguladas por clatrina y caveolina para dirigir las partículas virales hacia la red de endosomas. Los virus descritos hasta ahora que utilizan estas vías incluyen rotavirus (Sanchez- San Martín *et al.*, 2004), el virus de coriomeningitis linfocitaria (Quirin *et al.*, 2008) y el del papiloma humano 16 (Spoden *et al.*, 2008).

En la literatura de biología celular relacionada con la endocitosis existen además otras vías de internalización que no son utilizadas por ningún virus hasta ahora descrito como, por ejemplo, la vía GEEC (por sus siglas en inglés GPI-anchored-protein-enriched endosomal compartment), involucrada en la internalización de las proteínas ancladas GPI; la vía de Arf6 utilizada para la internalización del complejo mayor de histocompatibilidad y la vía IL-2 que media la internalización de algunos receptores de citoquinas (Mayor y Pagano, 2007; Mercer *et al.*, 2010).

3.3 Entrada de DENV

Aunque se ha descrito la dependencia de la vía de clatrina para la internalización productiva de varios miembros de la familia *Flaviviridae*, la evidencia experimental es menos clara en lo que respecta a la entrada de DENV. Estudios pioneros de microscopía electrónica sugirieron que las partículas de DENV-2 penetrarían por fusión directa con la membrana plasmática en células de mosquito C6/36 HT, monocitos humanos de sangre periférica y células de hámster BHK (Hase *et al.*, 1989; Lim y Ng, 1999). Sin embargo, al mismo tiempo otros trabajos demostraron la formación de sincicios inducida por la exposición a pH ácido en cultivos de células de mosquito infectados con DENV-2 (Randolph y Stollar, 1990), y la inhibición de la multiplicación viral por la adición de compuestos lisosomotrópicos (Guirakhoo *et al.*, 1993). Estos últimos resultados son indicativos del requerimiento de una entrada por una vía endocítica, y coinciden con estudios estructurales posteriores de la glicoproteína E. En lo que respecta al modo de internalización que podrían seguir las partículas virales, algunos reportes sugieren una fuerte dependencia en la presencia del colesterol de la membrana plasmática para la internalización de DENV-2 en monocitos humanos y células de neuroblastoma de ratón, sugiriendo una participación de *lipid-rafts* (Lee *et al.*, 2008; Reyes-Del Valle *et al.*, 2005). Por otro lado, trabajos que han empleado diversas estrategias experimentales demostraron que la entrada de DENV-2 en células HeLa

(Krishnan *et al.*, 2007), BSC-1 (van der Schaar *et al.*, 2008), Huh-7 (Ang *et al.*, 2010) y HepG-2 (Alhoot *et al.*, 2012) ocurría por medio de un mecanismo dependiente de clatrina. De la misma forma, otros estudios realizados demuestran que la entrada de DENV-2 en células de mosquito C6/36 transcurre por endocitosis dependiente de clatrina (Acosta *et al.*, 2008a; Mosso *et al.*, 2008), y recientemente se comprobó que los serotipos DENV-1, 3 y 4 utilizan la misma vía (Acosta *et al.*, 2011). En las células de mono Vero, DENV-1 utiliza la misma ruta de entrada que en células C6/36, pero la entrada de DENV-2 ocurre, en cambio, por una vía endocítica no clásica que no depende de la participación de vesículas recubiertas de clatrina ni de caveolas (Acosta *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos hasta ahora demuestran una vía diferencial para la entrada infectiva de DENV-2 y DENV-1 en un mismo tipo de células, Vero, como asimismo rutas de entrada alternativas para un mismo serotipo, DENV-2, según la línea celular que infecta.

Como se ha resumido aquí, los estudios *in vitro* reportados hasta el presente sobre el modo de entrada a la célula huésped en la infección primaria con DENV se han realizado fundamentalmente en diferentes líneas celulares epiteliales o fibroblásticas de mamíferos y mosquito, arrojando algunos resultados controversiales. Por el contrario, muy escasos son los conocimientos sobre el mecanismo de internalización de DENV en sistemas celulares más representativos de la infección natural en el hombre que comienza en células del sistema inmune. Reyes del Valle *et al.* (2005) reportaron que el tratamiento de células de la línea monocítica U937 con metil- β -ciclodextrina (MCD), una droga que extrae colesterol de las membranas, inhibe la infección con DENV-2, sugiriendo que las estructuras membranosas ricas en colesterol serían necesarias para una infección exitosa. Un trabajo más reciente de Alhoot *et al.* (2011) mostró que el bloqueo de la endocitosis dependiente de clatrina mediante interferencia por RNA producía una reducción significativa en el número de células infectadas por DENV-2 y en la carga viral en cultivos de monocitos humanos de sangre periférica, señalando la posibilidad del uso de esta vía para la entrada viral en estas células.

En cuanto a la fusión de membranas que permite el desnudamiento del virión y la liberación de la nucleocápside al citoplasma, se ha descrito que el pH ácido del endosoma produce el cambio conformacional de la glicoproteína E necesario para la penetración de DENV (Harrison, 2008; Stiasny *et al.*, 2011). El proceso de fusión es dependiente de energía y la única fuerza promotora de la fusión en partículas virales parece ser la energía guardada o retenida en

sus proteínas de envoltura (Carr y Kim, 1993). La figura 17 es una representación esquemática de los pasos en que se realiza la fusión de las membranas celular y viral de los flavivirus.

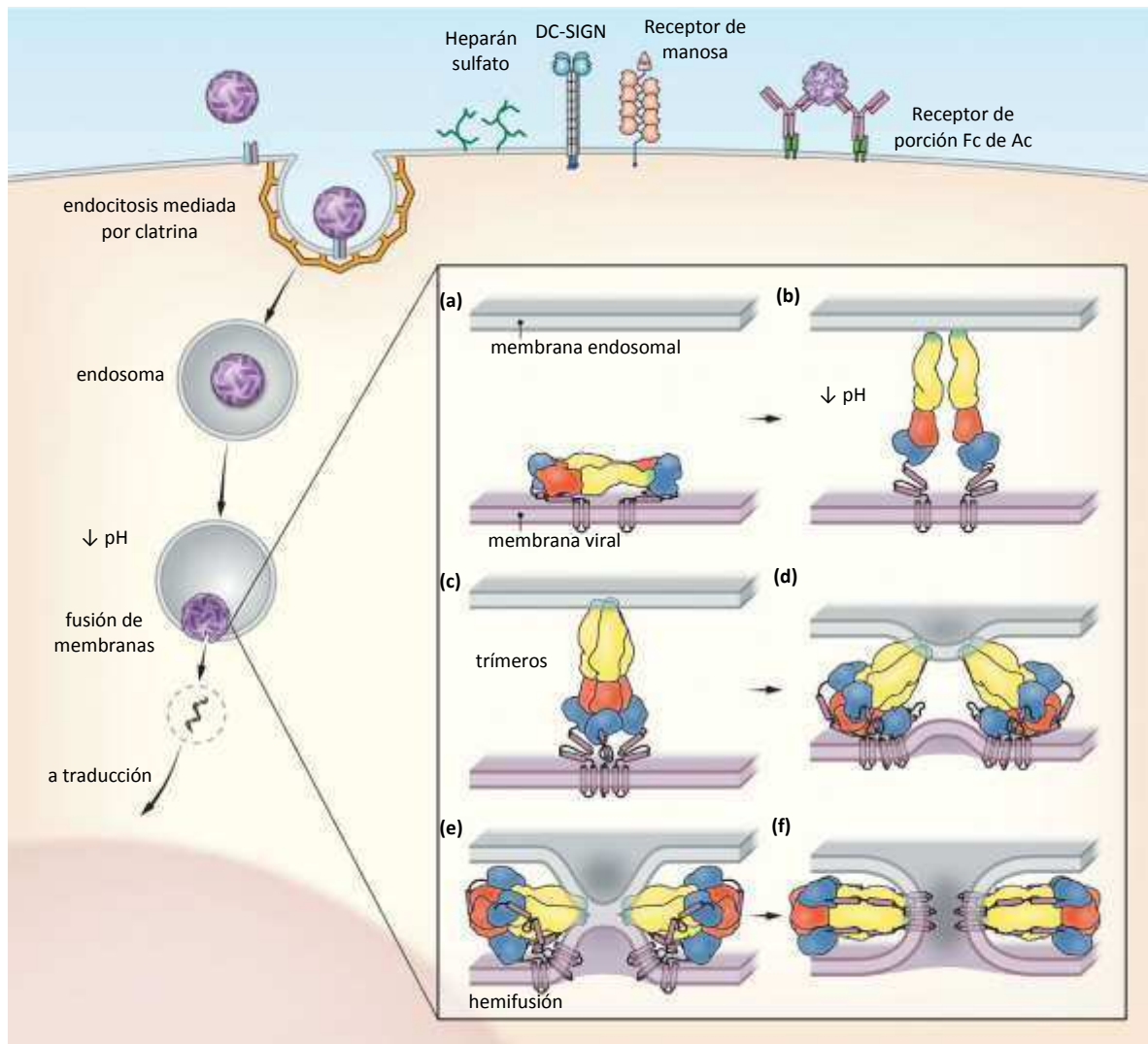


Figura 17. Detalle de la fusión de membranas celular y viral durante el proceso de entrada viral. El dímero de proteínas E está en la superficie viral con el péptido de fusión (en verde) (a). La proteína E une al receptor y se internaliza hasta el endosoma, donde el bajo pH produce una interrupción de la distribución de proteína E con la consecuente disociación de los homodímeros a monómeros, en la que el dominio II se extiende hacia la membrana de la células huésped (b). Esto implica que el péptido hidrofóbico de fusión (verde) quede expuesto y pueda insertarse en la membrana del endosoma. Así, tres copias de E interactúan a través del péptido y del dominio DII para formar un trímero más estable (c). Debido a esas nuevas interacciones, el dominio III de la proteína E se dobla sobre sí mismo y, la energía liberada por este cambio conformacional induce la formación del intermediario de hemifusión, ya que, al plegarse, trae consigo el péptido de fusión inserto en la membrana celular hacia la membrana viral (d). Como el dominio III se acerca al dominio II se realiza la hemifusión de las membranas (e) y, finalmente, al terminar el plegamiento e incorporar más proteínas E en el proceso, se forma un poro de fusión en la zona donde la región transmembrana de la

proteína E y el péptido de fusión vuelven a estar próximos. Una vez agrandado este poro se libera la nucleocápside al citosol (f). Figura adaptada de Pierson y Kielian, 2013.

4. Rol del colesterol en la infección viral

La bicapa lipídica que forma la membrana celular está compuesta principalmente por fosfolípidos y colesterol y alterar esos componentes afectará, inevitablemente, las propiedades y funciones de la membrana. Dado que la entrada de un virus envuelto culmina con la fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática o endosomal de la célula, la alteración de la capa lipídica podría interferir, entre otras cosas, con el proceso de entrada y sería un interesante blanco de acción para bloquear la infección viral.

Por otro lado, las bicapas lipídicas de la envoltura viral adquiridas por brotación son metabólicamente inertes pero tienen una curvatura positiva fuerte. Esto se evidencia al comparar la relación de superficie entre sus membranas exterior e interior. Las bicapas de las envolturas virales tienen una membrana exterior (en un virión esférico típico con 50 nm de diámetro) 11 % más grande que la superficie de la membrana interior mientras que, en una célula de mamífero, la relación de superficie de membrana exterior e interior es sólo del 0,1 % (St. Vincent *et al.*, 2010). Esta curvatura está en parte determinada por la fuerza y composición de las proteínas virales ahí insertas y la composición y distribución de cargas de la membrana lipídica viral. Es por esto que la composición de la membrana lipídica viral también podría influir en la capacidad de entrada a la célula y más específicamente en la capacidad de fusión de la membrana del virión (Teissier y Pécheur, 2007).

En ese sentido, se ha descrito al colesterol, especialmente, como un importante factor en diferentes pasos del ciclo de multiplicación viral, incluyendo la entrada del virus a la célula huésped. Sin embargo, todos los virus envueltos no son dependientes de la presencia de colesterol en ambas membranas, viral y celular, para una infección productiva. La infectividad del virus influenza (Sun y Whittaker, 2003), el virus del moquillo canino (Imhoff *et al.*, 2007) y el virus de la hepatitis B (Bremer *et al.*, 2009) son sensibles a la eliminación de colesterol sólo de sus membranas virales, mientras que, en la situación inversa, el virus de la leucemia murina (Lu *et al.*,

2002) y los virus Ebola y Marburg (Bavari *et al.*, 2002) son sensibles a la depleción de colesterol sólo de la membrana celular. Por otro lado, para HIV (Graham *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2003), el virus de la gastroenteritis transmisible (Ren *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2010), bornavirus (Clemente *et al.*, 2009) y algunos herpesvirus (Bender *et al.*, 2003; Desplanques *et al.*, 2008; 2010; Hambleton *et al.*, 2007) se requiere la presencia de colesterol en la envoltura viral y la membrana celular para una infección productiva, mientras que VSV ha mostrado una completa independencia a la extracción de colesterol tanto viral como celular (Imhoff *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 1978; Ren *et al.*, 2008; Thorp y Gallagher, 2004).

En el caso de los flavivirus, estudios *in vitro* mostraron que TBEV y WNV tienen la capacidad de fusionar sus envolturas virales con membranas compuestas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina a bajo pH en ausencia de receptor, aunque sea con baja eficiencia (Gollins y Porterfield, 1986; Corver *et al.*, 2000). El factor que dispara y aumenta la fusión de TBEV y WNV es el colesterol agregado a estas membranas artificiales (Stiasny *et al.*, 2003). Incluso en algunos casos se demostró que la disminución del nivel de colesterol de la membrana celular impidió la replicación de flavivirus, quizás por afectar la entrada viral (Das *et al.*, 2010; Medigeschi *et al.*, 2008; Puerta-Guardo *et al.*, 2010; Tani *et al.*, 2010). Sin embargo, la glicoproteína E de los flavivirus, a diferencia de lo que sucede con los alfavirus, no mostró interacción directa con el colesterol de la membrana celular o blanco (Umashankar *et al.*, 2008). Esto sugiere que el efecto que promueve el colesterol celular estaría más relacionado con la fluidez y otras propiedades fisicoquímicas de la membrana celular que con interacciones específicas del virus.

En el caso de DENV, los resultados relacionados con su dependencia del contenido de colesterol celular para la infección productiva son controversiales. Por tratamientos con agentes que afectan colesterol como MCD, nistatina o filipina se mostró que la entrada de DENV-1 y DENV-2 sería independiente del colesterol presente en la membrana de células de mosquito C6/36 (Acosta *et al.*, 2008a; Acosta *et al.*, 2011; Mosso *et al.*, 2008), células Vero (Acosta *et al.*, 2009) y células ECV304 de endotelio humano (Peng *et al.*, 2009). De forma similar, no se observó inhibición en la infección con DENV-1 y DENV-2 de células C6/36 con un contenido disminuído de colesterol por pasajes seriados en medio de cultivo conteniendo suero deslipidado (Umashankar *et al.*, 2008). Por otro lado, en otros estudios se reporta un claro requerimiento del colesterol celular para la infección de DENV-2 en monocitos humanos (Reyes del Valle *et al.*, 2005) o células

de neuroblastoma de ratón (Lee *et al.*, 2008) también utilizando MCD o filipina. Actualmente, sin embargo, todavía no está claro si las diferencias se deben al tipo celular o a las condiciones de tratamiento elegidas para alterar el contenido de colesterol en las membranas durante el estudio. En relación a la importancia del colesterol como constituyente de la partícula viral, datos preliminares muestran que el pretratamiento de una suspensión de DENV-2 con MCD antes de la infección producen una drástica reducción de la infectividad (Acosta *et al.*, 2009).

5. Neutralización y ADE

A diferencia de otras infecciones virales, en la infección humana con DENV los Ac pueden jugar un papel dual para el desarrollo y evolución de la infección. De acuerdo a las propiedades y cantidad de Ac homólogos o heterólogos que se inducen en un individuo, la interacción virus-Ac puede ser protectora o incrementadora de la infección con DENV. Distintos factores, algunos aún no claramente dilucidados, intervienen para favorecer la posibilidad de neutralizar la infección viral o aumentar su gravedad provocando el fenómeno conocido como ADE.

5.1 Modelo de Neutralización

El número de moléculas de Ac requerido para neutralizar la infectividad de un virión es un tema que ha sido ampliamente estudiado y se acepta la existencia de dos modelos. El modelo de “un solo impacto” (*single-hit*) describe la neutralización de la partícula al unir un solo anticuerpo (Dulbecco *et al.*, 1956), entendiendo que la unión de una molécula de Ac a un virión en un lugar crítico es suficiente para generar cambios conformacionales irreversibles en el virión e inactivarlo. Por otro lado, el modelo de “múltiples impactos” postula que la inactivación ocurre en función del número de moléculas de Ac unidos al virión (Della Porta y Westaway, 1978). En este caso, la neutralización es reversible y ocurre cuando el virión está unido a los Ac suficientes para superar un determinado umbral. Está descrito que los flavivirus son neutralizados por medio de este último modelo (Dowd y Pierson, 2011; Pierson *et al.*, 2007). El número de moléculas de Ac necesario para la neutralización varía según el virus, la afinidad y la accesibilidad del epítipo. Para entender las condiciones que modulan la posibilidad o no de neutralización, se define la afinidad

del Ac como la fuerza de unión de éste con el antígeno. Esta condición determina la fracción de epítopes que habrá ocupados (ocupancia) a una determinada concentración y es el primer determinante de la potencia de neutralización de un Ac (Pierson *et al.*, 2008). El segundo determinante involucrado es la accesibilidad, es decir la cantidad de epitopes accesibles a los Ac. La accesibilidad está definida por la posición del epitope de acuerdo a la configuración proteica viral. Por lo tanto, dependiendo de su afinidad y accesibilidad, no todos los Ac tienen la habilidad de neutralizar a los viriones aunque existan altísimas concentraciones de ellos (Pierson *et al.*, 2007).

5.2 ADE

Como se mencionó anteriormente, la presencia de Ac contra DENV en individuos previamente infectados es un factor determinante del progreso de la enfermedad a dengue grave. Este efecto se ha observado y descrito, inicialmente, en niños hijos de madres infectadas con DENV ya que tienen un mayor riesgo de desarrollar dengue grave con la primera infección debido a que nacen con inmunidad adquirida de la madre (Halstead *et al.*, 2002; Kliks *et al.*, 1988; Simmons *et al.*, 2007). De esto se desprende que la inmunidad inducida por la infección con un serotipo es efectiva en la protección contra el serotipo homólogo, pero sólo tiene una protección transitoria contra los otros tres serotipos. En esta hipótesis de ADE, planteada por primera vez en 1970 (Halstead), la reactividad cruzada de Ac en concentraciones subneutralizantes aumentaría la subsecuente infección al promover una más eficiente unión y entrada de los complejos virus-Ac en determinadas células mieloides (Halstead y O'Rourke, 1977a y b). Los estudios moleculares del ADE realizados con Ac específicos contra la proteína E sugieren que al osonizarse la partícula viral pero no completarse la ocupancia necesaria para superar el umbral de neutralización, estos Ac unidos podrían aumentar la eficiencia de pegado de la partícula viral con la superficie celular y facilitar la entrada de los viriones mediante los receptores de la porción Fc de los Ac (FcR) que poseen algunas células (Dowd y Pierson, 2011). En los últimos años, incluso, se describió cómo las partículas inmaduras de DENV, con gran cantidad de prM, que se creían no infectivas, también pueden tornarse infecciosas al unirse a Ac dirigidos contra prM presentes en el suero de pacientes infectados (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010a; Cardoso *et al.*, 2002).

Este factor que determina la gravedad de la enfermedad implica que, si bien es necesario desarrollar una vacuna, es imperativo conseguir que esa vacuna facilite una duradera y equitativa inmunidad contra los cuatro serotipos de forma simultánea. Actualmente, existen numerosas vacunas tetravalentes en desarrollo o en etapas de ensayos clínicos. El principal problema, en el caso de las vacunas que ya alcanzaron las etapas de ensayos clínicos, es que se observa una respuesta inmune desbalanceada entre los serotipos y sigue sin responderse la pregunta en relación a cuál sería la fórmula óptima para una equitativa inmunidad (Chokephaibulkit y Perng, 2013).

El mecanismo que subyace a este fenómeno de ADE todavía no está del todo claro. Los complejos inmunes DENV-Ac internalizados mediante FcR no sólo aumentarían el número de células infectadas, sino que también incrementarían el número de partículas virales producidas por célula. Algunos estudios demuestran que la infección de células por medio de ADE tiene como resultado una reducción en los niveles de producción de IL-2, IFN- γ , TNF- α y NO y que, por otro lado, aumentaría la producción de IL-6 e IL-10, indicando que la entrada mediada por FcR suprime la respuesta antiviral e, incluso, promueve la producción viral (Chareonsirisuthigul *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2001; Suhrbier y La Linn, 2003). Es aún más complejo al analizar las citoquinas según los tipos celulares que se estudien ya que el IFN α/β sólo es secretado por macrófagos y la IL-10 por monocitos y, a su vez, la producción de IL-10 está regulada por las características haploides de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, por sus siglas en inglés) en la región promotora de IL-10 del huésped que permiten una mayor o menor expresión de la proteína. La información, por lo tanto, sugiere que el efecto del ADE depende del tipo celular y está influido por factores genéticos del huésped (Boonnak *et al.*, 2011). Estos datos sumados a los factores enumerados anteriormente permiten visualizar la compleja trama que moldea la patogénesis de dengue.

A nivel sistémico, si bien resulta tentador y se acepta que existe una correlación entre el ADE y el dengue grave, sigue sin conocerse en detalle el mecanismo. Como ya se explicó, algunos estudios realizados *in vitro* muestran que la respuesta de líneas celulares de macrófagos en la infección mediada por Ac implica una elevada expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF α y la prostaglandina E2 que facilitarían la ruptura de uniones estrechas (Lejeune *et al.*, 2011). Esta respuesta de los macrófagos y ruptura de uniones explicaría lo observado en modelos animales de ratón que, inyectados intraperitonealmente sólo con sobrenadantes de macrófagos

que habían sido infectados mediante ADE, mostraron un incremento de la permeabilidad vascular en suero y pulmones, ambos característicos del dengue grave en humanos (Puerta- Guardo *et al.*, 2013). De la misma manera, el suero de pacientes con dengue grave provocó la ruptura de uniones estrechas en líneas celulares de endotelio humano (Appanna *et al.*, 2012). Actualmente, a pesar de que existe una vasta bibliografía (Anderson *et al.*, 1997; Basu y Chaturvedi, 2008; Chaturvedi *et al.*, 2000; Green y Rothman, 2006; Rajapakse, 2011) que procura explicar las bases moleculares e inmunológicas de algunos de los efectos sistémicos que se observan y caracterizan al dengue grave, sigue sin existir un consenso o modelo que explique cómo el ADE que se observa *in vitro* deviene en dengue grave.

5.3 Entrada de DENV en la infección mediada por anticuerpos

Si bien en algunos casos se demostró que la internalización de los viriones opsonizados sería similar a la fagocitosis mediada por receptores Fc en macrófagos (Halstead and O'Rourke, 1977b; Morens y Halstead, 1990) y que las partículas opsonizadas pueden internalizarse tanto por medio de una vía sensible a la tripsina como por medio de FcR que es insensible al efecto de la tripsina (Daughaday *et al.*, 1981), las bases moleculares de internalización de los complejos en el ADE siguen siendo poco comprendidas. Existen distintos modelos que tratan de explicar cómo las partículas virales unidas a Ac internalizadas en una célula pueden escapar del camino endocítico o fagocítico de degradación. En el caso en que los Ac posean una alta afinidad pero baja ocupancia, el complejo virus-Ac podría internalizarse a través de la glicoproteína E libre de Ac por unión a su receptor celular o a través del Ac por unión al FcR y, en ambos casos, realizar la fusión desde el lumen endosomal ácido al citoplasma e infectar la célula (figura I8A). La otra posibilidad es que los Ac tengan una baja afinidad por su epitope y, aunque su ocupancia fuese alta, se disociarían del virión en el ambiente ácido del endosoma, dejando a las partículas virales libres para infectar a la célula (figura I8B) por medio de la fusión de membranas disparada por E (Pierson y Diamond, 2008; van der Schaar *et al.*, 2009).

Un modelo adicional para explicar el ADE es que, en realidad, los Ac facilitarían la interacción de las partículas virales con su célula huésped natural. Mady *et al.* (1991) plantean esta hipótesis al demostrar que Ac híbridos que son dirigidos contra DENV y, a su vez, contra moléculas

de la superficie celular (como la ubicua β -2-microglobulina, componente de MHCII, el carbohidrato CD15 o la proteína CD33) también pueden aumentar la infección de forma similar al ADE. En esta hipótesis de ADE, DENV interactúa con los Ac y la superficie celular lo que aumenta la interacción con los receptores celulares aumentando a su vez la infección.

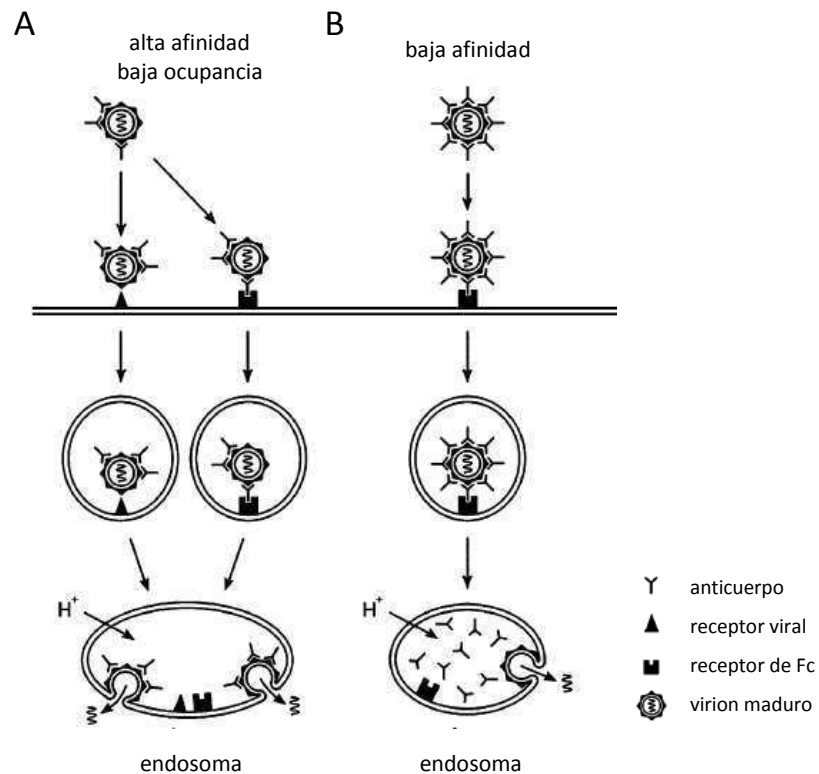


Figura 18. Modelos de ADE de la infección viral. Las partículas virales opsonizadas con alta afinidad a una baja ocupancia pueden ser internalizadas tanto por medio de un receptor viral como por un receptor de Fc, una vez en el endosoma, las moléculas de glicoproteína E libres pueden mediar la fusión de las membranas y alcanzar el citoplasma (**A**). Los anticuerpos con baja afinidad, independientemente de la ocupancia, se disocian de la partícula viral en el endosoma a pH ácido y dejan al virión libre para la fusión viral (**B**). Esquema adaptado de van der Schaar *et al.*, 2009.

Por último, sólo se ha demostrado que la infección de DENV-4 mediada por Ac en células monocíticas U937 sería dependiente del colesterol de la membrana plasmática (Puerta-Guardo *et al.*, 2010) pero no existen en la actualidad estudios directamente relacionados con la descripción de la vía de entrada de dengue en la infección por ADE.



OBJETIVOS

Según el marco teórico y experimental expuesto anteriormente acerca del conocimiento actual de la entrada de DENV en la infección productiva primaria y en el ADE, el objetivo general de este trabajo de tesis se centraliza en el estudio del mecanismo de entrada de este patógeno a células mieloides humanas, más representativas de la infección natural que las anteriormente utilizadas de mosquito y mamífero, y la implicancia que pudiese tener en la quimioterapia antiviral.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la entrada de DENV en la infección primaria en ausencia de Ac de las células mieloides humanas K562 y U937, ambas portadoras de receptores Fc.
- Establecer un sistema de infección incrementada en presencia de Ac anti-DENV (ADE) en las células K562 y U937.
- Estudiar el modo de entrada de DENV en el modelo de ADE en células K562 y U937.
- Evaluar la actividad antiviral de compuestos que inhiben la entrada viral en células mieloides humanas en ausencia y presencia de Ac.
- Analizar el mecanismo de actividad virucida sobre los viriones de DENV de agentes que extraen colesterol de la envoltura viral.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Células

La línea celular continua Vero (ATCC, CCL-81), proveniente de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*, se creció en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) (GIBCO) suplementado con 5 % de suero de ternera inactivado y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich). Para el medio de mantenimiento (MM) la concentración de suero se redujo a 1,5 %.

La línea celular de mosquito C6/36 HT (adaptada a crecer a 33 °C), proveniente de larvas de *Aedes albopictus*, se obtuvo del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) Dr. Julio Maiztegui (Pergamino, Argentina). Las células se crecieron en medio L-15 (Leibovitz) (GIBCO) suplementado con 0,3 % de caldo triptosa fosfato; 0,02 % de glutamina; 1 % de solución de aminoácidos no esenciales MEM (GIBCO), 5 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Para el MM la concentración de suero se redujo a 2 %.

Las líneas celulares humanas en suspensión U937 (mielomonocítica) y K562 (eritroleucémica), ambas provistas por la Dra. R. Gamberale, Academia Nacional de Medicina, Raji (linfocitos B derivada de linfoma de Burkitt) provista por el Dr. J. Geffner (INBIRS, Facultad de Ciencias Médicas, UBA) y H9 (linfocitos T derivada de linfoma), provista por Dra. Marina Vacotto (Facultad de Ciencias Médicas, UBA) fueron propagadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de SFB inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Las células se crecieron en botellas T25 y la densidad durante el crecimiento celular se mantuvo siempre entre $2 \cdot 10^5$ y $2 \cdot 10^6$ células/ml. Para el MM la concentración de SFB se redujo a 5 %.

Todos los cultivos se incubaron en estufa con 4 % de CO₂, los medios se suplementaron con ácido clorhídrico 1 N o HEPES 20 µM (Sigma-Aldrich) y se llevaron a pH 7,2 con bicarbonato de sodio 7,5 %.

2. Virus

La cepa Hawaii (HW) de DENV-1 fue provista por la Dra. D. Enría (INEVH, Pergamino, Argentina); las cepas Nueva Guinea C (NGC) de DENV-2, H87 de DENV-3 y 8124 de DENV-4 fueron provistas por la Dra. A. Mistchenko (Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires,

Argentina). Se utilizaron también los virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa KOS y el virus de estomatitis vesicular (VSV) cepa Indiana.

2. 1. Preparación de las suspensiones virales

Las suspensiones de DENV se prepararon en células C6/36 HT, crecidas en botellas de plástico T25, utilizando una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 unidades formadores de placa (UFP)/célula. El inóculo viral se dejó adsorber 1 h a 33 °C, luego se retiró y se cubrieron las células con MM. Los sobrenadantes se cosecharon al tercero, cuarto y quinto día post-infección (p.i.), se separaron en alícuotas y almacenaron a -70 °C hasta su uso. Los títulos de los stocks virales oscilaron entre 10^5 y 10^7 UFP/ml según el día de cosecha p.i..

Los virus HSV-1 y VSV se propagaron y titularon por formación de placas en células Vero.

2. 2. Ensayo de formación de placas de lisis

Para la cuantificación de los stocks virales se infectaron monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, con 100 μ l de diluciones seriadas al décimo de las suspensiones virales en MM. Cada dilución se ensayó por duplicado. Luego de 1 h de incubación a 37 °C se retiraron los inóculos y se cubrieron las monocapas celulares con medio de plaqueo. El medio de plaqueo consistió en MEM doblemente concentrado suplementado con 4 % de SFB y 100 μ g/ml de gentamicina, mezclado con igual volumen de una solución de metilcelulosa en agua al 2 % (Sigma-Aldrich). Luego de 6, 7, 10 o 12 días de incubación a 37 °C, según el serotipo viral, los cultivos se fijaron con formol 10 % y se tiñeron con cristal violeta 1 %. Para DENV-1 la fijación de los cultivos se realizó al 7mo día p.i., mientras que en el caso de DENV-2 la fijación se llevó a cabo el 6to día p.i. En los casos de DENV-3 y DENV-4 se incubaron durante 10 y 12 días, respectivamente, antes de la fijación.

2. 3. Concentración de las suspensiones virales

Para la obtención de stocks de alto título viral se concentraron suspensiones de DENV-2. Para ello, se infectaron monocapas de células C6/36 HT, crecidas en botellas de plástico T150, a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 h de adsorción a 33 °C, se descartó el inóculo viral y se adicionó MM. Los sobrenadantes se cosecharon al tercero, cuarto y quinto día p.i. y se juntaron para conformar una única muestra. Luego, se procedió a clarificar el sobrenadante mediante una centrifugación a 3000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante clarificado fue concentrado por ultracentrifugación (rotor Beckman SW28), a 90000 g durante 2 h a 4 °C. El sedimento se resuspendió con el agregado de 100 µl de buffer TES (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM).

3. Curvas de crecimiento viral

Para conocer la susceptibilidad a la infección con DENV-2 de las líneas celulares humanas se realizaron curvas de crecimiento viral. Para eso, $3 \cdot 10^5$ células U937, K562, H9 o Raji suspendidas en 200 µl de MM se incubaron con DENV-2 a distintas m.i. (0,1; 1 o 5). Cada 20 min se homogeneizaron las suspensiones por agitación y luego de 2 h de incubación, las células se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y se sembraron en microplacas de 24 pocillos con MM. Luego de 24, 48 o 72 h se cosecharon y titularon los sobrenadantes por formación de placas en células Vero.

4. Determinación de viabilidad celular

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos ensayados, se utilizó la tinción con azul de tripán. El azul de tripán es un colorante azoico que permite diferenciar células vivas de muertas. Debido a la selectividad de la membrana celular, las células vivas no se tiñen con el colorante mientras que las células muertas se observan teñidas de azul, lo que permite diferenciarlas fácilmente.

Cultivos celulares de líneas U937 y K562 fueron tratados con diluciones seriadas de los compuestos que afectan distintas vías de entrada, por triplicado. El tiempo de tratamiento con cada inhibidor se ajustó de manera que no se viese alterada la morfología celular, pero

asegurando el efecto deseado sobre los procesos celulares (ver secciones siguientes). Luego se eliminaron los sobrenadantes, se lavaron las células con PBS y se incubaron 100 μ l de suspensión celular con 300 μ l de azul de tripán 0,4 % durante 5 min. Se realizó el recuento de células vivas y totales en cámara de Neubauer para calcular el porcentaje de células vivas para cada concentración ensayada. De la misma forma, se determinó la viabilidad celular frente al tratamiento con los compuestos antivirales.

5. Evaluación del efecto de inhibidores químicos sobre procesos celulares

5. 1. Ensayos de internalización de ligandos marcados con fluorocromos

A fin de corroborar la efectividad del tratamiento con las drogas sobre los procesos endocíticos, se analizó la internalización de los ligandos transferrina y toxina colérica en las líneas celulares escogidas. Para verificar el efecto de los inhibidores de la vía de clatrina y dinamina, cultivos conteniendo $3 \cdot 10^5$ células U937 o K562 se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml y se trataron o no (control) con clorpromazina (20 o 40 μ M), dansilcadaverina (125 μ M o 250 μ M) o dinasore (150 μ M). Luego del pretratamiento con las drogas se incubaron los cultivos con transferrina humana conjugada a rodamina (TRITC) 15 μ g/ml (Molecular Probes) durante 30 min a 37 °C. A continuación, se lavaron los cultivos tres veces con PBS a fin de eliminar la proteína no internalizada y se fijaron con metanol sobre un vidrio cubreobjetos durante 10 min a -20 °C. Para corroborar el efecto de los inhibidores de caveolas/ lipid-rafts los cultivos de células U937 o K562 se pretrataron con MCD (2,5 o 5 mM) o nistatina (100 μ M) en MM sin suero y, luego de tres lavados con PBS, se incubaron con la subunidad β de la toxina colérica conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) 0,3 μ g/ml (Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37 °C. Finalmente, los cultivos fueron lavados con PBS y fijados con metanol como se describió anteriormente. Las muestras fijadas se montaron sobre una gota de glicerina tamponada conteniendo 2,5 % de 1,4-diazabicyclo [2,2,2]octano (DABCO) y se visualizaron bajo un microscopio Olympus BX51 con una amplificación de 400 aumentos.

5. 2. Tinción de células vivas con naranja de acridina

Para corroborar el efecto del cloruro de amonio sobre el pH de las vesículas ácidas intracelulares se realizaron tinciones de las células con el colorante naranja de acridina. Cultivos de células U937 y K562 en tubos de 1,5 ml fueron tratados con cloruro de amonio (50 mM) durante 1 h a 37 °C y luego se incubaron con naranja de acridina (1 µg/ml en MM sin suero) durante 15 min a 37 °C en presencia de los compuestos. Paralelamente, se trabajó con cultivos sin tratar con la droga (control). A continuación, las células se lavaron tres veces con PBS, se montaron en un portaobjetos sobre una gota de PBS y se visualizaron bajo un microscopio Olympus BX51 con una amplificación de 400 aumentos.

6. Inhibidores químicos: determinación de su efecto sobre la entrada y la multiplicación viral

6. 1. Mediante ensayos de inhibición del rendimiento viral

Cultivos conteniendo 3.10^5 células U937 y K562 se trataron con concentraciones crecientes de varios inhibidores específicos de diferentes vías endocíticas. Los tiempos de tratamiento y rango de concentraciones adecuados para cada inhibidor se ajustaron según los datos de viabilidad celular a fin de evitar efectos tóxicos. De acuerdo a estos datos, las condiciones de tratamiento para cada inhibidor fueron las siguientes: para nistatina (25– 100 µM en medio de cultivo sin suero) las células fueron pretratadas durante 5 h a 37 °C; para clorpromazina (10– 40 µM) las células fueron pretratadas durante 2 h a 37 °C; para cloruro de amonio (hasta 50 mM), MCD (1,25– 5 mM en medio de cultivo sin suero) y dinasore (40– 160 µM) las células fueron pretratadas durante 1 h a 37 °C; para dansilcadaverina (62,5– 250 µM) el pretratamiento fue de 30 min a 37 °C. Luego de la incubación con los compuestos, las células fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 5 UFP/célula para la entrada primaria en ausencia de Ac o 0,5 UFP/célula para las mezclas de viriones y Ac, en presencia de las drogas, a excepción de nistatina y MCD, las cuales fueron eliminadas de los cultivos previamente a la infección por medio de tres lavados con PBS. Los inóculos virales se retiraron luego de 2 h de incubación a 37 °C, se lavaron las células con PBS y se cubrieron con MM sin compuesto. A las 48 o 72 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó la multiplicación viral por el método de formación de placas de lisis en células Vero. Se calculó el porcentaje de multiplicación viral como la relación entre el título viral en la muestra

tratada con droga y el título viral en el control de virus sin tratar con compuesto multiplicado por 100. Los inhibidores utilizados fueron adquiridos en Sigma- Aldrich.

Para analizar el efecto de los compuestos después de la internalización viral, se realizó la infección de las células U937 y K562 con DENV-1 o DENV-2 durante 2 h a 37 °C. Se lavó con PBS y se realizó el tratamiento celular con los inhibidores químicos cloruro de amonio, clorpromazina y dinasore, como se explicó anteriormente. Luego de lavar tres veces con PBS, se incubaron las células con MM durante 48 h y se cosechó y tituló el rendimiento viral por medio de formación de placas en células Vero.

6. 2. Mediante RT-PCR en tiempo real

Una vez realizado el tratamiento e infección de los cultivos celulares como se indicó en 6.1, se lavaron las células 3 veces con PBS y se extrajo el ARN total de las células a las 12 h p.i. utilizando TRIzol (Invitrogen, USA). Se usaron 800 µl de TRIzol para extraer el ARN total presente en las células y se mezclaron con cloroformo. Luego de una agitación durante 15 seg y una incubación durante 10 min a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 15 seg a 4 °C. La fracción acuosa se transfirió a tubos limpios y el ARN se precipitó usando 500 µl de isopropanol. Se incubaron las muestras durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4 °C. Finalmente, luego de un lavado con etanol 70 %, las muestras de ARN se secaron al aire durante aproximadamente 10 min y se resuspendieron en 40 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas. Luego de utilizar el Nanodrop para cuantificar y conocer la pureza de las muestras, el ARN viral asociado a las células se cuantificó por PCR en tiempo real. Se utilizó un termociclador IQ (BioRad) empleando tecnología TaqMan. Los oligonucleótidos y las sondas se dirigieron a amplificar los nucleótidos 10419 a 10493 en la región 3'NC viral. Cada mezcla de reacción (25 µl) contenía concentraciones finales de buffer RT-PCR 1x, MgCl₂ 2,5 mM, desoxinucleósidos trifosfatos (dNTs) 250 mM, oligonucleótido 3' (5'-CACTACGCCATGCGTACAGC-3') 100 nM y 100 unidades de enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega). La reacción de transcripción reversa se realizó durante 1 h a 42 °C y luego se agregó el oligonucleótido 5' (5'-CCTGTAGCTCCACCT-GAGAAG-3') 100 nM, la sonda (5'-/ 56-FAM/CCGGGAGGCCACAAACCATGG/36-TAM-3') 100 nM y 2 unidades de enzima Taq ADN polimerasa (Molecular Probes) a cada tubo de reacción. La amplificación y detección por PCR se realizó

empleando las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95 °C durante 3 min y luego 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg y 61 °C durante 1 min. En paralelo, se generó una curva estándar empleando ARN de replicones de DENV transcriptos *in vitro* (Talarico y Damonte, 2007).

7. Microscopía electrónica de transmisión

Se infectaron 4 pocillos conteniendo 3.10^5 células K562 con DENV-2 a una m.i. de 20 UFP/célula. Luego de 1 h de incubación a 4 °C se transfirieron los cultivos a 37 °C durante 5 min. A continuación, se lavaron las células tres veces con PBS frío y se fijaron con buffer fosfato conteniendo 1,5 % de glutaraldehído (Fluka) durante 3 h a 4 °C. Las células fijadas se lavaron con buffer fosfato 0,1 M durante 15 min a 4 °C y, luego de extraer el sobrenadante, se incubaron con el mismo buffer durante toda la noche a 4 °C. Luego de una centrifugación a baja velocidad las células se incubaron con tetróxido de osmio 1,5 % durante 2 h a 4 °C y luego se lavaron por centrifugación con agua destilada. A continuación, se incubaron con acetato de uranilo 2 % durante toda la noche y se deshidrataron con una serie de gradientes de etanol seguido de óxido de propileno. Las células se embebieron en una mezcla de Resina Epon 812 (TAAB) y se polimerizaron durante 2 días a 70 °C. Se obtuvieron secciones ultrafinas con un cuchillo de diamante que se tiñeron nuevamente con acetato de uranilo 2 % y se observaron en un microscopio electrónico C10 Zeiss.

8. Determinación de condiciones para la infección mediada por anticuerpos

8. 1. Anticuerpos

Se utilizaron dos Ac anti-DENV: el Ac monoclonal 3H5 (subtipo IgG1), producto del hibridoma HB46 (ATCC), gentilmente provisto a nuestro laboratorio por la Dra Irene Bosch (University of Massachusetts Medical School, EEUU); el Ac monoclonal MAb8705 que corresponde al clon 2H2 (D3-2H2-9-21, subtipo IgG2a) (Chemicon).

8. 2. Ensayo de neutralización

Para conocer la reactividad neutralizante frente a DENV-2 de los Ac 2H2 y 3H5, se incubaron 50 μ l de una suspensión de DENV-2 conteniendo $1 \cdot 10^6$ UFP/ml y 50 μ l de distintas diluciones de cada Ac (1/10000- 1/50) durante 1 h a 37 °C. Como control se incubó en las mismas condiciones una suspensión viral con igual volumen de medio sin Ac. Luego de ese tiempo, se realizaron diluciones seriadas al décimo de las distintas mezclas y se cuantificó la infectividad viral remanente por el método de formación de placas en células Vero. Para cada concentración de Ac se calculó el porcentaje de infectividad remanente con respecto al control sin droga.

8. 3. Establecimiento del sistema de entrada de DENV-2 dependiente de Ac

Para establecer las condiciones de infección con DENV-2 mediada por Ac, 50 μ l de una suspensión de DENV-2 (m.i. 0,05; 0,5; 1) y 50 μ l de distintas diluciones de los anticuerpos 2H2 o 3H5 (1/10000- 1/50) se incubaron durante 1 h a 37 °C. Las distintas mezclas virus-Ac fueron luego incubadas con 100 μ l de MM conteniendo $3 \cdot 10^5$ células U937 o K562 durante 2 h, homogeneizando las suspensiones cada 20 min. Luego de ese tiempo, se lavaron las células tres veces con PBS y se incubaron en microplacas de 24 pocillos con MM. Luego de 48, 72 o 96 h se cosecharon y titularon los sobrenadantes por formación de placas en células Vero. De acuerdo a los datos de rendimiento viral obtenidos, se seleccionaron las combinaciones virus-Ac que produjeran un incremento significativo en la infección viral respecto del control de virus en ausencia de Ac para realizar los estudios de la entrada viral en esas condiciones con inhibidores metabólicos.

8. 4. Bloqueo de la entrada mediada por anticuerpos

Para realizar el bloqueo de la infección de DENV-2 mediada por Ac, se utilizó el Ac del clon AT.10 que reconoce y bloquea específicamente al receptor Fc de baja afinidad CD32, provisto por la Dra. Mirta Giordano (Academia Nacional de Medicina). Por otro lado, para bloquear el mismo receptor, también se utilizó inmunoglobulina humana previamente agregada durante 15 min a 62 °C. Para bloquear el receptor de alta afinidad CD64 se utilizó inmunoglobulina humana sin agregar

y centrifugada durante 30 min a 15000 g para eliminar posibles agregaciones de las inmunoglobulinas en el sedimento, utilizando el sobrenadante.

El bloqueo se realizó incubando $3 \cdot 10^5$ células U937 o K562 con 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ac AT.10 o de las inmunoglobulinas humanas, agregadas o no, durante 30 min a 4 °C. Luego de ese tiempo, se eliminaron del medio las inmunoglobulinas no unidas mediante centrifugación a 2000 g durante 5 min. Se incubaron las células U937 o K562 así tratadas con las mezclas DENV-2- Ac a 4 °C durante 2 h, como fue descrito en 8.3. En paralelo, se realizó la incubación de las células sin Ac, sin virus o sin inmunoglobulinas como control de cada tratamiento. Luego de ese tiempo, se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se incubaron en MM durante 72 h a 37 °C. El rendimiento viral en el sobrenadante de los cultivos se cuantificó por formación de placas en células Vero.

9. Efecto del carragenano- λ sobre la infección con DENV-2.

9. 1. Actividad antiviral del carragenano- λ sobre la infección con DENV-2.

Se infectaron cultivos conteniendo $3 \cdot 10^5$ células U937 o K562 con DENV-2 (m.i. 5) o con las mezclas de DENV-2-Ac 2H2 o DENV-2-Ac 3H5 (preincubadas durante 1 h a 37 °C en las condiciones establecidas en 8.3) durante 2 h a 37 °C en presencia de distintas concentraciones de carragenano- λ (Sigma-Aldrich). Luego de ese tiempo, se lavaron los cultivos tres veces con PBS, se agregó MM, en microplacas de 24 pocillos, en presencia del compuesto y se cuantificó el rendimiento viral a las 48 o 72 h p.i. por UFP en células Vero. En paralelo se realizó el mismo ensayo en ausencia de compuesto o de Ac como controles de los distintos tratamientos celulares.

9. 2. Efecto del tiempo de tratamiento con carragenano- λ sobre la actividad antiviral.

Cultivos conteniendo $3 \cdot 10^5$ células U937 o K562 se infectaron con DENV-2 o con mezclas DENV-2-Ac 2H2 o DENV-2-Ac 3H5 y se trataron con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de carragenano- λ en distintas etapas del ciclo de multiplicación viral. Para el estudio del efecto del carragenano- λ sobre la adsorción, las células se infectaron (con DENV-2 o mezclas DENV-2-Ac) en MM conteniendo el compuesto y, luego de 2 h de adsorción a 4°C, se agregó MM sin compuesto. Para la internalización, el virus se adsorbió a 4°C durante 2 h en ausencia de compuesto y, luego de lavar con PBS frío, se agregó MM

con 20 mg/ml de carragenano- λ . Se continuó la incubación durante 2 h a 37°C para permitir la internalización viral, se lavaron los cultivos con PBS y se agregó MM sin compuesto. Por otro lado, se realizó un tratamiento con el carragenano luego de la internalización. Para eso, después de la adsorción durante 2 h a 4°C y la internalización durante 2 h a 37°C en ausencia de droga, se agregó MM conteniendo carragenano- λ y se incubó durante 10 h. Luego de ese tiempo, se lavaron las células 3 veces con PBS y se reemplazó el medio por MM. Por último, se realizó el tratamiento con el carragenano- λ durante todo el período de infección viral. Para este tratamiento, las células se infectaron y se mantuvieron en presencia de compuesto desde la adsorción hasta completar todo el período de incubación de 48 o 72 h. Como control viral, se realizó la infección durante 48 o 72 h en ausencia del compuesto. En todos los casos se midió el rendimiento viral a las 48 o 72 h p.i. por UFP en células Vero.

10. Extracción y recuperación de colesterol de la envoltura viral

Para la extracción del colesterol viral, los stocks virales se clarificaron previamente por centrifugación a 10000 g durante 30 min. Las suspensiones de DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, HSV-1 y VSV conteniendo 1.10^6 UFP/ml se incubaron con volúmenes iguales de PBS sin suero conteniendo o no MCD (0,078- 1,25 mM) durante 1 h o nistatina (3- 100 μ M) durante 2 h, en baño térmico a 37 °C. Luego, las muestras fueron diluidas en PBS sin suero al menos 100 veces para asegurar que las drogas no tengan efectos en las células y la infectividad remanente fue determinada por formación de placas en células Vero. Para cada concentración de droga se calculó el porcentaje de infectividad remanente con respecto al control sin droga.

Para la recuperación de colesterol, se hizo el tratamiento con los compuestos y la posterior infección en PBS con 2 % de SFB. También se ensayó la adición de PBS con 2 % de SFB después del tratamiento de las suspensiones virales con MCD en ausencia de SFB.

Para analizar el efecto inactivante del tratamiento con colesterol, una suspensión de DENV-2 conteniendo 1.10^6 UFP/ml se incubó con colesterol soluble en agua (Sigma-Aldrich) (0,19- 1,5 μ M) durante 1 h a 37 °C. Luego las muestras fueron diluidas y la infectividad remanente se determinó por formación de placas en células Vero.

11. Medición de colesterol

El contenido de colesterol viral y celular se determinó utilizando el kit de ensayo de colesterol Amplex Red (Molecular Probes). Para la determinación celular, muestras conteniendo el mismo número de células ($3 \cdot 10^5$ células totales por pocillo) se trataron con MCD como se describió en 6.1, luego se lavaron tres veces con PBS y se centrifugaron a 1000 g por 2 min. El sedimento se resuspendió en 100 μ l de buffer de reacción (0,1 M de fosfato de potasio, pH 7,4; 0,125 M de NaCl; 5 mM de ácido cólico; 0,1% Tritón X-100) y se homogeneizó a través de una aguja 25-G, seguido de la determinación de colesterol por medio del fluoróforo Amplex red (10 acetil-3,7-dihidroxifenoxacina). Luego de incubar 50 μ l de muestra con 50 μ l de solución de trabajo (2 U/mL peroxidasa de rábano (HRP), 2 U/mL colesterol oxidasa, 0,2 U/mL colesterol esterasa y 300 μ M Amplex Red en buffer de reacción) durante 30 min a 37 °C y protegido de la luz, se realizó la medición de fluorescencia de acuerdo a las instrucciones, utilizando un fluorómetro FLUOstar Optima (BMG Labtech) con una longitud de onda de 540 nm para la excitación y 590 nm para la emisión. Para medir el contenido de colesterol viral, suspensiones clarificadas de viriones conteniendo $1 \cdot 10^7$ UFP/ml, tratados o no con MCD como se explicó en 10, se filtraron a través de membranas de celulosa (Vivacon 500, 100000 MWCO, Sartorius) a 2000 g durante 12 min para eliminar la droga libre y luego se utilizó el kit de medición de colesterol como se explicó anteriormente. En todos los casos, se realizó en paralelo una curva de calibración de colesterol y controles positivos con peróxido de hidrógeno y resorufina. Se eliminó la autofluorescencia restando a cada determinación el resultado obtenido de pocillos que sólo contenían buffer de reacción.

12. Estudio del mecanismo de inactivación de MCD sobre DENV-2

12. 1. Adsorción viral

Una suspensión conteniendo $1,5 \cdot 10^7$ UFP/ml de DENV-2 se trató con 1,25 mM de MCD o con PBS durante 1 h a 37 °C, y luego ambas muestras se filtraron a través de una membrana de celulosa (como se explicó en 11) para eliminar la droga. Se infectaron células Vero, crecidas en microplacas de 6 pocillos, durante 1 h a 4 °C. Luego, las células se lavaron con PBS frío para remover los viriones no adsorbidos, el ARN total se extrajo utilizando TRIzol (Invitrogen, USA) y la amplificación y cuantificación por RT-PCR en tiempo real se realizó como se explicó en 6.2.

12. 2. Internalización viral

Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 6 pocillos con suspensiones de DENV-2 tratadas o no con MCD como se explicó en 12.1. Luego de 1 h de adsorción a 4 °C, se lavaron las células tres veces con PBS frío y se incubaron a 37°C durante 1 h para permitir la internalización. Posteriormente, se lavaron las células con PBS frío y se trataron con 1 mg/ml de proteinasa K (Invitrogen) durante 45 min a 4 °C para remover el virus adsorbido no internalizado. Luego, se incorporó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM en PBS conteniendo 3 % de seroalbúmina bovina (BSA) para bloquear la acción enzimática. Se centrifugaron las células durante 3 min a 2000 g, se lavaron 3 veces con PBS conteniendo 0,5 % de BSA y se extrajo el ARN total de las células y se cuantificó por RT-PCR en tiempo real como se explicó en 6.2. El número de moléculas de ARN de DENV-2 internalizado por cultivo se expresó luego de restar la cantidad de moléculas de ARN viral presente en los cultivos en los cuales luego de la adsorción viral durante 1 h a 4 °C, se realizó inmediatamente el tratamiento con proteinasa K.

12. 3. Desnudamiento por fusión de las membranas viral y endosomal

Se infectaron células Vero crecidas en cubreobjetos con DENV-2 inactivado o no por MCD. Luego de 1 h de incubación a 4 °C, se realizaron 3 lavados con PBS frío y se adicionaron 500 µl de MM. Los cultivos se transfirieron a 37 °C para dar inicio a la internalización viral y a distintos tiempo de incubación (0, 10, 45 min) se lavaron los cultivos con PBS y se fijaron con metanol a -20 °C durante 10 min. Después de la fijación, las células fueron lavadas con PBS y teñidas con Ac monoclonales de ratón contra la proteína de cápside C (clon 6F3.1) (Bulich y Aaskov, 1992), provisto por el Dr. J. Aaskov (Universidad de Queensland, Australia), seguido de una incubación con IgG anti- ratón conjugada con FITC (Sigma-Aldrich, USA). Luego de lavar con PBS, las muestras se montaron en un portaobjetos sobre una gota de glicerina y se observaron en un microscopio Olympus BX51 con un objetivo de 100X acoplado a una cámara digital.

Para la cuantificación, las células se visualizaron en un microscopio confocal Olympus fv1000 con una lente objetivo de 60X. Las imágenes fueron analizadas con el programa Fiji para expresar la densidad de partículas fluorescentes por célula.

12. 4. Síntesis de ARN viral

Células Vero fueron infectadas con DENV-2 como control viral o DENV-2 inactivado con MCD como se describió en 12.1. Después de la adsorción, las células se cubrieron con MM y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se extrajo el ARN total usando TRIzol y la cantidad de ARN viral fue cuantificado por RT-PCR en tiempo real como se describió anteriormente.

12. 5. Expresión de proteínas virales

Se infectaron células Vero crecidas en cubreobjetos con una suspensión de DENV-2 que contenía 1.10^6 UFP/ml tratadas o no con MCD. Las células se fijaron a las 24 h p.i. con metanol durante 10 min a -20 °C y se tiñeron utilizando Ac monoclonal anti- proteína de cápside C de DENV-2 (clon 6F3.1) o Ac monoclonal anti- glicoproteína E (Abcam). Los núcleos celulares fueron teñidos con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 2 min a 37 °C, y luego de varios lavados los preparados se montaron en glicerina como se explicó anteriormente.

Para la detección de proteínas por *Western blot*, se infectaron las células Vero como se explicó antes y se lisaron a las 24 h p.i. con buffer para electroforesis (5 % dodecil sulfato de sodio (SDS), 2 % 2-mercaptoetanol, 10 % glicerol y 0,005 % azul de bromofenol en 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8) (Promega, USA). Después de hervir los lisados durante 5 min, las proteínas fueron sembradas y separadas por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida 15 % con SDS, y luego transferidas a una membrana de PVDF (Millipore, USA) por medio de voltaje durante 3 h a 36 mA constantes. Las membranas se incubaron con el antes mencionado Ac anti-proteína E durante toda la noche a 4 °C. Después de realizar lavados con buffer Tris- salino (TBS, 20 mM Tris- HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) conteniendo 0,1 % Tween 20, se realizó una segunda incubación con IgG anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente seguida de tres lavados con TBS-Tween. Como control se reveló la presencia de β - actina por medio de una incubación con un anticuerpo policlonal de ratón anti- actina (Cell Signaling Technology, USA)

seguida de una incubación con Ac anti- ratón conjugado con peroxidasa (Amersham). Finalmente, se visualizaron los anticuerpos secundarios por medio de quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (Amersham).

13. Efecto del tratamiento con MCD sobre la antigenicidad viral

Se trató una suspensión de DENV-2 conteniendo $1,5 \cdot 10^7$ UFP/ml con 1,25 mM MCD durante 1 h a 37 °C. Luego de centrifugar a 46.000 rpm (ultracentrífuga Beckman equipada con un rotor SW55Ti) durante 1,5 h, el sedimento fue lisado en 20 μ l de buffer de muestra para electroforesis. Un control viral, con PBS en vez de droga, fue procesado en paralelo a la suspensión tratada. Las proteínas fueron fraccionadas en un gel con SDS y 15 % de poliacrilamida y la glicoproteína E fue visualizada por *Western blot* utilizando el Ac monoclonal anti- E como se describió anteriormente en 12.5.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I. La entrada de virus dengue a células humanas mieloides

I.A. Estudio de la entrada de DENV-2 en la infección primaria en ausencia de anticuerpos

I.A.1- Cinética de crecimiento de DENV-2 en diferentes líneas celulares humanas mieloides

A fin de caracterizar la entrada de DENV-2 en células humanas mieloides más representativas de la infección natural que aquellas líneas celulares epiteliales/fibroblásticas ya estudiadas, se probó inicialmente la susceptibilidad a DENV-2 de varias líneas celulares con receptores Fc que permitieran tanto el estudio de la infección viral en ausencia como en presencia de anticuerpos. Las líneas celulares elegidas para ensayar fueron U937, K562, H9 y Raji, cuyas características se presentan en la sección de MyM. Para conocer la susceptibilidad de las distintas líneas celulares y establecer las condiciones óptimas de trabajo, se realizaron las curvas de crecimiento de DENV-2, cepa NGC.

Las cuatro líneas celulares se infectaron con DENV-2 a una m.i. de 1 UFP/célula y se midió la producción viral durante 4 días, mediante titulación de los sobrenadantes por UFP en células Vero. Las células H9 y Raji no mostraron una susceptibilidad aparente a la cepa NGC de DENV-2 durante el período ensayado mientras que para el resto de las líneas celulares se pueden observar las curvas de crecimiento viral en la figura R1. En los dos sistemas, el virus multiplicó con limitada eficiencia, produciéndose un incremento de 0,5- 1 unidades logarítmicas entre las 24 y 48 h p.i., con baja producción viral en general, y a partir de ese tiempo los títulos se mantuvieron o hubo un leve incremento. A fin de determinar el efecto de la m.i. en la multiplicación de DENV-2 y optimizar el sistema, se ensayaron las curvas de crecimiento en cultivos de U937 y K562 a alta y baja m.i. Al utilizar una m.i. de 0,1 UFP/célula los rendimientos virales fueron menores, especialmente con diferencias más notables a tiempos posteriores a las 24 h. Como era de esperar, al aumentar la m.i. a 5 UFP/célula pudo observarse concomitantemente un aumento de la multiplicación viral, obteniéndose títulos alrededor de 10^6 UFP/ml a las 48 h p.i. y con pocos cambios en los rendimientos a las 72- 96 h p.i..

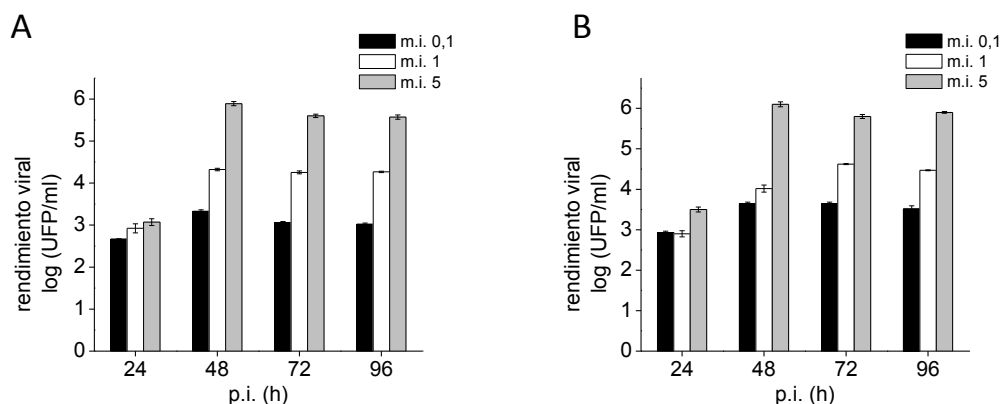


Figura R1. Curvas de crecimiento de DENV-2 en células U937 y K562. Cultivos de células U937 (A) y K562 (B) fueron infectados con DENV-2 a distintas m.i. (0,1; 1; 5 UFP/célula). Luego de 2 h a 37°C, se lavaron las células 3 veces con PBS y se agregó MM. A los distintos tiempos indicados se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó la multiplicación viral por formación de placas en células Vero. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE (desvío estándar).

En base a los resultados obtenidos, se decidió estudiar la vía de entrada de DENV-2 en las células susceptibles infectadas con una m.i. de 5 UFP/célula y medir los rendimientos virales a las 48 h p.i.

1.A.2- Caracterización de la vía endocítica para la entrada infectiva de DENV-2

El estudio del mecanismo de endocitosis utilizado por DENV-2 para su internalización en células humanas mieloides se encaró analizando el efecto de diferentes inhibidores farmacológicos de las distintas vías endocíticas celulares sobre la capacidad del virus de establecer una infección productiva en dichas células.

1.A.2.1- Dependencia del pH

Como ya se explicó, varios estudios han demostrado que la proteína E sufre cambios conformacionales que permiten la fusión de la membrana del virión de DENV con la membrana celular y, luego, la entrada de la nucleocápside al citoplasma celular (Smit *et al.*, 2011; Stiasny *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2004). Estos cambios han sido extensamente estudiados; son producto de la protonación de uno o más residuos de histidina de la proteína E al exponerse al pH ácido de los

endosomas (Harrison, 2008; Stiasny *et al.*, 2011). Por esa razón, se evaluó inicialmente la dependencia del pH para la infección productiva en estas líneas celulares.

Con este propósito, se estudió el efecto sobre la multiplicación viral de un compuesto que eleva el pH de las vesículas ácidas intracelulares: el cloruro de amonio, una base lisosomotrópica débil que se utiliza con este fin (Acosta *et al.*, 2012; Mizzen *et al.*, 1985).

En primer lugar, se analizó el efecto citotóxico que la droga pudiera tener sobre las líneas celulares elegidas utilizando el método de exclusión por tinción con azul de tripán. Para eso, luego de tratar con concentraciones crecientes de la droga durante 3,5 h a 37°C, se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en una solución de azul de tripán para contarlas en cámara de Neubauer. El porcentaje de viabilidad celular se calculó según la exclusión o no del colorante en relación al control celular incubado sin droga. En la figura R2A, se observa que el tratamiento con concentraciones crecientes del compuesto hasta 50 mM mantiene la viabilidad celular por encima del 80 % en las líneas ensayadas.

Luego se comprobó, mediante tinciones con naranja de acridina, que el compuesto utilizado ejerciera su efecto sobre el pH vesicular. Este colorante catiónico se acumula en el interior de las vesículas ácidas y, al protonarse, no puede difundir libremente para abandonar el compartimento, cambiando a su vez la emisión de su longitud de onda que vira al naranja. En condiciones de pH alcalino, en cambio, colorea ácidos nucleicos y vesículas emitiendo en el espectro de los colores verdes (Palmgren, 1991). Luego de un tratamiento con cloruro de amonio 50 mM, las células se incubaron con naranja de acridina y se observó la fluorescencia en un microscopio. Así, los cultivos controles presentaron un patrón de vesículas ácidas de color naranja mientras que en los cultivos tratados se detectaron abundantes vesículas de color verde y una completa ausencia de fluorescencia naranja (figura R2B). Esto permitió comprobar que el compuesto efectivamente aumenta el pH intravesicular en estas líneas celulares.

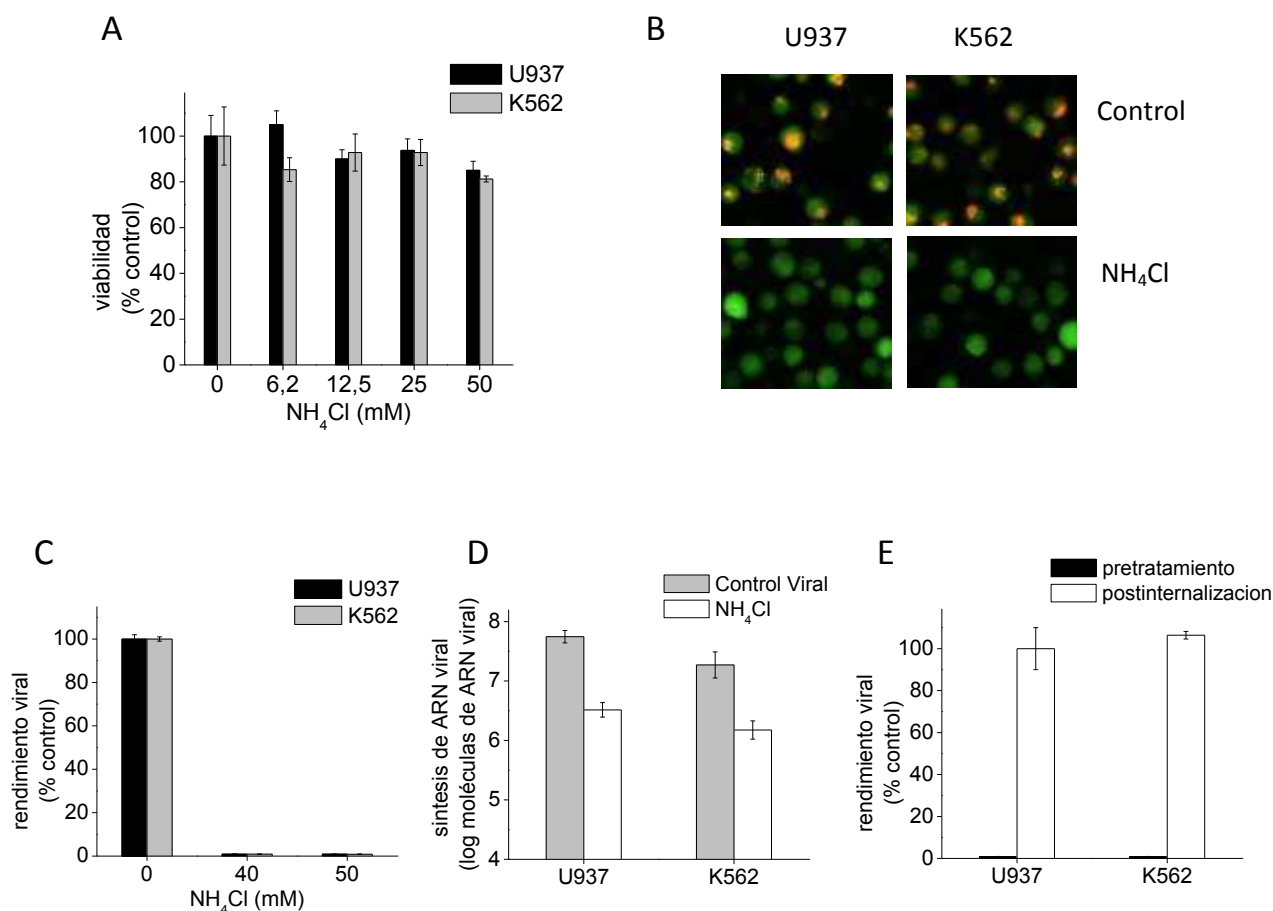


Figura R2. Efecto del cloruro de amonio en la infección de células U937 y K562 con DENV-2. A. Viabilidad celular. Cultivos de células U937 y K562 fueron tratados con concentraciones crecientes de cloruro de amonio durante 3,5 h a 37°C y, luego de lavarlos con PBS, fueron resuspendidos en azul de tripán para calcular la viabilidad celular. **B. Cambio de pH de vesículas ácidas.** Cultivos de células U937 y K562 fueron tratados con cloruro de amonio 50 mM durante 1 h a 37°C y luego fueron incubados con 1 µg/ml de naranja de acridina en presencia del compuesto inhibitorio. Luego de 15 minutos las células se observaron en un microscopio de fluorescencia. Aumento: 400X. **C. Rendimiento viral.** Las células fueron tratadas durante 1 h con distintas concentraciones de cloruro de amonio y luego infectadas con DENV-2 a una m.i. de 5 UFP/célula. Luego de 2 h de internalización a 37°C en presencia del compuesto los cultivos se lavaron con PBS y fueron cubiertos con MM. Se cuantificó el rendimiento viral a las 48 h p.i. por el método de formación de placas en células Vero. **D. Multiplicación de DENV-2 por RT-PCR.** Las células U937 y K562 fueron tratadas e infectadas como en C y luego de 12 h se lavaron y cosecharon utilizando Trizol. Luego de la extracción del ARN total, se cuantificó el ARN viral mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores son el promedio de dos determinaciones independientes ± DE. **E. Tratamiento post-internalización.** Cultivos de células U937 y K562 se infectaron con DENV-2 y, luego de 2 h a 37°C, las células se lavaron con PBS y se agregó MM conteniendo cloruro de amonio 50 mM durante 1 h. Luego, se lavaron los cultivos 3 veces con PBS, se cubrieron con MM y se cuantificó el rendimiento viral a las 48 h p.i. Como control, se realizó el mismo pretratamiento con droga descrito en C. Los resultados están expresados como porcentaje de viabilidad (A) o infectividad (C, E) en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes ± DE.

Una vez comprobada la actividad aumentadora del pH y determinadas las concentraciones no citotóxicas a utilizar, se estudió el efecto del cloruro de amonio sobre la multiplicación viral. Mediante ensayos de rendimiento viral se observó que el aumento del pH endosomal durante la entrada viral producido por la droga inhibió marcadamente la multiplicación de DENV-2 en células U937 y K562. En la figura R2C puede observarse que la inhibición del compuesto sobre el rendimiento viral fue superior al 99,9 %. De la misma forma, ensayos de RT-PCR en tiempo real confirmaron la inhibición del cloruro de amonio sobre la infección de DENV-2. En la figura R2D se observa una marcada reducción de la cantidad de moléculas de ARN viral sintetizadas, de alrededor de un orden de magnitud, en aquellas células infectadas luego de ser tratadas con el compuesto, al compararlas con células no tratadas e infectadas con DENV.

Por último, con el fin de comprobar que el tratamiento con el compuesto afecta solamente la entrada viral, se agregó el cloruro de amonio a células infectadas luego de 2h de infección, cuando ya tuvieron lugar los procesos de adsorción e internalización de los viriones. Así, puede observarse en la figura R2E que en esas condiciones el rendimiento de DENV-2 no estuvo afectado al utilizar la máxima concentración ensayada de cloruro de amonio 50 mM en ninguna de las dos líneas celulares. Esto permite descartar que el compuesto inhiba la multiplicación viral por interferencia con etapas posteriores a la entrada.

Los resultados obtenidos en conjunto con los controles realizados indican que la entrada primaria de DENV-2 a células U937 y K562 ocurre por un mecanismo de endocitosis dependiente de pH ácido. Sólo las partículas virales expuestas a ese pH en el endosoma llegarían al citoplasma celular para alcanzar una infección productiva.

1.A.2.2- Endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina

La endocitosis mediada por clatrina fue la primera vía descrita, esto la convierte en la mejor caracterizada, y es también la más utilizada por los virus para ingresar a las células (Marsh y Helenius, 2006; Thorley *et al.*, 2010). A fin de determinar si la entrada de DENV-2 en células U937 y K562 ocurre por esta vía se estudió el efecto de los inhibidores específicos clorpromazina y dansilcadaverina sobre la infección viral. La clorpromazina es una molécula catiónica anfipática que altera el ensamblaje de las redes de clatrina en la superficie celular y en los endosomas (Wang

et al., 1993), mientras que la dansilcadaverina es una monoamina que inhibe el agrupamiento de los complejos ligando-receptor, impidiendo en consecuencia su internalización (Davies *et al.*, 1984; Schlegel *et al.*, 1982). Ambos compuestos son ampliamente utilizados con el fin de bloquear esta vía endocítica (Acosta *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2012).

Primero, se determinaron las concentraciones no citotóxicas de los compuestos por medio de tinciones con azul de tripán como se explicó anteriormente. En la figura R3A, se observa que el tratamiento con clorpromazina mantuvo la viabilidad de las células K562 por encima del 80 % hasta una concentración de 40 μ M, mientras que en las células U937 la droga fue citotóxica por encima de 20 μ M. La dansilcadaverina tuvo un efecto similar, ya que sobre las células U937 no hubo efectos citotóxicos hasta una concentración de 125 mM, en tanto que en las células K562 se registró una viabilidad mayor al 90 % luego del tratamiento con dansilcadaverina 250 mM.

Por otro lado, la efectividad del tratamiento utilizado para inhibir esta vía endocítica en células mieloides fue evaluada utilizando como control la entrada de transferrina, una proteína marcadora de la internalización dependiente de clatrina (Dautry- Varsat, 1986; Hopkins y Trowbridge, 1983). Por esta característica, se analizó su internalización en las mismas condiciones de pretratamiento a ser utilizadas para los ensayos de rendimiento viral. Luego de tratar las células U937 o K562 con clorpromazina o dansilcadaverina, se realizó la incubación con transferrina-TRITC y se visualizaron los cultivos en un microscopio de fluorescencia. En las células controles, la transferrina internalizada pudo observarse como un puntillado citoplasmático y zonas de acumulación de fluorescencia mientras que, en los cultivos tratados con los inhibidores la proteína presentó un patrón diferente visualizándose una fluorescencia muy difusa en la superficie de las células (figura R3B).

Para determinar el efecto sobre la entrada viral, se realizaron tratamientos de las células con las concentraciones no citotóxicas de clorpromazina o dansilcadaverina antes y durante las 2 primeras horas de infección. Como se observa en la figura R4A, ambos compuestos redujeron considerablemente la multiplicación de DENV-2 en ambas líneas celulares al estar presentes antes y durante la internalización viral. Clorpromazina resultó un muy fuerte inhibidor de la infección de DENV-2 con una reducción del rendimiento viral mayor al 99 % en ambos tipos celulares. De forma similar, la inhibición de la dansilcadaverina sobre la multiplicación de DENV-2, fue del 97,6- 99,5 %, según la línea celular y la concentración empleada. La inhibición que ejerce la clorpromazina sobre

la infección de DENV fue confirmada al realizar una medición de ARN viral por medio de una RT-PCR en tiempo real. Como se observa en la figura R4B, la cantidad de ARN viral se vio disminuida en aquellas células U937 o K562 que habían sido previamente tratadas con el inhibidor en relación a los cultivos controles no tratados.

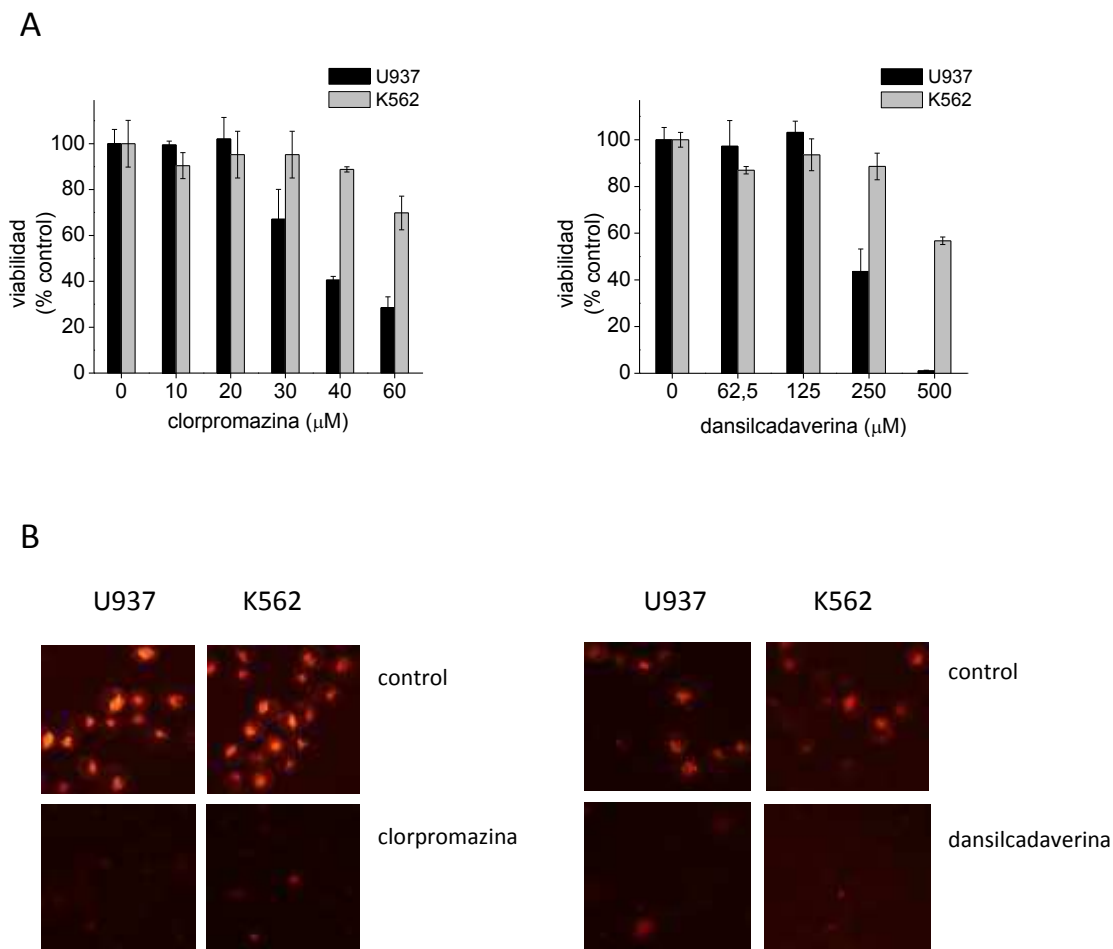


Figura R3. Efecto de inhibidores químicos de endocitosis dependiente de clatrina en células U937 y K562.
A. Viabilidad celular. Cultivos de células U937 y K562 fueron tratados con concentraciones crecientes de clorpromazina durante 4,5 h o dansilcadaverina por 2,5 h a 37°C. Luego de lavar las células con PBS, fueron resuspendidas en azul de tripán para calcular la viabilidad celular. Los resultados están expresados como porcentaje de viabilidad en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE. **B. Entrada de transferrina.** Cultivos de células U937 y K562 fueron tratados con clorpromazina 20 μ M o 40 μ M, dansilcadaverina 125 mM o 250 mM, respectivamente, o MM (control) durante 2 h a 37°C. Luego fueron incubados con 20 μ g/ml de transferrina-TRITC, en presencia de las drogas, durante 1 h a 37°C, las células se fijaron y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia. Aumento: 400X.

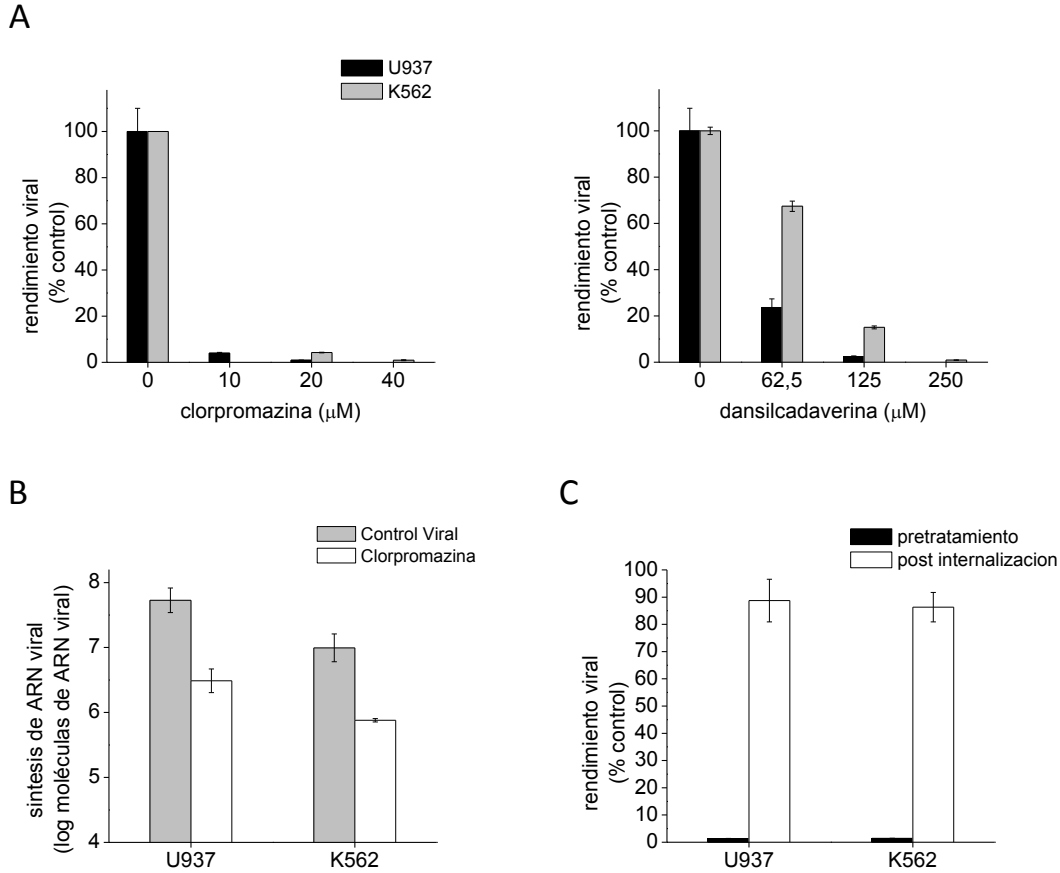


Figura R4. Efecto de inhibidores químicos de endocitosis dependiente de clatrina en la infección de células U937 y K562 con DENV-2. A. Rendimiento viral. Las células U937 o K562 fueron tratadas durante 1 h con clorpromazina o 0,5 h con dansilcadaverina y luego infectadas con DENV-2 a una m.i. de 5 UFP/célula. Luego de 2 h de incubación a 37°C en presencia de los compuestos, los cultivos se lavaron con PBS y fueron cubiertos con MM. Se cuantificó el rendimiento viral a las 48 h p.i. por el método de formación de placas en células Vero. **B. Multiplicación de DENV-2 por RT-PCR.** Las células U937 y K562 fueron tratadas con clorpromazina e infectadas como en A y luego de 12 h se lavaron y cosecharon utilizando Trizol. Luego de la extracción del ARN total, se cuantificó el ARN viral mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores son el promedio de dos determinaciones independientes \pm DE. **C. Tratamiento post-internalización.** Células U937 o K562 se infectaron con DENV-2 (m.i. 5 UFP/célula) durante 2 h a 37°C. Luego, las células se lavaron con PBS y se agregó MM conteniendo clorpromazina 20 μ M (U937) o 40 μ M (K562) durante 1 h. Luego de lavar los cultivos con PBS, se cubrieron con MM y se cuantificó el rendimiento viral a las 48 h p.i. Los resultados están expresados como porcentaje de infectividad (A, C) en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

Por último, se realizó también el tratamiento con clorpromazina en células infectadas con DENV-2 a tiempos posteriores a la internalización viral. En estas condiciones, no se observó inhibición del rendimiento viral en ninguna de las dos líneas celulares (figura R4C). Por lo tanto, la

inhibición de la multiplicación viral observada se debe únicamente al efecto que el compuesto ejerce en la entrada del virus a las células U937 y K562.

Estos resultados permiten concluir que la internalización de DENV-2 en las células U937 y K562 ocurre por una vía dependiente de clatrina.

1.A.2.3- Endocitosis dependiente del colesterol celular, mediada por caveolas/ lipid-rafts

El siguiente paso consistió en evaluar si la endocitosis mediada por caveolas/ *lipid-rafts*, que es otra de las vías de internalización descritas y bien caracterizadas para virus, podía ser también empleada en forma alternativa por el virus DENV-2 para la entrada primaria a las líneas celulares U937 y K562. Es conocido que, por ser los *lipid-rafts* dominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol, esta vía endocítica está estrechamente relacionada con el contenido de ambos lípidos (Ilangumaran y Hoessli, 1998). Por lo tanto, se eligió para trabajar los compuestos MCD y nistatina dado que ambos interactúan con el colesterol presente en la membrana celular. Mientras la MCD extrae el colesterol solubilizándolo dentro de su anillo de azúcares (Christian *et al.*, 1997), la nistatina forma un complejo con él dentro de la membrana celular (Weissmann y Sessa, 1967). Ambos compuestos interfieren en la composición y estructura de *lipid-rafts* (Anderson *et al.*, 1996; Martín *et al.*, 2012), convirtiéndose en compuestos ampliamente utilizados con el fin de bloquear esta vía de entrada.

En primer lugar, se determinó la citotoxicidad de ambos compuestos por tinción con azul de tripán y recuento celular. En la figura R5A se observa que las mayores concentraciones no citotóxicas encontradas dependieron de la línea celular. Para MCD, las células K562 no se vieron afectadas en su viabilidad hasta una concentración 5 mM mientras que las células U937 mostraron una leve disminución de viabilidad a partir de 2,5 mM. El tratamiento con nistatina, en cambio, mantuvo la viabilidad celular por encima del 80 % en ambas líneas celulares hasta una concentración de 100 μ M.

Con el fin de verificar que los compuestos efectivamente interfirieran la entrada dependiente de caveolas, se analizó su efecto sobre la internalización de la subunidad beta de la toxina colérica. Esta proteína ingresa a las células de forma dependiente de colesterol y es utilizada como marcador de la vía endocítica mediada por caveolas/ *lipid-rafts* (Margheri *et al.*,

2014; Orlandi y Fishman, 1998). Luego del tratamiento con los compuestos y la incubación con la toxina colérica fusionada a FITC, se visualizaron las células en un microscopio de fluorescencia (figura R5B). En las células controles, sin tratamiento, la toxina fue visualizada dentro de vesículas endocíticas o acumulada en zonas perinucleares, mientras que en los cultivos tratados con MCD o nistatina no se detectó fluorescencia internalizada.

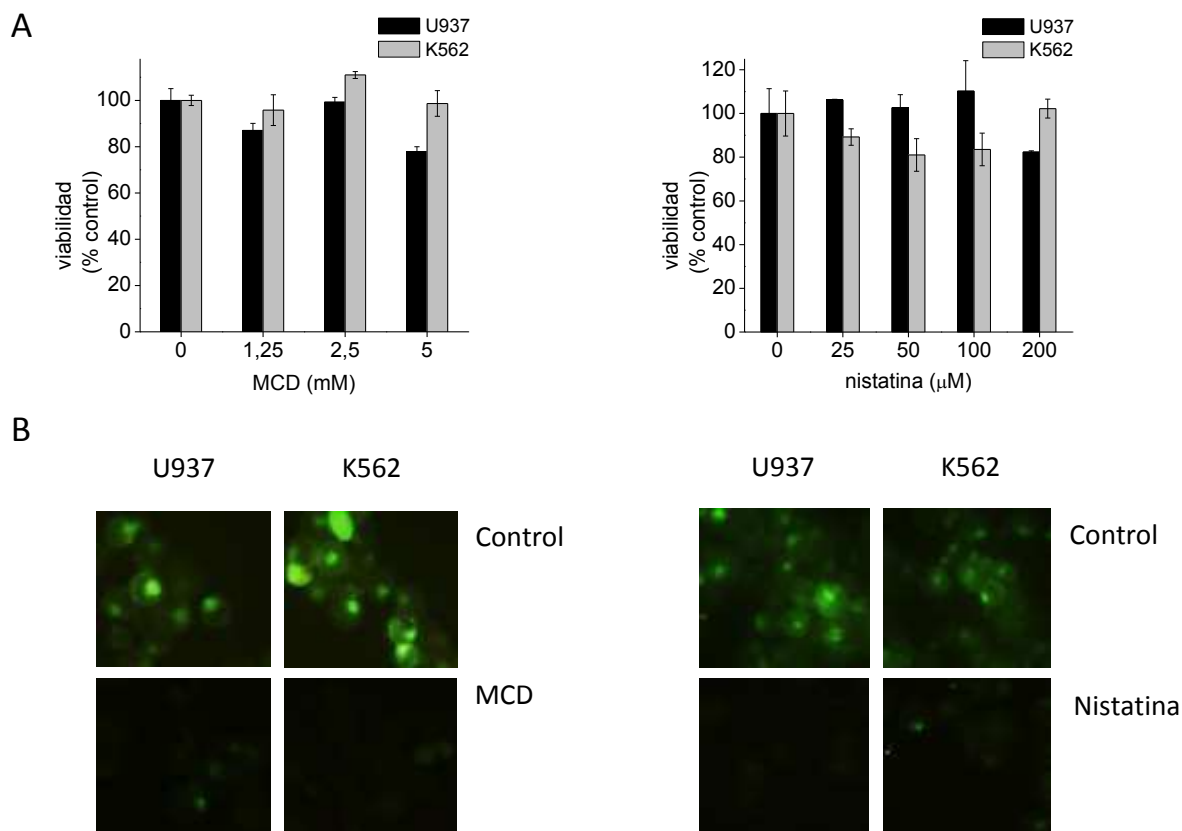


Figura R5. Efecto de inhibidores de vías dependientes de colesterol en células U937 y K562. A. Viabilidad celular. Cultivos de células U937 y K562 fueron tratados con concentraciones crecientes de MCD durante 1,5 h o nistatina por 5,5 h a 37°C y, luego de lavarlas con PBS, fueron resuspendidas en azul de tripán para calcular la viabilidad celular. Los resultados están expresados como porcentaje de viabilidad en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE. **B. Entrada de toxina colérica.** Cultivos de células U937 y K562 fueron tratados con 2,5 o 5 mM MCD, respectivamente, 100 μ M nistatina o MM (control) durante 1 h a 37°C y luego fueron incubados con 1 μ g/ml de toxina colérica-FITC. Luego de 1 h las células fueron fijadas con metanol y se montaron para su observación en un microscopio de fluorescencia. Aumento: 400X.

Para comprender las condiciones experimentales que se usaron a continuación cabe recordar que los virus adquieren su envoltura a través de un proceso de brotación desde membranas celulares y, en consecuencia, la envoltura está constituida por una bicapa de lípidos, proveniente de la célula, donde se insertan las glicoproteínas virales. Por lo tanto, los compuestos que interactúan con el colesterol pueden alterar la estructura y composición de la envoltura viral y afectar la capacidad infecciosa de los viriones. En el caso particular de DENV-2, el tratamiento de una suspensión viral con MCD o nistatina produjo una marcada inactivación de los viriones con pérdida de la infectividad viral (Ver Capítulo III, figura R19A y R19B). Debido a la actividad virucida de ambos compuestos sobre DENV-2, para evaluar su efecto sobre la entrada del virus a la célula se utilizaron condiciones experimentales que permitieran tratar las células con las drogas antes de la infección viral y realizar repetidos lavados con PBS antes de la adsorción viral, para asegurar la eliminación del compuesto. Estas condiciones experimentales permiten examinar el efecto de las drogas sobre la infección de DENV-2 afectando únicamente el contenido lipídico de la membrana celular pero sin el contacto directo entre la droga y los viriones que produciría inactivación viral. En estas condiciones, no se observó inhibición en la producción viral obtenida a partir de células U937 o K562 por pretratamiento con ambos compuestos (figura R6A), indicando que la entrada de DENV-2 a dichas células es independiente del contenido de colesterol celular. El mismo resultado se obtuvo al medir el ARN viral sintetizado 12 h luego del tratamiento, ya que no se observó inhibición en aquellas células con pretratamiento con MCD (figura R6B).

A fin de asegurar que las condiciones de tratamiento con MCD utilizadas en nuestro protocolo experimental producían de forma efectiva la extracción de colesterol de las membranas celulares, se utilizó un método comercial de medición de colesterol que permite su determinación en un rango de concentraciones apropiado. La metodología empleada se basa en la fluorescencia que emite el fluoróforo Amplex Red en presencia del peróxido de hidrógeno que se obtiene de forma proporcional a la oxidación del colesterol que haya presente en la muestra a medir. En la figura R6C puede observarse que el tratamiento con MCD extrae entre 40 % y 90 % del contenido de colesterol celular en relación a las células no tratadas. Sin embargo, a pesar de comprobarse efectivamente esta importante pérdida de colesterol de las membranas celulares, no se ve afectada la multiplicación de DENV-2, como se observa en la figura R6A.

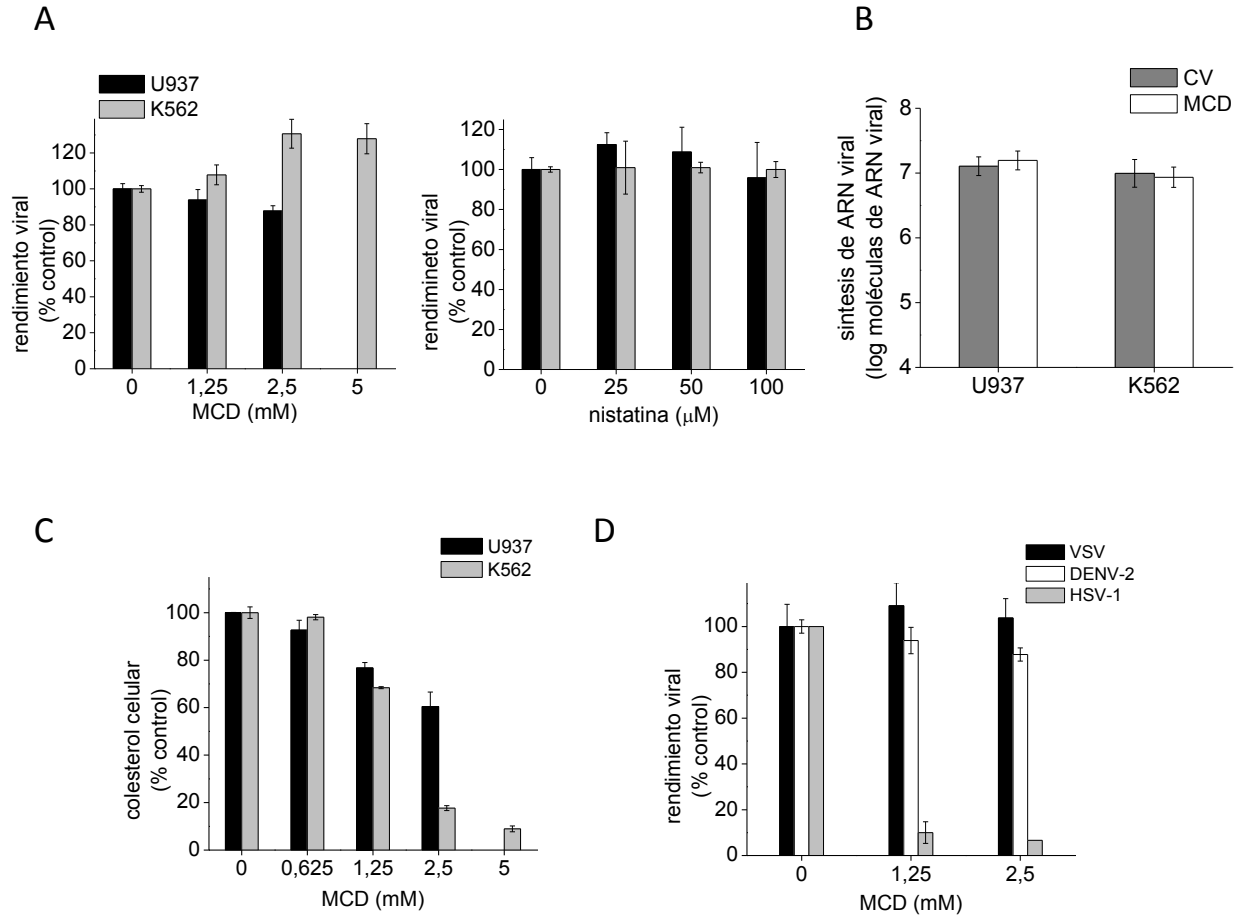


Figura R6. Efecto de inhibidores de vías dependientes de colesterol sobre la entrada de DENV-2 en células U937 y K562. A. Rendimiento viral. Las células fueron tratadas durante 1 h con MCD o 5 h con nistatina y luego de lavar 3 veces con PBS fueron infectadas con DENV-2 a una m.i. de 5 UFP/célula. Luego de 2 h a 37°C los cultivos fueron cubiertos con MM y se cuantificó el rendimiento viral a las 48 h p.i. por el método de formación de placas en células Vero. **B. Multiplicación de DENV-2 por RT-PCR.** Las células U937 y K562 fueron tratadas con MCD o no (CV: control viral) e infectadas como en A y luego de 12 horas se lavaron y cosecharon utilizando Trizol. Luego de la extracción del ARN total, se cuantificó el ARN viral mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores son el promedio de dos determinaciones independientes \pm DE. **C. Medición del colesterol celular.** Cultivos de células U937 o K562 se trataron con las concentraciones indicadas de MCD durante 1 h a 37°C. Luego de lavar con PBS, las células se resuspendieron y se midió el contenido de colesterol con el kit Amplex Red. **D. Efecto del tratamiento con MCD sobre la multiplicación de los virus HSV-1 y VSV.** Células U937 fueron tratadas durante 1 h con MCD y, luego de lavar 3 veces con PBS, fueron infectadas con DENV-2 (m.i. 5 UFP/célula), HSV-1 (m.i. 1 UFP/célula) o VSV (m.i. 1 UFP/célula). Luego de 2 h a 37°C los cultivos fueron cubiertos con MM y se cuantificó el rendimiento viral a las 48 h p.i. por el método de formación de placas en células Vero. Los resultados están expresados como porcentaje de colesterol (C) o infectividad (A, D) en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

Por otro lado, para comprobar que la extracción de colesterol realizada con MCD es suficiente para inhibir la producción de un virus cuya entrada es dependiente del contenido de colesterol celular y no afecta el comportamiento de un virus independiente de colesterol, se ensayaron como controles positivo y negativo los virus HSV-1 y VSV, respectivamente. Se utilizaron las células U937 como sistema celular para el ensayo luego de comprobar la multiplicación eficiente de ambos virus en esas células. Se realizó el tratamiento de células U937 con MCD y luego la infección con HSV-1 y VSV, en paralelo con DENV-2. Como se muestra en la figura R6D, el tratamiento celular con MCD produjo una inhibición superior al 95 % en la infección de células U937 con HSV-1, un virus dependiente del colesterol celular (Bender *et al.*, 2003), corroborando la efectividad de las condiciones experimentales utilizadas. Por el contrario, la respuesta de VSV, virus cuya multiplicación no se ve afectada por la depleción del colesterol celular (Imhoff *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008; Thorp y Gallagher, 2004), fue similar a la de DENV-2, no observándose efecto inhibitorio.

El conjunto de estos resultados demuestran que la entrada de DENV-2 en las líneas celulares U937 y K562 es independiente del contenido de colesterol celular.

I.A.2.4. Participación de la proteína dinamina

La proteína dinamina es una GTPasa esencial para la endocitosis mediada por clatrina y por caveolas. Para corroborar si esta proteína está involucrada en la internalización de DENV-2 a células U937 y K562 se ensayó el efecto de dinasore, un inhibidor de la dinamina (Macia *et al.*, 2006). La droga no mostró efecto tóxico en las líneas celulares en el rango de concentraciones 10-160 μ M (figura R7A).

Como control, se verificó el efecto de dinasore sobre la internalización dependiente de dinamina de la proteína transferrina en células U937 y K562. Los cultivos celulares fueron tratados con dinasore en las mismas condiciones que en los ensayos de infectividad y luego fueron incubados con transferrina-TRITC. El tratamiento con dinasore redujo marcadamente la incorporación en esta proteína, encontrándose distribuida de manera difusa en la superficie celular, en contraste con el típico patrón puntillado observado en el cultivo control sin tratar con el compuesto (Figura R7B).

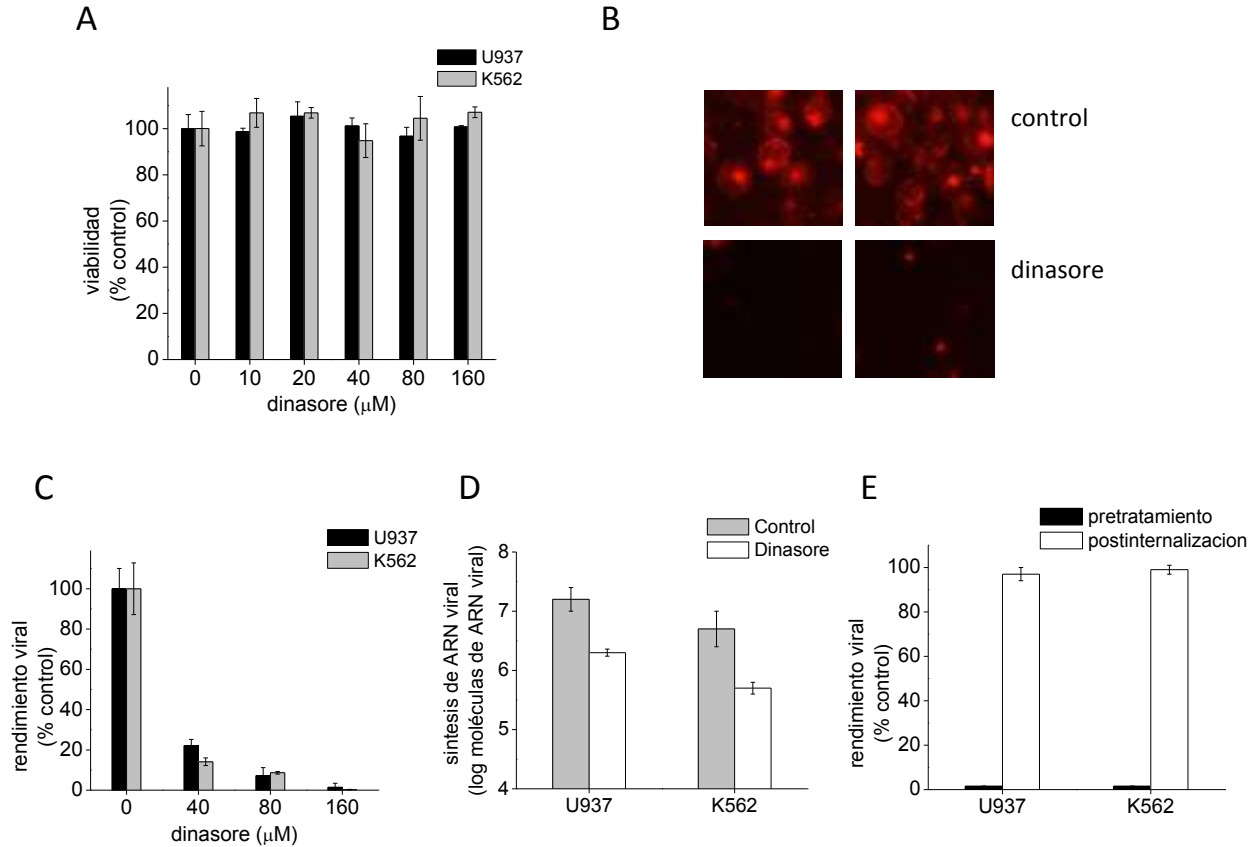


Figura R7. Efecto del dinasore sobre la infección de células U937 y K562 con DENV-2. A. Viabilidad celular. Células U937 y K562 fueron tratadas con concentraciones crecientes de dinasore durante 3 h a 37°C. Luego de lavar las células con PBS, fueron resuspendidas en azul de tripán para calcular la viabilidad celular. **B. Entrada de transferrina.** Luego del tratamiento con 160 μM de dinasore, las células fueron incubadas con 20 μg/ml de transferrina-TRITC. Luego de 1 h de incubación a 37°C las células se fijaron para su observación en un microscopio de fluorescencia. Aumento: 400X. **C. Rendimiento viral.** Células U937 o K562 fueron tratadas con las concentraciones de dinasore indicadas durante 30 min a 37°C. Luego, se infectaron las células con DENV-2 (m.i. 5 UFP/célula) durante 2 h a 37°C en presencia del compuesto. El rendimiento viral se cuantificó luego de 48 h de infección. **D. Multiplicación de DENV-2 por RT-PCR.** Las células U937 y K562 fueron tratadas con dinasore e infectadas como en A y luego de 12 horas se lavaron y cosecharon utilizando Trizol. Luego de la extracción del ARN total, se cuantificó el ARN viral mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores son el promedio de dos determinaciones independientes ± DE. **E. Tratamiento post-internalización.** Células U937 o K562 se infectaron con DENV-2 (m.i. 5 UFP/célula) durante 2 h a 37°C. Luego, las células se lavaron con PBS y se agregó MM conteniendo dinasore durante 30 min. Luego de lavar los cultivos con PBS, se cubrieron con MM y se cuantificó el rendimiento viral a las 48 h p.i. Los resultados están expresados como porcentaje de viabilidad (A) o infectividad (C, E) en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes ± DE.

Como era esperado para un virus que es internalizado a través de un mecanismo dependiente de vesículas recubiertas de clatrina, este compuesto ejerció un importante efecto

inhibitorio mayor al 99 % sobre la multiplicación de DENV-2, tanto al realizar la medición del rendimiento viral por formación de placas como al cuantificar la síntesis de ARN viral por medio de una RT-PCR en tiempo real (Figura R7C y R7D), en ambas líneas celulares. Por otra parte, se corroboró que el efecto inhibitorio de dinasore sobre la proteína dinamina se ejerce en el proceso de entrada, ya que el agregado del compuesto luego de la internalización viral no afectó la multiplicación de DENV-2 (figura R7E).

Estos resultados confirman lo observado en I.A.2.2 y permiten concluir que la internalización de DENV-2 en las células U937 y K562 ocurre por una vía dependiente de clatrina y dinamina.

I.A.3- Comparación con otro serotipo viral: la entrada de DENV-1

En los estudios reportados hasta el presente sobre la entrada de DENV a distintas líneas celulares de vertebrados e invertebrados, se ha demostrado que diferentes serotipos virales pueden utilizar diferentes rutas endocíticas para penetrar en una misma línea celular. Así por ejemplo, en las células Vero el serotipo DENV-2 utiliza una vía no clásica independiente de clatrina y caveolas y con participación de dinamina en tanto que la entrada de DENV-1 a células Vero tiene lugar a través de una endocitosis mediada por clatrina (Acosta *et al.*, 2009). Por lo tanto, se decidió estudiar en forma comparativa la ruta de entrada de DENV-1 a células U937 y K562 analizando el efecto de inhibidores específicos de cada una de las vías endocíticas, de acuerdo a los protocolos establecidos para el estudio de la entrada de DENV-2.

Los tratamientos con cloruro de amonio y clorpromazina en los tiempos tempranos de infección produjeron una marcada inhibición de la multiplicación de DENV-1, con reducciones de entre el 98-99 % en los rendimientos virales obtenidos al tratar células U937 y K562 con las máximas concentraciones no citotóxicas de ambas drogas (Fig R8A y R8B). Por el contrario, la replicación de DENV-1 no se vio afectada por MCD en el rango de concentraciones utilizadas (Fig R8C). De la misma forma que con DENV-2, se realizaron ensayos de tratamiento con cloruro de amonio y clorpromazina luego de la internalización de los viriones a las células. En estas condiciones, no se observó inhibición del rendimiento viral en ninguna de las dos líneas celulares (Fig R8D y R8E), confirmando que la inhibición de los compuestos se debe al efecto que ejercen en la entrada viral.

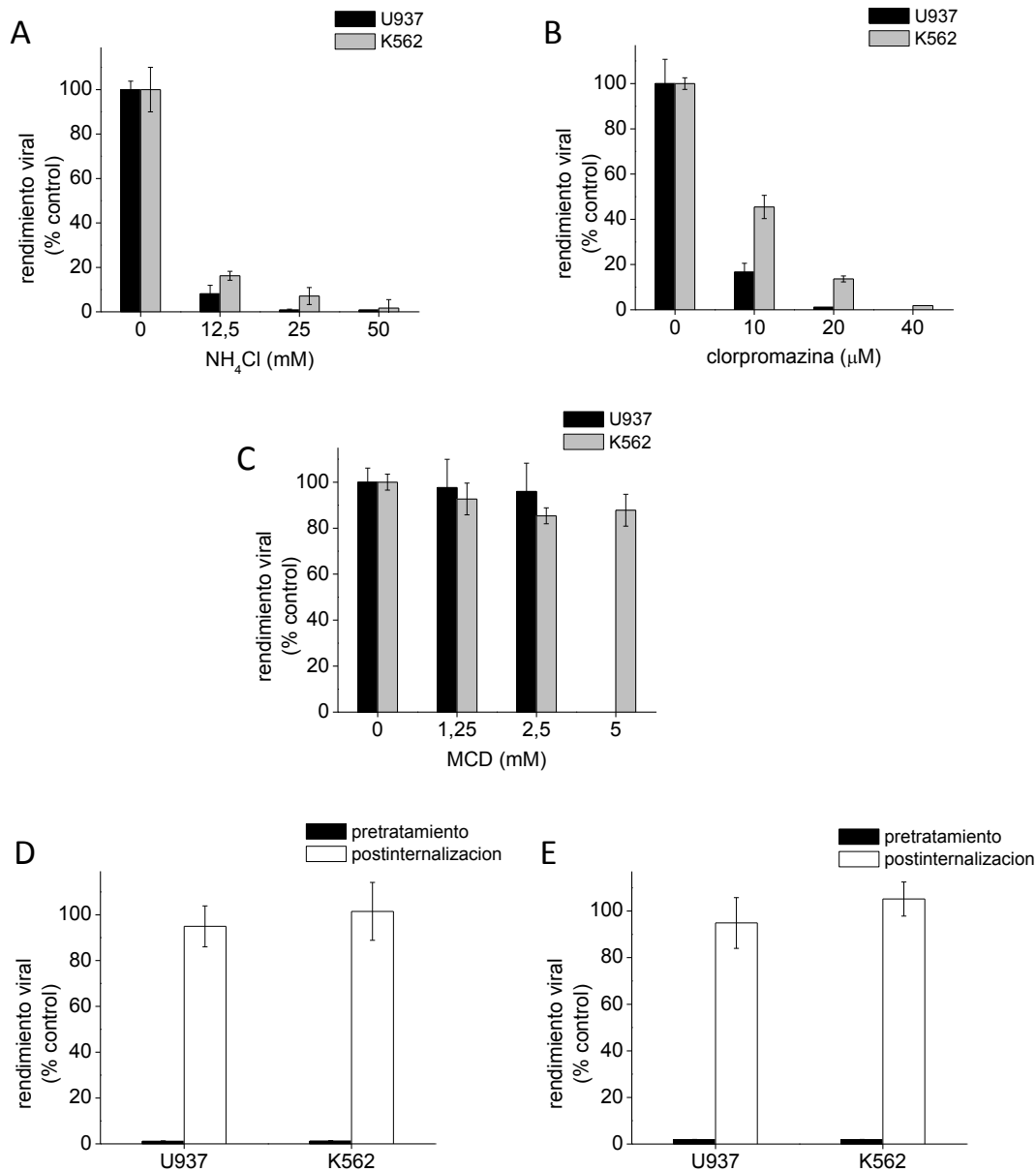


Figura R8. Efecto de los compuestos inhibidores sobre la entrada primaria de DENV-1 en células U937 y K562. Cultivos de células U937 o K562 se trataron con concentraciones no citotóxicas crecientes de cloruro de amonio (A), clorpromazina (B) o MCD (C) durante 1 h a 37° y luego se infectaron con DENV-1. Luego de 2 h de infección a 37°C en presencia de la droga (excepto en el caso de la MCD), los cultivos se lavaron con PBS y se cubrieron con MM. A las 48 h se titularon los sobrenadantes por formación de placas en células Vero. **D y E. Tratamiento post-internalización.** Cultivos de células U937 y K562 se infectaron con DENV-1 y, luego de 2 h a 37°C, las células se lavaron con PBS y se agregó MM conteniendo cloruro de amonio 50 mM durante 1 h (D) o Clorpromazina 20uM para las células U937 o 40uM para las células K562 (E). Luego, se lavaron los cultivos 3 veces con PBS, se cubrieron con MM y se cuantificó el rendimiento viral a las 48 h p.i. Los resultados están expresados como porcentaje de infectividad en los cultivos con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

Por lo tanto, el perfil de susceptibilidad de DENV-1 a los diferentes inhibidores farmacológicos de endocitosis ensayados fue similar al del serotipo DENV-2, sugiriendo que la entrada de ambos serotipos a las células U937 y K562 requiere de una endocitosis en vesículas de clatrina.

1.A.4. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-2 en células K562

La suma de los resultados obtenidos con los distintos inhibidores metabólicos de endocitosis indica que DENV-2 utilizaría una vía infectiva dependiente de clatrina para su ingreso a células U937 y K562. A fin de confirmar estas conclusiones con otra estrategia experimental y visualizar el tipo de estructuras celulares involucradas en la entrada de DENV-2 se realizaron estudios por microscopía electrónica. Cultivos de células K562 se infectaron con DENV-2 a 4 °C a una m.i. de 30 UFP/célula y, a continuación, se transfirieron a 37 °C para dar inicio a la internalización viral. Luego de 20 min de incubación, se fijaron las células con paraformaldehído y se procesaron para microscopía electrónica.

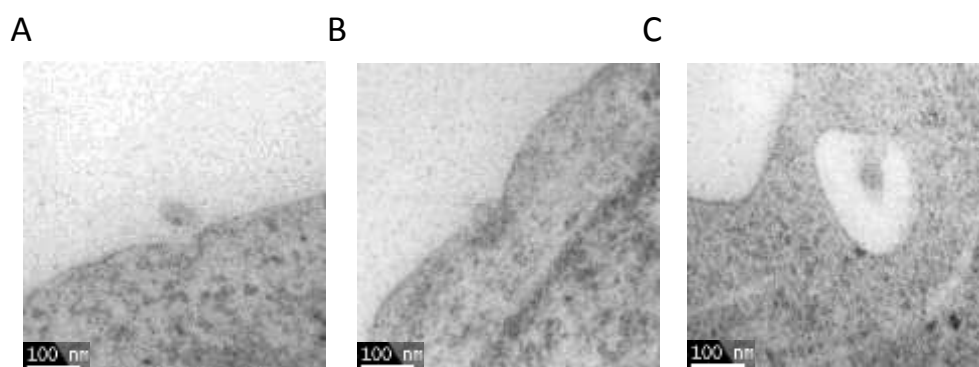


Figura R9. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-2 a células K562. Cultivos celulares fueron infectados con DENV-2 durante 1 h a 4 °C y luego fueron transferidos a 37 °C para dar inicio a la internalización viral. Luego de 20 min de incubación las células fueron fijadas y procesadas para su visualización por microscopía electrónica de transmisión. Barra: 100 nm

En concordancia con las descripciones bibliográficas, se observaron partículas virales de DENV-2 con un diámetro aproximado de 44–52 nm (Damonte *et al.*, 2004). Como muestran las figuras R9A y R9B, encontramos partículas de DENV-2 en el espacio extracelular asociadas a regiones engrosadas de la membrana plasmática y en hendiduras electrodenas que se asemejan a las invaginaciones recubiertas de clatrina descritas en la bibliografía (Marsh y Helenius, 2006). Se

visualizaron partículas virales dentro de invaginaciones recubiertas en estadios del proceso endocítico: las típicas invaginaciones en forma de “U” que corresponden a los primeros momentos del proceso de formación de la invaginación y viriones dentro de vesículas endocíticas recubiertas de aproximadamente 150 nm (figura 9C), un tamaño que se encuentra dentro del rango descrito para las vesículas recubiertas de clatrina (Bishop, 1997; Ehrlich *et al.*, 2004; Heuser, 1980).

I.B- Estudio de la entrada de DENV-2 en presencia de anticuerpos

I.B.1- Establecimiento de un sistema de infección con DENV-2 mediada por anticuerpos

Luego del análisis del mecanismo de entrada en la infección primaria de células mieloides con DENV-2 en ausencia de Ac, el siguiente paso, y según los objetivos planteados, fue ampliar la investigación al estudio de la entrada viral mediada por Ac en las mismas células en estudio. En la infección primaria sin Ac el virus entra a la célula por medio de su receptor/correceptor específico; en presencia de concentraciones subneutralizantes de Ac anti-DENV, el virus forma complejos virus-Ac que pueden entrar a la célula a través de los receptores para Ac Fc γ . Esta entrada, mediada por Ac específicos, se traduce en el humano en un incremento de la infección con DENV que generalmente está asociado a las formas más severas de la enfermedad (Guzman *et al.*, 2013; Halstead, 1970; Kliks *et al.*, 1989). Para poder estudiar la entrada viral en estas condiciones se requiere del establecimiento de un sistema modelo de infección en presencia de Ac *in vitro* y ese fue el siguiente paso.

Las células U937 utilizadas poseen receptores Fc γ RIIA y IIB y Fc γ RIA (Cameron *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2008) mientras que las células K562 sólo poseen los receptores Fc γ RIIA (Littaua 1990). Ambos receptores han mostrado mediar la infección de DENV (Kontny et al, 1988; Kou *et al.*, 2008; Littaua, 1990; Rodrigo *et al.*, 2006). El receptor Fc γ RI (CD64) es el único que posee alta afinidad (del orden del nanomolar) para unir alguna subclase de IgG (IgG2a/c en ratones; IgG1/3 en los seres humanos). El resto de los receptores, si bien tienen una afinidad baja o media (del orden del micromolar) y sólo pueden unirse a IgG en la forma de complejos inmunes, poseen un patrón más amplio de unión a isotipos de IgG (Hulett y Hogarth, 1994; Nimmerjahn y Ravetch 2008; Ravetch y Kinet, 1991). Además, basándose en la localización genómica y la similitud de secuencias de la porción extracelular se identificaron Fc γ R ortólogos entre ratón y humano (Hirano *et al.*, 2007; Nimmerjahn y Ravetch, 2006). Así, los receptores de alta afinidad Fc γ RIA (humano) y Fc γ RI (ratón)

y el FcγRIIA (humano) y FcγRIII (ratón) tienen un altísimo nivel de homología en sus dominios extracelulares.

Por lo tanto, para establecer los sistemas de estudio en estas líneas celulares se eligieron Ac monoclonales capaces de ser reconocidos por los receptores presentes en cada línea celular y, de esta forma, en condiciones adecuadas mediar la infección realizada por DENV. Los Ac elegidos fueron los Ac monoclonales de ratón 2H2 (IgG2a) y el 3H5 (IgG1), utilizados en diferentes sistemas (Littaua *et al.*, 1990; Mady *et al.*, 1993; Yamanaka *et al.*, 2008), con la intención de discriminar las vías de entrada por receptores FcγRI y FcγRII.

El primer paso consistió en determinar las condiciones que permitieran establecer un sistema de infección mediado por Ac para el estudio de la entrada de DENV-2. Este sistema se caracteriza por un significativo incremento de la producción viral que se observa cuando hay infección en presencia de concentraciones subneutralizantes de Ac, que se unen a la partícula viral y parecen facilitar su entrada a la célula. Por eso, inicialmente, se evaluó la capacidad neutralizante de los Ac 2H2 y 3H5 mediante reacciones de neutralización, virus constante- Ac variable, frente a DENV-2. En la figura R10, se observa que estos Ac no presentan actividad neutralizante de DENV-2 en el rango de concentraciones ensayadas, por lo que se pueden utilizar en esas dosis para establecer la infección mediada por Ac.

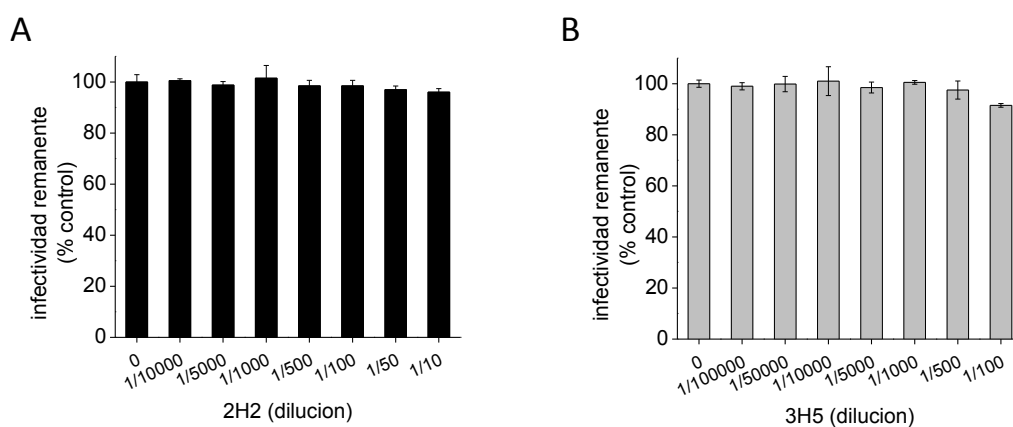


Figura R10. Reactividad neutralizante de los Ac 2H2 y 3H5 frente a DENV-2. Suspensiones de DENV-2 conteniendo 1.10^6 UFP se incubaron con distintas diluciones de Ac monoclonales 2H2 (A) o 3H5 (B) durante 1 h a 37°C. Luego de ese tiempo, se tituló la infectividad remanente por medio de formación de placas en células Vero. Los resultados están expresados como porcentaje de infectividad en las suspensiones incubadas con Ac respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

Una vez determinadas las características no neutralizantes de los Ac, se estableció la relación óptima virus-Ac que produjera un incremento considerable de la infección. Para eso, se analizó la producción viral de DENV a partir de células U937 y K562 luego de la infección con mezclas de suspensiones de DENV-2 y distintas diluciones de Ac 2H2 o 3H5. Entre las condiciones establecidas, se decidió que la cantidad de virus en las mezclas fuera lo suficientemente baja para que la producción viral en ausencia de Ac, sólo mediada por el receptor viral, fuera despreciable. Este valor se obtuvo a partir de las curvas de crecimiento de DENV-2 en células U937 y K562 realizadas previamente (figura R1) y, consecuentemente, la m.i. de 0,5 UFP/célula que se utilizó fue sensiblemente menor a la empleada para el estudio de la entrada de DENV-2 en ausencia de Ac presentada en I.A. Este comportamiento se comprobó realizando siempre, en paralelo, la infección de las células con una mezcla control de virus incubado sin Ac en las mismas condiciones que las mezclas virus-Ac.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura R11. En las células K562, las curvas de rendimiento viral en función de la dosis de Ac 3H5 a los tres tiempos p.i. analizados muestran perfiles similares y típicos de una curva de incremento de la infección mediada por Ac, con títulos máximos para las diluciones intermedias 1/500 y 1/1000 y títulos menores en los dos extremos de alta y baja concentración de Ac (figura R11B). Los rendimientos fueron menores a las 48 h p.i. y los mayores títulos virales se obtuvieron a las 72-96 h p.i., con pocas variaciones entre ambos tiempos. En relación al Ac 2H2, también mostró un aumento de la infección en un rango de concentraciones similares, tanto a las 72 como a las 96 h p.i., aunque el incremento en el título viral respecto del control sin Ac fue algo menor que con 3H5 (figura R11D). Este comportamiento observado podría estar relacionado con la diferente afinidad del Fc γ RIIA (único receptor presente en células K562) por las IgG1 (3H5) y las IgG2 (2H2) (Bruhns *et al.*, 2009).

Por su parte, en las células U937 los incrementos máximos de infectividad se produjeron a las 72 y 96 h p.i con diluciones 1/500 y 1/100 de ambos Ac, pero los aumentos de título en relación al control de DENV-2 sin Ac fueron mayores para 2H2 respecto de 3H5 (figura R11A y R11C). Esto puede explicarse debido a que el Ac 2H2 (IgG2a) sería reconocido por Fc γ RI y Fc γ RII, presentes en estas células, en tanto que 3H5 (IgG1) sólo sería reconocido por Fc γ RII (ver más adelante).

Por lo tanto, a partir de estos resultados se eligieron los sistemas modelo de trabajo para ADE, en las células K562, la infección en presencia del Ac 3H5 dilución 1/500 y, en las células U937, el Ac 2H2 dilución 1/500, con la medida del rendimiento viral en ambos casos a las 72 h p.i..

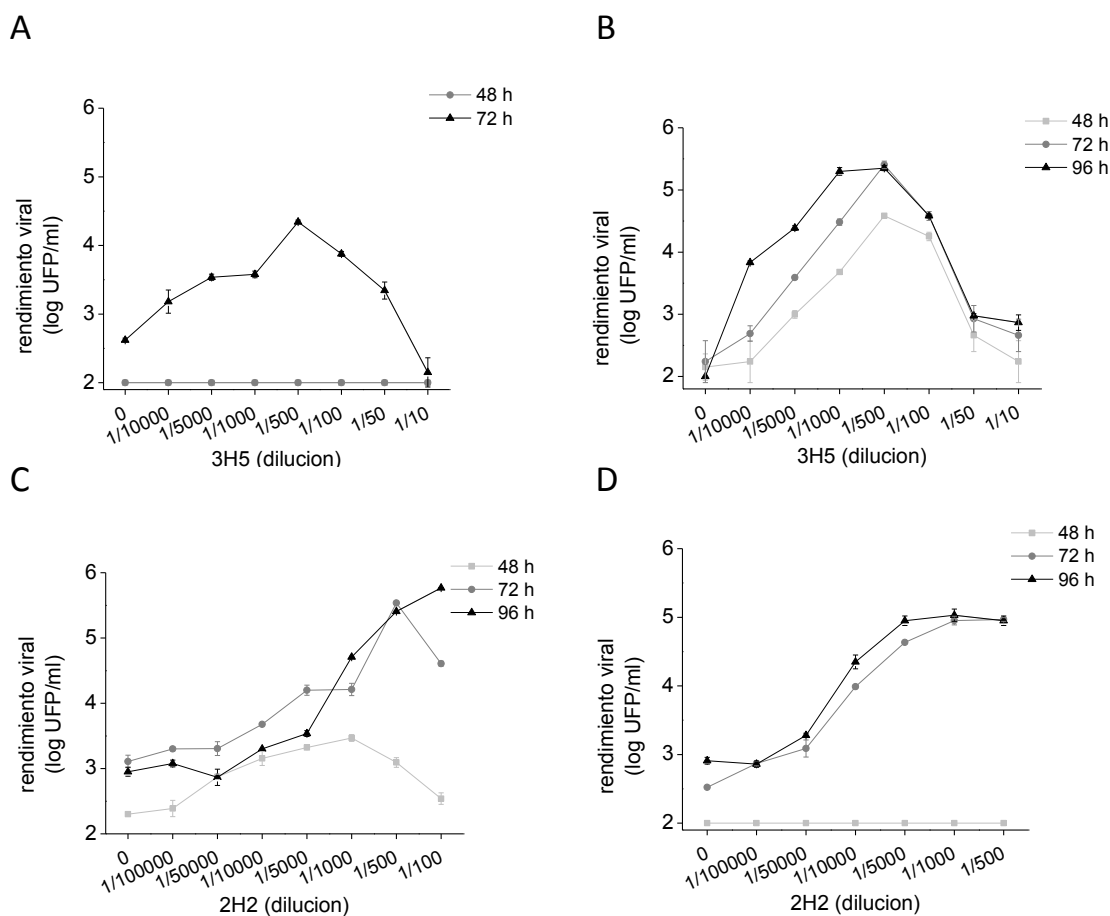


Figura R11. Sistema de infección de DENV-2 mediada por Ac. Suspensiones de DENV-2 conteniendo $1,5 \cdot 10^5$ UFP se incubaron con distintas diluciones de Ac 3H5 (A, B) o 2H2 (C, D) durante 1h a 37°C. Luego, se infectaron células U937 (A, C) o K562 (B, D) con las distintas mezclas virus-Ac durante 2h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se lavaron las células con PBS y se las incubó con MM a 37°C, determinando los rendimientos virales en los sobrenadantes a las 48, 72 y 96 h p.i. por formación de placas en células Vero. El punto 0 corresponde a la suspensión de DENV-2 incubado con MM en ausencia de Ac. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

Por último, se bloquearon los receptores de Fc presentes en las células, para confirmar que el aumento de producción viral, observado luego de la infección, se debía a un efecto mediado por los receptores de Ac. Como ya se explicó, la alta afinidad de Fc γ RI permite unir de forma monomérica las IgG tan eficientemente como se unirían los complejos inmunes, indicando además que esos complejos generados tendrían un acceso limitado a este receptor (Nimmerjahn y Ravetch, 2006). De esta forma, es posible bloquear los receptores CD32 (Fc γ R2, baja afinidad) o

CD64 (Fc γ RI, alta afinidad) mediante la utilización de IgG humanas agregadas o sin agregar, respectivamente. Por lo tanto se utilizó IgG humanas agregadas o sin agregar además de un Ac producto del hibridoma AT.10 (que une y bloquea específicamente el Fc γ RII) para realizar los bloqueos de los Fc γ R. En la figura R12, se observa que, en las células K562, al realizar una incubación previa a 4 °C con inmunoglobulina agregada o con Ac AT.10, se bloquea la infección mediada por Ac, independientemente de si el Ac utilizado para aumentar la infección es el 2H2 o el 3H5. Este resultado demuestra que tanto las IgG agregadas como los Ac AT.10 son reconocidos por el Fc γ RII presente en las células K562 y que el aumento de infección en presencia de Ac se debe a la entrada mediada por los Fc γ RII allí presentes. En el sistema de las células U937 con el Ac 3H5, también se observa el bloqueo de la infección al utilizar el Ac agregado o el AT.10, demostrando que el actor principal en este sistema es el Fc γ RII y confirmando que el Fc γ RI prácticamente no reconoce el isotipo de Ac IgG1 (3H5) como se había postulado. Por otro lado, al utilizar el Ac 2H2 se observó que el más importante bloqueo de la infección fue generado por la preincubación de las células con IgG humana sin agregar, demostrando que el principal receptor involucrado en la entrada mediada por el Ac 2H2 en U937 sería el CD64, Fc γ RI, que poseería alta afinidad por las IgG2a (Nimmerjahn y Ravetch, 2005).

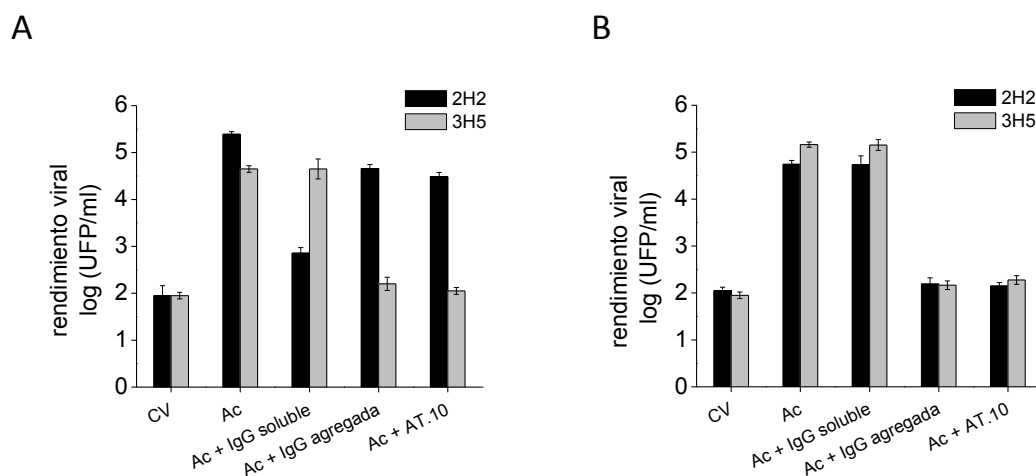


Figura R12. Bloqueo de la infección de DENV-2 mediada por Ac. Células U937 (A) o K562 (B) fueron incubadas con 30 μ g/ml de Ac AT.10 o inmunoglobulinas humanas, agregadas o solubles, durante 30 min a 4 °C. Luego de eliminar del medio las inmunoglobulinas no unidas mediante centrifugación, se incubó las células con las mezclas DENV-2- Ac a 4 °C durante 2 h. Luego de ese tiempo, se lavó con PBS frío, se cubrió con medio RPMI e incubó durante 72 hs a 37 °C. El rendimiento viral en el sobrenadante de los cultivos se cuantificó por formación de placas en células Vero. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

1.B.2- Caracterización de la vía endocítica utilizada por DENV-2 para la infección mediada por anticuerpos

Una vez establecidos los sistemas de infección mediada por Ac en células mieloides, se encaró el estudio de la entrada de DENV-2 en esas condiciones mediante el uso de inhibidores metabólicos de las diferentes vías endocíticas.

1.B.2.1- Dependencia del pH

Inicialmente, se estudió si la entrada en la infección mediada por Ac era, como sucedía en la infección primaria en ausencia de Ac, dependiente del pH ácido endosomal, analizando el efecto del cloruro de amonio sobre la entrada viral.

El tratamiento de las células U937 o K562 con cloruro de amonio se realizó con las concentraciones no citotóxicas establecidas previamente (figura R2). Luego del pre-tratamiento con la droga, las células se infectaron con las mezclas Ac-DENV-2 incubados previamente durante 1 h a 37°C. Para corroborar que la infección y producción viral observada en los cultivos se debía principalmente a la infección mediada por Ac, se realizó en paralelo el mismo tratamiento e infección en ausencia de Ac anti-DENV, comprobándose como se mencionó anteriormente que en estas condiciones de m.i. el rendimiento viral en ausencia de Ac es despreciable. La titulación de los rendimientos a las 72 h p.i. mostró una marcada inhibición de la producción viral por efecto del cloruro de amonio en ambos sistemas celulares. Tanto en la línea celular U937 como en las células K562 la inhibición del rendimiento viral superó el 99 % (figura R13A). Debido a la demostración previa de que el cloruro de amonio afecta el pH vesicular en estas líneas celulares (figura R2), los resultados permiten concluir que la entrada de DENV-2 mediada por Ac es pH-dependiente.

1.B.2.2- Dependencia de vesículas de clatrina

Se continuó el estudio de la ruta de entrada de DENV-2 en células humanas en presencia de Ac analizando el requerimiento de vesículas de clatrina para la internalización viral en esas condiciones. Para ello, se emplearon los inhibidores clorpromazina y dansilcadaverina, empleando las condiciones de tratamiento y concentraciones no citotóxicas previamente establecidas (figura R3).

A diferencia de lo observado en la infección primaria con DENV-2 (figura R4), en la infección Ac-dependiente las células U937 y K562 no respondieron de igual manera frente al bloqueo de la endocitosis mediada por clatrina. Como se observa en la figura R13B, ambos compuestos afectaron la multiplicación de DENV-2 en presencia de Ac cuando las células K562 fueron pretratadas antes y durante las primeras horas de infección, con inhibiciones del rendimiento viral de 98 % y mayores al 99 % en las máximas concentraciones ensayadas de clorpromazina y dansilcadaverina, respectivamente. Por el contrario, el bloqueo de la vía endocítica dependiente de clatrina no produjo efecto inhibitorio en la infección de las células U937 con DENV-2 en presencia de Ac (figura R13B).

Como control del efecto de clorpromazina sobre la entrada de DENV-2 mediada por Ac en células K562, se realizó el bloqueo del receptor FcγRII con el Ac AT.10. El tratamiento con clorpromazina previo a la infección de células K562 con el complejo DENV-2-3H5 produjo una inhibición del rendimiento del 94 %, en tanto que sólo el bloqueo con el Ac AT.10 inhibió completamente la entrada viral al igual que el pre-tratamiento con clorpromazina y posterior bloqueo con AT.10, corroborando que el bloqueo del receptor FcγRII impide la infección y, por lo tanto, el efecto de clorpromazina que se mide en la infección con el complejo virus-Ac, en la figura R13B, se ejerce efectivamente sobre el virus que ingresa en la célula a través de dicho receptor por su unión al Ac anti-DENV.

Por último, para comprender mejor los resultados obtenidos con la clorpromazina en los sistemas U937- 2H2 y K562- 3H5 hasta acá mostrados, y conociendo la participación que cada receptor tiene en los sistemas establecidos, se evaluó el efecto que el compuesto tiene sobre los sistemas cruzados U937- 3H5 y K562- 2H2. El resultado, que puede observarse en la figura R13C, muestra que la clorpromazina inhibió más del 99 % de la producción viral de DENV-2 en ambos sistemas ensayados. Estos resultados permiten concluir que la entrada de DENV-2 mediada por Ac en células K562, que sólo expresan FcγRII, está mediada por vesículas recubiertas de clatrina. En las células U937, la entrada de DENV-2 aumentada por el Ac 3H5, sólo reconocido por FcγRII, se comporta de igual manera que en las células K562, mientras que la infección dependiente de 2H2, que, como se demostró en la Fig R12A estaría mediada principalmente por FcγRI, no utilizaría una entrada a las células por medio de vesículas recubiertas con clatrina.

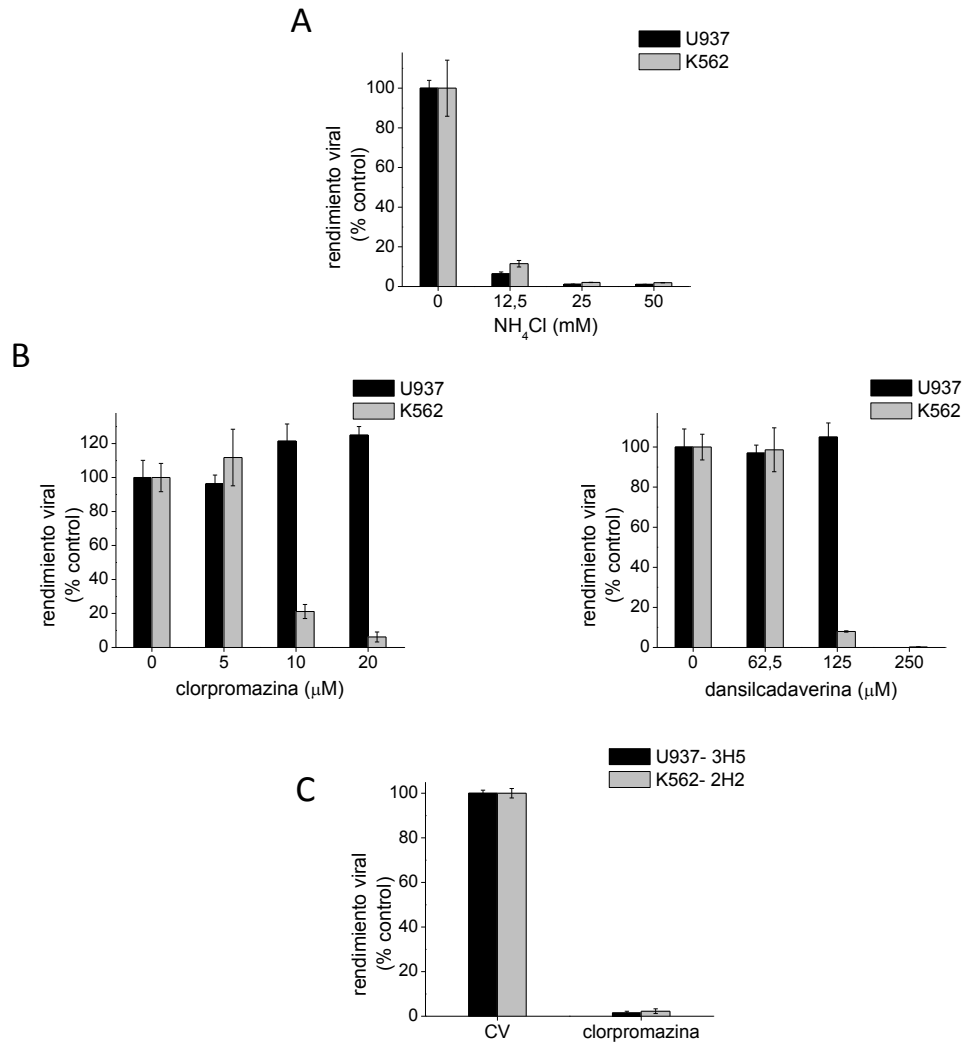


Figura R13. Efecto de los compuestos inhibidores sobre la entrada de DENV-2 en la infección mediada por Ac. A y B. Cloruro de amonio, clorpromazina y dansilcadaverina. Cultivos de células U937 (barras negras) o K562 (barras grises) se trataron con concentraciones no citotóxicas crecientes de las drogas señaladas durante 0,5 (dansilcadaverina) o 1 h (NH₄Cl, clorpromazina) a 37°C y luego se infectaron las células U937 con mezclas DENV-2-2H2 y las K562 con mezclas DENV-2-3H5, previamente incubadas durante 1h a 37°C. Luego de 2 h de infección a 37°C en presencia de la droga, los cultivos se lavaron con PBS y se cubrieron con MM. A las 72 h p.i. se titularon los sobrenadantes por formación de placas en células Vero. **C. Efecto de clorpromazina en sistemas U937 y K562 cruzados.** Células U937 o K562 fueron tratadas como en A pero infectadas según las mezclas indicadas. En todos los casos, el rendimiento viral en ausencia de droga estuvo dentro del rango entre 10⁵ y 10⁶ UFP/ml. Cada concentración de droga fue ensayada en paralelo en ausencia de Ac como control de la ausencia de multiplicación viral (mediada por receptor en la entrada primaria) obteniendo como máximo un rendimiento viral de 10² UFP/ml. Los resultados están expresados como porcentaje de infectividad en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes ± DE.

I.B.2.3- Requerimiento de colesterol

A continuación, se analizó el requerimiento de colesterol celular para la entrada de DENV-2 en la infección mediada por Ac, empleando los compuestos MCD y nistatina en las condiciones previamente establecidas (figura R5).

El pretratamiento de células U937 con MCD o nistatina no afectó la infección con DENV-2 en presencia del Ac 2H2 (figura R14). En cuanto a las células K562, se observó una inhibición parcial de la infección de DENV-2 en presencia de Ac, con una reducción aproximada al 60 % y 40% en el rendimiento viral a la máxima concentración no citotóxica empleada de MCD y nistatina, respectivamente (figura R14).

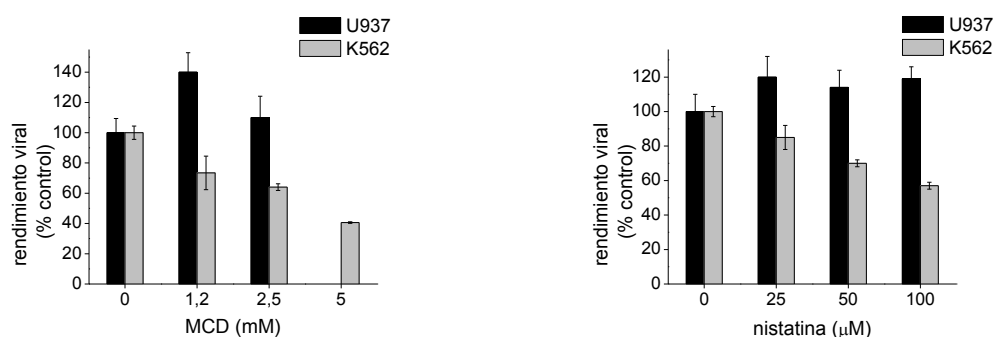


Figura R14. Efecto de MCD y nistatina sobre la entrada de DENV-2 en la infección mediada por Ac. Cultivos de células U937 (barras negras) o K562 (barras grises) se trataron con concentraciones no citotóxicas crecientes de las drogas señaladas durante 1 (MCD) o 5 h (nistatina) a 37°C y luego se infectaron con mezclas DENV-2-2H2 o DENV-2-3H5, previamente incubadas durante 1h a 37°C. Luego de 2 h de infección a 37°C en ausencia de la droga, los cultivos se lavaron con PBS y se cubrieron con MM. A las 72 h p.i. se titularon los sobrenadantes por formación de placas en células Vero. En todos los casos, el rendimiento viral en ausencia de droga estuvo dentro del rango entre 10^5 y 10^6 UFP/ml. Cada concentración de droga fue ensayada en paralelo en ausencia de Ac como control de la ausencia de multiplicación viral obteniendo como máximo un rendimiento viral de 10^2 UFP/ml. Los resultados están expresados como porcentaje de infectividad en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

El conjunto de estos resultados permite concluir que la entrada de DENV-2 mediada por Ac 3H5 en las células K562 parece estar mediada por vesículas recubiertas de clatrina y requerir parcialmente del contenido de colesterol celular mientras que, para la entrada de DENV-2 en células U937 mediada por Ac 2H2 no habría dependencia de clatrina ni colesterol, en tanto que la mediada por Ac 3H5 requiere vesículas de clatrina.

Discusión: Entrada viral primaria en ausencia de Ac

Los estudios del mecanismo de entrada de DENV realizados en este trabajo exponen, una vez más, la complejidad del proceso de entrada de este patógeno a la célula.

Mediante el análisis del efecto de inhibidores metabólicos de las diferentes vías endocíticas sobre marcadores celulares específicos de dichas vías y sobre la infección con DENV a través de medidas de infectividad, RNA viral y microscopía de fluorescencia, hemos podido concluir que la infección primaria de células humanas mieloides en ausencia de Ac utiliza un mecanismo de entrada clásico dependiente de pH ácido, clatrina y dinamina e independiente de la integridad de los *lipid-rafts* de la membrana celular, para ambos serotipos DENV-1 y DENV-2.

Como ya se explicó, en concordancia con nuestros resultados, existen numerosos estudios de los primeros pasos de multiplicación viral de DENV que describen su entrada mediante endocitosis dependiente de clatrina en distintas líneas celulares tales como células de mosquito (Acosta *et al.*, 2011); células BSC-1 (van der Schaar *et al.*, 2008), células hepáticas humanas Huh7 y HepG2 (Ang *et al.*, 2010), células HeLa (Krishnan *et al.*, 2007) y células humanas endoteliales ECV304 (Peng *et al.*, 2009).

El estudio de dependencia del colesterol/*lipid-rafts* para la entrada de DENV es el aspecto que ha presentado mayores controversias en los estudios realizados hasta el presente en distintos tipos de células. Ya se explicó que la entrada de DENV-2 se mostró independiente de la extracción de colesterol celular por tratamientos con MCD, nistatina o filipina en células de mosquito (Acosta *et al.*, 2008a; 2011; Mosso *et al.*, 2008), en las células de mono Vero (Acosta *et al.*, 2009) y células humanas endoteliales ECV304 (Peng *et al.*, 2009). Sin embargo, otros estudios reportaron requerimiento de colesterol celular para la infección productiva de DENV-2 en monocitos (Reyes del Valle *et al.*, 2005) o células de neuroblastoma de ratón (Lee *et al.*, 2008) mediante el uso de MCD o nistatina.

En los estudios presentados en esta tesis se demostró que tanto MCD como nistatina presentan una importante actividad virucida contra los 4 serotipos de DENV (ver Capítulo III). Por lo tanto, fue necesario diseñar protocolos de estudio que no inactivaran a los viriones, así como no utilizar concentraciones de ambas drogas que pudiesen afectar otras vías endocíticas de manera inespecífica, incluyendo la vía de clatrina. Por ejemplo, Rodal *et al.* (1999) han reportado que el

tratamiento de diversas líneas celulares con MCD 10 mM reduce en más de un 50 % la internalización de transferrina. Por otro lado, para dar mayor validez al tratamiento diseñado, se realizó la medición del colesterol celular para confirmar que la droga efectivamente elimina el colesterol presente en las membranas celulares, obteniéndose valores de reducción de colesterol similares a los reportados en la bibliografía (Cui *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2011; Vieth *et al.*, 2010). Con el mismo fin de confirmar la efectividad del tratamiento con MCD, se incluyeron en el estudio modelos de virus como control de la entrada infectiva dependiente o independiente del colesterol celular como HSV-1 y VSV, respectivamente. Estas condiciones experimentales bien ajustadas nos permitieron concluir que la entrada infectiva de DENV en células K562 y U937 ocurre independientemente de la integridad de los *lipid-rafts* presentes en la membrana celular.

Actualmente, por lo tanto, no está claro si las diferencias observadas en todos estos trabajos respecto de la influencia del colesterol celular en la entrada de DENV pueden deberse a la línea celular en estudio o a las condiciones del tratamiento usadas con el fin de alterar el contenido de colesterol celular. Por ejemplo, Reyes del Valle *et al.* (2005) informaron una inhibición de la infección de monocitos humanos de sangre periférica con la cepa 16681 de DENV-2 en un rango de concentraciones de hasta 15 mM de MCD, mientras que en células K562 y U937 se observó citotoxicidad a concentraciones mayores a 2,5- 5 mM de MCD (figuras R5 y R6). Asimismo, muchos de los trabajos que concluyen una dependencia de colesterol celular para la infección viral pueden, en realidad, explicarse por el efecto virucida de MCD o agentes similares contra DENV, como se verá en detalle en el Capítulo III. Por ejemplo, Lee *et al.* (2008) concluyen que la extracción de colesterol con MCD reduce la infección de DENV-2 en células de neuroblastoma de ratón N18 después del tratamiento continuo de las células con MCD durante la infección, una condición experimental que no excluye la acción virucida de la MCD sobre los viriones de DENV-2. Debido a ese efecto inactivante de la MCD y la nistatina, en este trabajo sólo realizamos tratamientos celulares con las drogas previos a la adsorción viral y no incluimos tratamientos durante la inoculación viral o en todo el período de infección. Por esto, en las condiciones aquí usadas podemos concluir que la presencia de colesterol en membranas celulares no es esencial para los eventos iniciales de entrada viral, pero no puede descartarse un efecto del colesterol celular en pasos posteriores del ciclo de multiplicación viral. Estos efectos, de hecho, han sido descritos en numerosos trabajos que encuentran una relación entre los niveles de colesterol celular y subsecuentes pasos del ciclo de multiplicación viral (Martínez- Gutierrez *et al.*, 2011; Poh *et al.*, 2012; Rothwell *et al.*, 2009; Soto-Acosta *et al.*, 2013).

Por último, la utilización del dinasore confirmó que la proteína dinamina está efectivamente involucrada en la vía que utiliza el virus para su internalización, como es de esperar en una vía dependiente de clatrina. Esto, además, descarta la existencia de vías alternativas que pudiesen estar involucradas en la entrada de los viriones y contrarrestarían la inhibición del compuesto.

Para corroborar mediante otra metodología los resultados obtenidos con inhibidores farmacológicos se realizaron también ensayos de microscopia electrónica de transmisión. En estas observaciones se detectó la presencia de DENV-2 dentro de invaginaciones aparentemente recubiertas por clatrina o cerca de zonas de la membrana engrosadas por dicha proteína. Algunas vesículas conteniendo partículas virales mostraron diferencias respecto de las típicas esferas generalmente descritas en la bibliografía. La estructura que forma *in vitro* la molécula de clatrina purificada posee una morfología esférica de alrededor de 78 nm de diámetro que puede variar en forma y tamaño al agregar proteínas adaptadoras hasta alcanzar los 125 nm de diámetro (Zaremba y Keen, 1983). Al realizar observaciones *in vivo*, en cambio, se han encontrado estructuras de mayor tamaño con diámetro de hasta 200 nm. Por otro lado, para que la endocitosis mediada por clatrina sea infectiva en el ciclo de replicación de algunos virus como VSV, con un diámetro de 75 nm y un largo máximo de 180 nm, se ha descrito que las vesículas recubiertas con clatrina pueden sufrir una deformación de su morfología típica y regulan su tamaño mediante la presencia de moléculas extras como la Eps15, AP180 y CALM, entre otras (Brodsky *et al.*, 2001; Nossal, 2001). Podría suceder que DENV utilice alguna estrategia similar para internalizarse o bien, los tiempos utilizados en este trabajo para visualizar la entrada coincidieran con el momento de la fusión de la membrana celular y la envoltura viral y a eso se deba la deformación de las vesículas observada en algunos casos.

Nuestros resultados están también respaldados por la información que se conoce de la infección de DENV en estas células en la escasa bibliografía que existe al respecto. El trabajo de Chen *et al.* (1999) postula a la proteína CD14 como posible correceptor de DENV al demostrar que la presencia del lipopolisacárido bacteriano (LPS), ligando natural del receptor CD14, inhibe la entrada de este virus a células monocíticas. En este trabajo se observa también que el bloqueo de CD14, utilizando un Ac contra esta proteína, impide la interacción del LPS con su receptor permitiendo, de todas formas, la entrada de DENV a la célula. Además, como parte del mismo complejo receptor, se describió que el CD14 promueve la internalización del *toll like receptor 4*

(TLR-4) (Kwan *et al.*, 2005; Zanoni, 2011) por un mecanismo dependiente de clatrina y dinamina (Husebye, 2006). La entrada de LPS en presencia de CD14 es también dependiente de clatrina, como se observó al utilizar clorpromazina, dansilcadaverina, depleción de potasio y microscopía electrónica (Latz *et al.*, 2002; Vasselon *et al.*, 1999). Los resultados del estudio de DENV, realizado en este trabajo, que muestran una entrada viral mediada por vesículas recubiertas de clatrina son coherentes con estos hallazgos que ubican al supuesto receptor del virus inserto en un complejo proteico junto con el CD14, ya que se ha demostrado que este complejo puede internalizarse por una vía mediada por las mismas vesículas de clatrina.

También en concordancia con nuestro trabajo, Alhoot *et al.* (2011) describen la entrada de DENV a monocitos de sangre periférica mediante la utilización de ARN de interferencia (ARNi) contra distintas proteínas celulares, demostrando que la entrada del virus se ve bloqueada al silenciar la expresión de clatrina y CD14. Por último, se sabe que las proteínas HSP70 y HSP90 están insertas en la membrana celular como parte del complejo de CD14, impidiendo su interacción con el LPS y aumentando la posibilidad de que sea DENV quien lo utilice como receptor (Chavez- Salinas *et al.*, 2008). Por todo lo explicado, la suma de la información bibliográfica y los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que la entrada primaria de DENV-2 a células del linaje mieloide está mediada por vesículas recubiertas por clatrina y que esto sería a través del ya caracterizado complejo TLR4/CD14 a los que se suman factores como las HSP70 y HSP90.

Discusión: Entrada viral mediada por Ac

Para el estudio de la entrada de DENV mediada por Ac, el primer desafío consistió en encontrar las condiciones óptimas para el mayor aumento de multiplicación viral y comprender la implicancia de los FcγR involucrados en cada sistema. Se trabajó con DENV-2 en las células K562, que sólo expresan en superficie el receptor FcγRIIA, y en las células U937, un sistema más complicado ya que esta línea celular, además del receptor FcγRIIA expresa también la isoforma FcγRIIB y el receptor FcγRIA (Cameron *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2008). En las células U937, al utilizar el Ac 3H5, quedó claro que el receptor que media la infección productiva con DENV-2 es el FcγRII ya que tanto la preincubación de IgG humanas agregadas como el Ac específico AT.10 bloquearon casi completamente el aumento de infección mediado por este Ac. En cambio, con el Ac 2H2 como

aumentador de la infección de DENV-2 en las células U937, sólo se observó un bloqueo de la infección al preincubar las células con las IgG sin agregar, demostrando que el principal receptor involucrado en la entrada mediada por el Ac 2H2 en U937 sería el FcγRI, que poseería alta afinidad por las IgG2a (2H2). Sin embargo, contrariamente a lo supuesto, los FcγRII presentes en esta línea celular no contrarrestaron el efecto aumentando su actividad, permitiendo observar la inhibición que provoca el bloqueo. Por lo tanto, existe una implicancia diferencial de los FcγR en la línea celular U937 dependiente del Ac utilizado para mediar la infección. Para interpretar este resultado, cabe destacar algunos aspectos, descriptos en la bibliografía, de estos receptores. La diferencia fundamental radica en que, mientras FcγRIIA posee un dominio citoplasmático con un motivo de activación con tirosina (ITAM) que recluta quinasas que activan cascadas de fosforilación, el receptor FcγRIIB posee un dominio citoplasmático inhibitorio ITIM, que recluta fosfatasas como contraparte al FcγRIIA activador (Chan *et al.*, 2011; Nimmerjahn y Ravetch, 2008). Si bien se ha descrito que ambos receptores tienen 92 % de homología en sus dominios extracelulares y que la internalización del subtipo IIA es 2 órdenes más eficiente (Moi *et al.*, 2011), el FcγRIIB ha mostrado tener un efecto inhibitorio dominante al coexpresarlo por transfección en células K562 (que sólo expresan FcγRIIA) ya que su expresión provoca una reducción del 75 % en el número de células infectadas con DENV en condiciones de ADE (Boonnak *et al.*, 2013). Si bien estas observaciones podrían explicar las diferencias que se observan en los niveles de infectividad entre las células K562 y las U937 al bloquear FcγRI, todavía queda mucho por comprender sobre el rol que los distintos receptores juegan en el ADE.

Los resultados obtenidos con inhibidores farmacológicos de endocitosis demostraron que la entrada de DENV-2 siempre mediada por FcγRIIA en células K562 es dependiente de pH ácido, clatrina y dinamina. En cambio, se observó una participación diferencial de la vía de clatrina para la internalización de DENV-2 en células U937: nuestros resultados muestran, por primera vez, que el mismo serotipo de DENV-2 utiliza un mecanismo de endocitosis clásico, dependiente de clatrina, con uno de los Ac 3H5 como mediador de entrada, mientras que la entrada mediada por otro Ac, 2H2, transcurre por una vía alternativa independiente de clatrina.

A pesar de la sorpresa que significó la descripción de una entrada viral por un FcγR que no dependiera de un proceso de fagocitosis, se encontró que estos resultados concuerdan con otros trabajos que han demostrado que los receptores FcγRIIA pueden iniciar tanto la fagocitosis de grandes partículas revestidas con Ac como la endocitosis de pequeños complejos inmunes e

incluso que, dominios específicos del receptor, están diferencialmente involucrados en uno u otro proceso (Huang *et al.*, 2006; Rodrigo *et al.*, 2006; Tse *et al.*, 2003). Incluso, se han revelado diferencias fundamentales en el mecanismo que subyace la internalización, por fagocitosis o endocitosis de este receptor, dependiendo del tamaño o la multiplicidad del complejo ligando (Booth *et al.*, 2002).

En relación al rol que posee el colesterol en la entrada mediada por Ac, se observa que existe una dependencia parcial de colesterol en la entrada de DENV-2 a través de FcγRIIA. Existen numerosos trabajos que reportan una dependencia de colesterol para la translocación de los FcγRII a los *lipid-rafts*, un proceso requerido para la funcionalidad de los receptores (García-García *et al.*, 2007; Vieth *et al.*, 2010). También se ha reportado, en células U937 diferenciadas a macrófagos, que la principal vía de entrada de DENV-4 mediada por Ac es a través de FcγRIIA y que ésta depende del contenido de colesterol de la membrana celular (Puerta-Guardo *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha descrito que la interrupción de *lipid-rafts* por el secuestro de colesterol de la membrana inhibe marcadamente la unión de las inmunoglobulinas a los FcγRII y, con eso, se inhibe completamente la fagocitosis de las partículas. Sin embargo, la misma extracción de colesterol sólo inhibe un 50 % la endocitosis que puede mediar este receptor (Bournazos *et al.*, 2009). La interrupción de los *lipid-rafts* que se realiza después de la unión de los Ac inhibe de forma drástica sólo la internalización de grandes partículas con complejos de Ac como glóbulos rojos o partículas de látex, pero no bloquea la de los pequeños complejos (Vieth *et al.*, 2010). De la misma forma, en este trabajo de tesis se observa que la utilización de MCD inhibe sólo entre 40 y 60 % la infección de DENV mediada por el FcγRIIA y que este receptor está mediando una endocitosis dependiente de clatrina. Esto sugiere que se requiere cierta organización de los receptores para una unión eficiente de los complejos virus- Ac. A pesar de que la translocación a *lipid-rafts* y el efecto que eso tiene sobre la unión está bien documentado, el significado funcional que derivaría en fagocitosis o endocitosis sigue siendo poco comprendido (Bournazos *et al.*, 2009).

Además de DENV, otros virus han mostrado una infección aumentada en presencia de Ac, entre ellos, el virus Marburg (Nakayama *et al.*, 2001), Ebola (Takada *et al.*, 2007), Influenza (Tamura *et al.*, 1991), SARS (Yip *et al.*, 2014) y HIV (Matsuda *et al.*, 1989). En este último caso, que es de los más estudiados, se ha observado que la entrada viral mediada por Ac no requiere sólo la presencia de FcR para la infección sino que el virus de HIV es también dependiente del mismo

receptor que utiliza en ausencia de Ac, el CD4, para el ADE (Takeda *et al.*, 1990). Lo mismo se habría visto para DENV ya que la sola interacción del complejo virus- Ac con el Fc γ RIIA no sería suficiente para la internalización y desnudamiento de los viriones sino que se requeriría de otro receptor que reconozca algunos motivos presentes en la glicoproteína E para realizar la entrada y fusión de la partícula viral (Chotiwan *et al.*, 2014). Es por esto que no se puede descartar que la entrada viral en presencia de Ac esté parcialmente mediada por el mismo receptor asociado al complejo CD14 que permite la entrada viral en ausencia de Ac. La interacción de los Ac con el FcR podría tener sólo un rol auxiliar al generar una mayor concentración de viriones en la superficie celular y podría, además, mediar una cascada de señalización que produjera un aumento de la multiplicación viral debida a respuestas inmunes innatas (Ubol *et al.*, 2010). Lo mismo concluyen Mady *et al.* (1991) al trabajar con Ac híbridos contra dengue que, en vez de interactuar con Fc γ R, lo hacen con otras moléculas ubicuas presentes en la membrana celular como, por ejemplo, la β 2-microglobulina o CD15. Con estos resultados observan que los Ac median un aumento de la interacción de los viriones con los receptores específicos de la entrada primaria presentes en la membrana celular. Por lo tanto, hay que destacar que, en este caso, la presencia de Ac no implicaría necesariamente una internalización por una vía distinta a la primaria en ausencia de Ac.

En relación a la línea celular U937, la entrada diferencial podría explicarse por la implicancia de los receptores Fc γ RIIA o Fc γ RIA en la infección de DENV. Está descrito que mutar la cadena γ de estos receptores, impidiendo la correcta cascada de señalización que normalmente desencadenan, disminuye la tasa de internalización de DENV a las células que los expresan pero, en el caso de la isoforma Fc γ RIIA, no se encuentra afectado el nivel de infección (Rodrigo *et al.*, 2006). Al transfectar con el Fc γ RIA deficiente, en cambio, disminuye tanto la fagocitosis como la infectividad de DENV-2 (cepas 16681 y NGC), por lo que se concluye que este receptor sólo mediaría una internalización viral por fagocitosis o que, al menos, existen diferencias fundamentales en la internalización entre los dos receptores, además de las ya conocidas y descritas diferencias en la trasducción de señales (Dai *et al.*, 2009). Si bien todo apunta a eso, todavía quedan muchos estudios por realizar para confirmar si, en este caso, la entrada de DENV-2 a células U937 principalmente mediada por el Fc γ RIA ocurriría únicamente por medio de un proceso de fagocitosis.

El uso de rutas alternativas de entrada en la misma o diferentes células representa una ventaja para el virus que incrementa las posibilidades de una penetración productiva y permite

expandir el rango de células a ser infectadas. Justamente, el amplio tropismo celular que se observa en DENV puede estar relacionado con la posibilidad de explotar rutas opcionales de internalización celular. Es interesante señalar, en este punto, que distintos receptores virales han sido identificados para un mismo serotipo de DENV en líneas celulares de diferente origen y que, en contrapartida, distintos serotipos virales utilizarían receptores alternativos en un mismo sistema celular (Acosta *et al.*, 2008b; Soto- Acosta *et al.*, 2013) como también queda demostrado en el presente trabajo.

CAPITULO II. Actividad antiviral de compuestos dirigidos a la entrada de DENV en la infección de células humanas en ausencia y presencia de anticuerpos.

Tal como sucede con el estudio del mecanismo de entrada de DENV en células humanas mieloides, son pocos los trabajos que han reportado la evaluación en este tipo de células de agentes antivirales que inhiban la entrada viral. Se ha demostrado, en diversas líneas celulares derivadas de mamíferos tales como Vero, BHK-21, HepG2 y LLC-MK2, la efectividad de diversas clases de polisacáridos sulfatados como potentes y selectivos inhibidores de la multiplicación de DENV-2. La acción antiviral de estos agentes contra DENV-2 se debe a un bloqueo de la adsorción y penetración viral (Ichiyama *et al.*, 2013; Talarico y Damonte, 2007) que es explicado por las similitudes estructurales de estos compuestos con los residuos de heparán sulfato de proteoglicanos de la membrana celular. A su vez, el heparán sulfato ha sido propuesto como receptor inicial para el virus en esas mismas líneas celulares (Chen *et al.*, 1997; Dalrymple y Mckow, 2011; Germi *et al.*, 2002; Hilgard *et al.*, 2000). Para células U937 y K562 sólo se ha reportado, hasta el presente, como posibles receptores las proteínas HSP70 y HSP90 (Reyes del Valle *et al.*, 2005) y una proteína no identificada de 100 kDa (Rothwell *et al.*, 1996). Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que el heparán sulfato actúe como un receptor inicial para concentrar el virus en la superficie celular. Por ello, decidimos completar el estudio de la entrada de DENV-2 en las células mieloides analizando la actividad antiviral de polisacáridos sulfatados.

II.A- Actividad antiviral de carragenano- λ en la infección de células U937 y K562 con DENV-2

En los estudios previos efectuados en células Vero y HepG2, el carragenano- λ fue el polisacárido sulfatado de mayor potencia inhibitoria contra DENV-2 con índices de selectividad (relación entre la concentración citotóxica 50 %, CC_{50} , y la concentración efectiva antiviral 50 %, CE_{50}) en el orden 2500-6666 (Talarico y Damonte, 2007). Por lo tanto, se eligió este compuesto para evaluar su actividad antiviral en células mieloides humanas.

Primero, se evaluó la citotoxicidad por medio de la tinción con azul de tripán. Como se observa en la figura R15, no se observaron efectos sobre la viabilidad celular en el rango de concentraciones ensayadas en ambas líneas celulares durante 48 h de incubación. A continuación, se determinó la actividad antiviral sobre DENV-2 mediante un ensayo de reducción en el

rendimiento viral en presencia del compuesto. El carragenano- λ produjo inhibición de la multiplicación de DENV-2 en forma dependiente de la dosis con una eficiencia similar en células U937 y K562. A partir de los datos que se muestran en la figura R15, se calcularon los valores de CE_{50} que resultaron $3,26 \pm 0,08$ y $< 1,25$ $\mu\text{g/ml}$ para células U937 y K562, respectivamente.

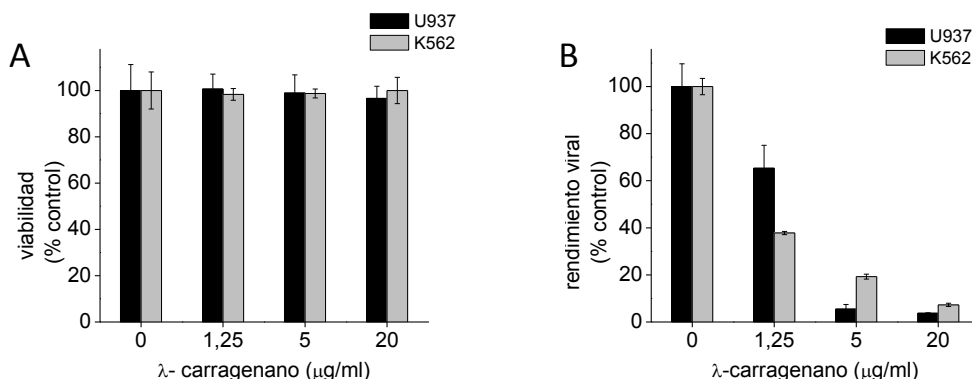


Figura R15. Actividad de carragenano- λ en la infección primaria de DENV-2 en células U937 y K562. A. Citotoxicidad. Cultivos de células U937 o K562 se incubaron con concentraciones crecientes de carragenano- λ durante 48 h a 37°C. Luego se hizo el recuento de células viables por tinción con azul de tripán. **B. Actividad antiviral.** Se infectaron cultivos de células U937 o K562 con DENV-2 (m.i. 5) durante 2 h a 37°C en presencia de carragenano- λ . Luego, se lavaron los cultivos con PBS, se agregó MM conteniendo compuesto y se cuantificó el rendimiento viral a las 48h p.i. por UFP en células Vero. Los resultados están expresados como porcentaje de viabilidad (A) o rendimiento viral (B) en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

A fin de establecer si el blanco antiviral del carragenano- λ en estas células también se ubicaba en los eventos de entrada, como se había demostrado en las células Vero (Talarico y Damonte, 2007), se estudió el modo de acción diseñando un protocolo experimental de tratamientos de las células con el compuesto en diferentes etapas del ciclo de multiplicación viral. Los resultados que se presentan en la figura R16 demostraron que la presencia del compuesto durante la adsorción de 2 h a 4 °C o sólo durante la posterior internalización durante 2 h a 37 °C es suficiente para producir una marcada reducción en la multiplicación viral, medida por el rendimiento a las 48 h p.i.. En ambas células se observó una reducción de un orden de magnitud cuando se inhibe la adsorción y alrededor de dos o dos órdenes y medio de magnitud cuando el compuesto está presente en la internalización. Este nivel de inhibición es similar al alcanzado cuando se mantiene el carragenano durante todo el período de incubación (48 h). Por otro lado, el agregado del compuesto después de la adsorción e internalización viral no produjo alteraciones en

el rendimiento de DENV-2 comparado con el control viral sin compuesto. Por lo tanto, se puede concluir que el carragenano- λ interfiere exclusivamente con los procesos de adsorción e internalización de DENV-2 en las células U937 y K562, con un efecto más pronunciado en el proceso de internalización viral. Esta susceptibilidad al carragenano parece indicar que el heparán sulfato también cumpliría alguna función para la entrada de DENV-2 en este tipo de células humanas.

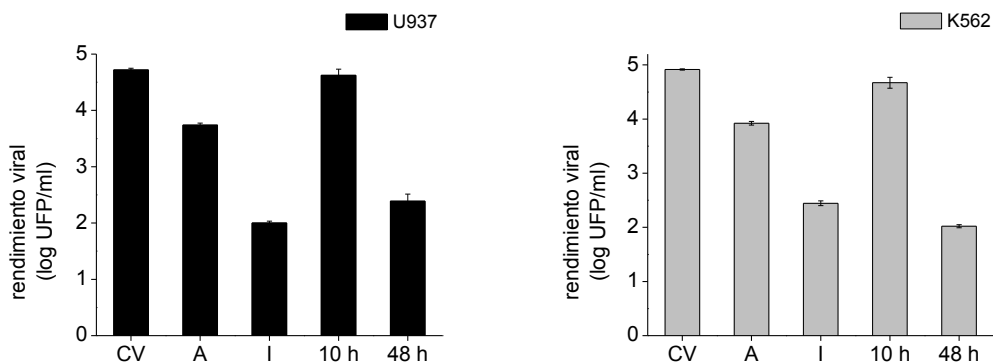


Figura R16 Efecto del tiempo de tratamiento con carragenano- λ sobre la actividad antiviral contra DENV-2. Células U937 o K562 se infectaron con DENV-2 (m.i. 5 UFP/célula) en distintas condiciones de tratamiento con 20 μ g/ml de carragenano- λ . **Adsorción (A):** las células se infectaron en MM conteniendo compuesto y luego de 2 h de adsorción a 4°C, se agregó MM sin compuesto. **Internalización (I):** el virus se adsorbió a 4°C durante 2 h en ausencia de compuesto, luego se agregó MM con carragenano y se continuó la incubación durante 2 h a 37°C para permitir la internalización viral. Se lavaron los cultivos con PBS y se agregó MM sin compuesto hasta las 48 h. **Post-internalización (10 h):** después de la adsorción a 4°C y la internalización durante 2 h a 37°C en ausencia de droga, se agregó MM conteniendo carragenano- λ continuando la incubación durante 10 h. Luego de ese tiempo, se lavó con PBS y completó la incubación de 48 h en ausencia de droga. **Tratamiento durante todo el período de infección viral (48 h):** las células se infectaron y se mantuvieron en presencia de compuesto desde la adsorción hasta completar todo el período de incubación. **Control viral (CV):** se realizó la infección durante 48 h en ausencia del compuesto. En todos los casos, se midieron los rendimientos virales a las 48 h p.i. por UFP en células Vero. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

II.B- Actividad antiviral del carragenano- λ en la infección con DENV-2 mediada por anticuerpos

En base a los resultados anteriores que muestran el efecto del carragenano- λ sobre la entrada de DENV-2 en células mieloides, se decidió evaluar si este compuesto también ejercía un efecto inhibitorio sobre la infección mediada por Ac en que la entrada depende inicialmente de los receptores Fc. Luego de corroborar que el carragenano no tenía efecto citotóxico sobre las células

durante 72 h (datos no mostrados), se infectaron las células U937 y K562 con la mezcla DENV-2-Ac 2H2 y DENV-2-Ac 3H5, respectivamente, en presencia de concentraciones crecientes del carragenano. El compuesto se mantuvo durante la infección y todo el período de incubación de 72 h a 37 °C.

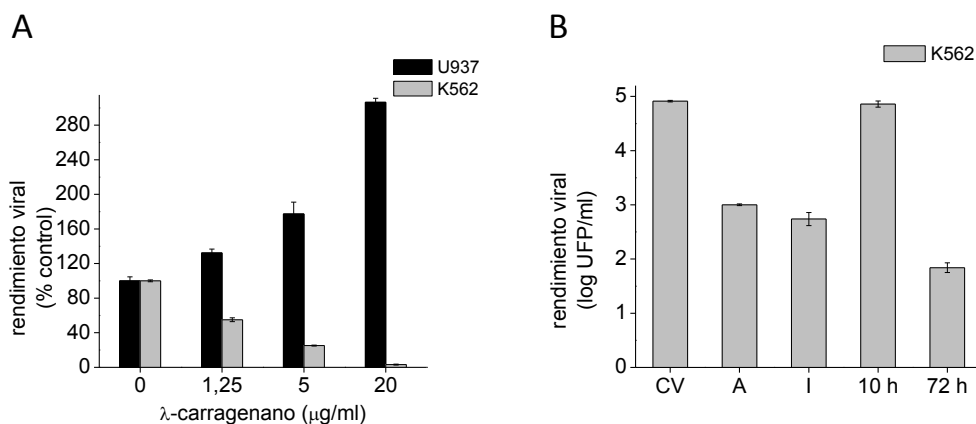


Figura R17. Actividad antiviral de carragenano-λ en la entrada de DENV-2 mediada por Ac. A. Evaluación de la actividad antiviral. Células U937 o K562 se infectaron durante 2 h a 37 °C con mezclas de DENV-2-Ac 2H2 o DENV-2-Ac 3H5, respectivamente (preincubadas durante 1 h a 37 °C en las condiciones establecidas en I.B.1), en presencia de las concentraciones indicadas de carragenano-λ. Luego, se lavaron los cultivos con PBS y se agregó MM con polisacárido. A las 72 h p.i. se determinaron los rendimientos virales en los sobrenadantes por formación de placas en células Vero. Los resultados están expresados como porcentaje de rendimiento viral en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes ± DE. **B. Efecto del tiempo de tratamiento con carragenano-λ sobre la actividad antiviral.** Células K562 se infectaron con mezclas DENV-2-Ac 3H5 en distintas condiciones de tratamiento con 20 μg/ml de carragenano-λ. **Adsorción (A):** las células se infectaron en MM conteniendo compuesto y luego de 2 h de adsorción a 4°C, se agregó MM sin compuesto. **Internalización (I):** el virus se adsorbió a 4°C durante 2 h en ausencia de compuesto, luego se agregó MM con carragenano y se continuó la incubación durante 2 h a 37°C para permitir la internalización viral. Se lavaron los cultivos con PBS y se agregó MM sin compuesto. **Post-internalización (10 h):** después de la adsorción a 4°C y la internalización durante 2 h a 37°C en ausencia de droga, se agregó MM conteniendo carragenano-λ continuando la incubación durante 10 h. **Tratamiento durante todo el período de infección viral (72 h):** las células se infectaron y se mantuvieron en presencia de compuesto desde la adsorción hasta completar todo el período de incubación. **Control viral (CV):** se realizó la infección durante 72 h en ausencia del compuesto. En todos los casos, se midieron los rendimientos virales a las 72 h p.i. por UFP en células Vero. Los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes ± DE.

Como se presenta en la figura R17 la susceptibilidad de la infección al carragenano-λ fue variable según el tipo de célula. En las células K562 se registró una respuesta similar a la obtenida en ausencia de Ac, con una inhibición de la multiplicación viral dependiente de la dosis y

alcanzando una reducción del rendimiento superior al 99 % para la máxima concentración ensayada de 20 $\mu\text{g/ml}$ y una CE_{50} de $2,65 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$. Por el contrario, en la infección de DENV-2 mediada por el Ac 2H2 en células U937 no hubo inhibición por el carragenano sino, sorpresivamente, un efecto aumentador de la infección, con un rendimiento viral entre dos y tres veces mayor al obtenido en ausencia de polisacárido.

También se analizó la influencia del tiempo de adición del carragenano- λ sobre la actividad inhibitoria en las células K562, mediante el mismo protocolo empleado en ausencia de Ac. La respuesta en la infección mediada por el Ac 3H5 fue similar, corroborando que en este sistema el compuesto también interfiere con la entrada viral. Por lo tanto, aún cuando la entrada del complejo virus-Ac está mediada por el receptor $\text{Fc}\gamma\text{RII}$, parecería que el heparán sulfato de la membrana celular también favorecería la infección en estas condiciones.

Para dilucidar si las diferencias observadas en la respuesta de células K562 y U937 presentada en la figura R17 se debe a la célula o al Ac empleado, se analizó el efecto del carragenano sobre los sistemas cruzados de infección mediada por Ac, es decir, en los sistemas U937- 3H5 y K562- 2H2. El ensayo se realizó de la misma forma explicada anteriormente para los otros sistemas. En la figura R18 se observa que, en estas condiciones, se registra una inhibición de la producción de DENV-2 superior al 99 % por tratamiento con carragenano- λ tanto en las células K562 como en células U937.

Por último, al igual que se realizó con la clorpromazina en RI.B.2.2, se evaluó el efecto del bloqueo de los $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ en conjunto con el efecto del carragenano en las células K562. La incubación de las células con el Ac AT.10 antes de la infección con el complejo DENV-2-3H5 inhibió completamente la entrada viral, al igual que el bloqueo con AT.10 y el posterior tratamiento con carragenano durante la adsorción e internalización.

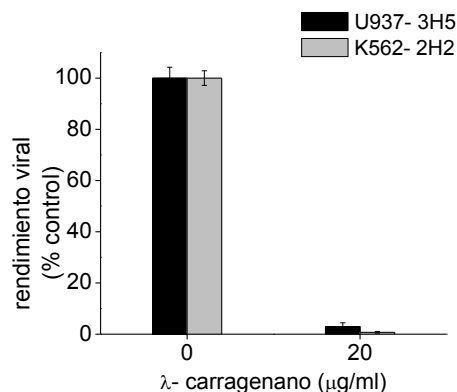


Figura R18. Actividad antiviral de carragenano-λ en la entrada de DENV-2 mediada por Ac en los sistemas cruzados. Células U937 o K562 se infectaron durante 2 h a 37 °C con mezclas de DENV-2-Ac 3H5 o DENV-2-Ac 2H2, respectivamente (preincubadas durante 1 h a 37 °C en las condiciones establecidas en I.B.1) en ausencia o presencia de 20 µg/ml de carragenano-λ. Luego, se lavaron los cultivos con PBS y se agregó MM con polisacárido. A las 72 h p.i. se determinaron los rendimientos virales en los sobrenadantes por formación de placas en células Vero. Los resultados están expresados como porcentaje de rendimiento viral en los cultivos tratados con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes ± DE.

La suma de los resultados obtenidos indican que la entrada de DENV-2 mediada por Ac en estas células se ve favorecida por el heparán sulfato presente en la membrana celular cuando la vía está mediada por el FcγRII mientras que, en el caso de FcγRI, la entrada aparenta estar mediada por una vía alternativa. Estos resultados parecen mostrar cierta correlación con los obtenidos en el capítulo I al utilizar la clorpromazina como inhibidor en estos mismos sistemas de infección de DENV-2 en presencia de Ac.

Discusión: Efecto del carragenano sobre la entrada viral

El carragenano-λ mostró una efectiva actividad antiviral frente a DENV-2, en forma dependiente de la dosis y con eficiencia similar en células U937 y K562 en ausencia de Ac. Los ensayos del tiempo de adición del compuesto demostraron que sólo inhibe la infección viral en las etapas tempranas del ciclo viral, ya que no hay efecto sobre la multiplicación viral al agregar el compuesto luego de la adsorción e internalización viral, incluso manteniendo el presente el compuesto durante 10 h p.i. (Fig. R16). El carragenano-λ, por lo tanto, interfiere exclusivamente con los procesos de adsorción e internalización de DENV-2 en las células U937 y K562, con un

efecto más pronunciado en el proceso de internalización viral. Estos resultados coinciden con las observaciones de trabajos reportados en otro tipo de células que mostraron que la internalización y el desnudamiento de la partícula de DENV-2 en células Vero y HepG2 se ven afectados por la presencia de polisacáridos sulfatados que impedirían la penetración de la nucleocápside al citoplasma (Hung, 1999; Talarico y Damonte, 2007).

Estos resultados permitirían incluir a las líneas celulares humanas mieloides entre los numerosos tipos celulares en los que se han presentado evidencias que indican que el HS o formas muy sulfatadas de GAGs, como el condroitin sulfato, son esenciales para la entrada de los flavivirus, incluido DENV (Germi *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2000, 2002; Mandl *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2001). Además, el efecto dual del carragenano sugiere que los residuos de HS no sólo actúan como receptores de adsorción a la célula, sino también que, a través de la unión a la proteína E serían mediadores del desnudamiento de la partícula viral en estas líneas celulares mieloides. Por otro lado, cabe destacar que los resultados aquí observados son similares a reportes anteriores (Bielefeldt-Ohmann, 1998) que describen el rol de HS en líneas celulares mielomonocíticas al mostrar una marcada inhibición de la infección de DENV-2 en presencia de heparina, otro análogo del HS.

En células Vero se ha reportado que la susceptibilidad de DENV a los polisacáridos sulfatados puede ser variable de acuerdo al serotipo viral (Talarico *et al.*, 2005; Talarico *et al.*, 2007; Talarico y Damonte, 2007) y que, aun para un mismo serotipo como DENV-2 propagado en distintas líneas celulares puede haber diferencias en susceptibilidad a los polisacáridos de acuerdo a si el virus utiliza una vía endocítica para la internalización dependiente o no de clatrina (Acosta *et al.*, 2014). Aquí, sin embargo se observó que tanto en células K562 como U937, donde la entrada viral se ha visto que es mediada por clatrina, hay una fuerte inhibición de la multiplicación de DENV-2 en presencia de carragenano- λ . Esta diferencia puede deberse a los distintos tipos de célula utilizados, monocapas de células Vero vs células mielomonocíticas o eritroleucémicas en suspensión, así como a una diferente distribución o abundancia de HS en dichas células. Ha sido demostrado en numerosas ocasiones que HS actúa como un receptor de baja afinidad para varios virus y ha sido sugerido como aumentador de la interacción del virus con un receptor secundario más que por su unión directa a los viriones, debido a su función probable como concentrador de los virus en la superficie celular.

Los ensayos antivirales con carragenano- λ en presencia de Ac mostraron un efecto inhibitorio similar en los sistemas de entrada mediada principalmente por el receptor Fc γ RII, como se vió con las células K562. En el sistema de células U937 con mayor relevancia del receptor Fc γ RI, en cambio, el carragenano- λ no inhibió la multiplicación viral, sino por el contrario, se detectó un aumento de la producción viral (figura R17). Suponiendo que este aumento se deba a un efecto del compuesto sobre la entrada viral, la presencia del carragenano podría impedir la interacción que existe (ver figura R12) entre los viriones con el Fc γ RII, como se observó en el sistema con K562, y permitir un aumento en la interacción y unión con el otro receptor presente en las células U937, el Fc γ RI, aumentando la entrada a través de este segundo receptor, que demostró ser más eficiente, y, por lo tanto, aumentando la multiplicación viral.

El rol diferencial del HS en uno y otro caso podría estar implicado en el direccionamiento de las partículas virales hacia uno u otro receptor y, en este caso, confirma que la vía endocítica utilizada en uno y otro sistema es distinta aún tratándose de la misma línea celular y el mismo serotipo viral de DENV. Sería interesante determinar si la sola eliminación del HS de la superficie de células es capaz de inducir un redireccionamiento de DENV-2 desde la vía de internalización de clatrina clásica hacia la vía independiente de clatrina como sucede en presencia del carragenano en las células U937.

Si bien estos compuestos que mimetizan al HS han mostrado una amplia actividad antiviral contra varios virus envueltos debido a los grupos sulfato cargados negativamente que interactúan con aminoácidos básicos de la envoltura viral, no hay que olvidar que, en el caso de DENV, la susceptibilidad parece depender del serotipo viral (Talarico *et al.*, 2005; Talarico *et al.*, 2007; Talarico y Damonte 2007) y que este trabajo de tesis confirma una vez más la acción del compuesto como dependiente del sistema en estudio. Sin embargo, la posibilidad de obtener estos compuestos en gran cantidad, a muy bajo costo y con tan baja toxicidad permite pensar que habría que avanzar en su estudio sin descartar la evaluación del efecto de estos compuestos en los modelos animales para DENV que se desarrollaron en estos últimos años (Zompi y Harris, 2012). Hace relativamente poco, se ha caracterizado un polisacárido sulfatado, el curdlan sulfato, que había demostrado ser efectivo contra la infección de HIV, con características y un mecanismo de acción similar al carragenano y que posee una buena actividad antiviral contra los 4 serotipos de DENV (Ichiyama *et al.*, 2013). Se ha encontrado también actividad antiviral de este compuesto en

condiciones de ADE *in vitro*, aunque todavía es muy poco lo que se conoce y se ha descrito en esa situación de infección aumentada en presencia de Ac. Cabe destacar, también, la existencia del compuesto SA-17, un derivado del antibiótico doxorubicina, que inhibe la unión al receptor y fusión en la entrada de DENV-1, 2 y 3, aunque no de DENV-4 (Kaptan, 2010) y es activo para bloquear el ADE de partículas tanto maduras como inmaduras de DENV-2 (Ayala-Núñez *et al*, 2013). Se ha demostrado también la existencia de algunos péptidos que inhiben la entrada de los viriones en condiciones de ADE (Nicholson *et al.*, 2011). Queda claro que todavía hay mucho por hacer pero que el estudio y conocimiento del modo de entrada de DENV a la célula huésped permitirá explorar las posibilidades de este paso del ciclo de multiplicación como blanco antiviral.

CAPITULO III. El colesterol en la entrada de DENV: requerimiento en la envoltura viral.

Nuestros estudios de los mecanismos de endocitosis para la entrada de DENV-2 en células humanas se basaron primordialmente en el estudio del efecto de inhibidores farmacológicos de las distintas vías endocíticas sobre la infección viral. Como un paso previo para asegurar que el probable efecto inhibitorio de los compuestos se debiera únicamente a su actividad bloqueante sobre la correspondiente ruta de endocitosis durante la internalización viral, se estudió la actividad virucida de cada compuesto por incubación directa de una suspensión de DENV-2 con la droga. Estos estudios demostraron que ninguno de los compuestos utilizados ejercía acción virucida sobre DENV-2 fuera de la célula (datos no mostrados), con la excepción de los inhibidores que interaccionan con colesterol. En efecto, como se mencionó en el punto I.A.2.3, tanto MCD como nistatina tuvieron efecto inactivante sobre las suspensiones de DENV-2, por lo que para su uso en el estudio del rol del colesterol celular en la internalización de DENV-2 se utilizó un protocolo experimental que evitaba el contacto directo de los viriones con estas drogas. Al comprobar la elevada actividad virucida de ambos compuestos y ante los resultados obtenidos sobre los nulos o escasos requerimientos de colesterol en las membranas celulares para la entrada de DENV-2 (figura R6), decidimos analizar el rol del colesterol presente en la envoltura viral durante la infección a través del estudio del mecanismo de inactivación de agentes interactivos con colesterol como MCD y nistatina.

III.1. Actividad virucida de MCD y nistatina

Inicialmente, para medir la actividad virucida de MCD se incubaron suspensiones de DENV-2 con distintas concentraciones de la droga durante 1 h a 37°C y luego se tituló la infectividad remanente en células Vero. Las muestras a incubar con las células para su titulación se diluyeron para disminuir la concentración de la droga al menos 100 veces y asegurar que cualquier reducción del título del virus fuese sólo resultado de la inactivación viral y no por un efecto de MCD en las células. Como se observa en la figura R19A hay una disminución dosis-dependiente de la infectividad de DENV-2, con una inhibición mayor al 99% en concentraciones de MCD por encima de 0,312 mM. A partir de los datos de la figura R23A se puede extrapolar el valor de la CV_{50} para MCD frente a DENV-2 en $0,0514 \pm 0,0002$ mM.

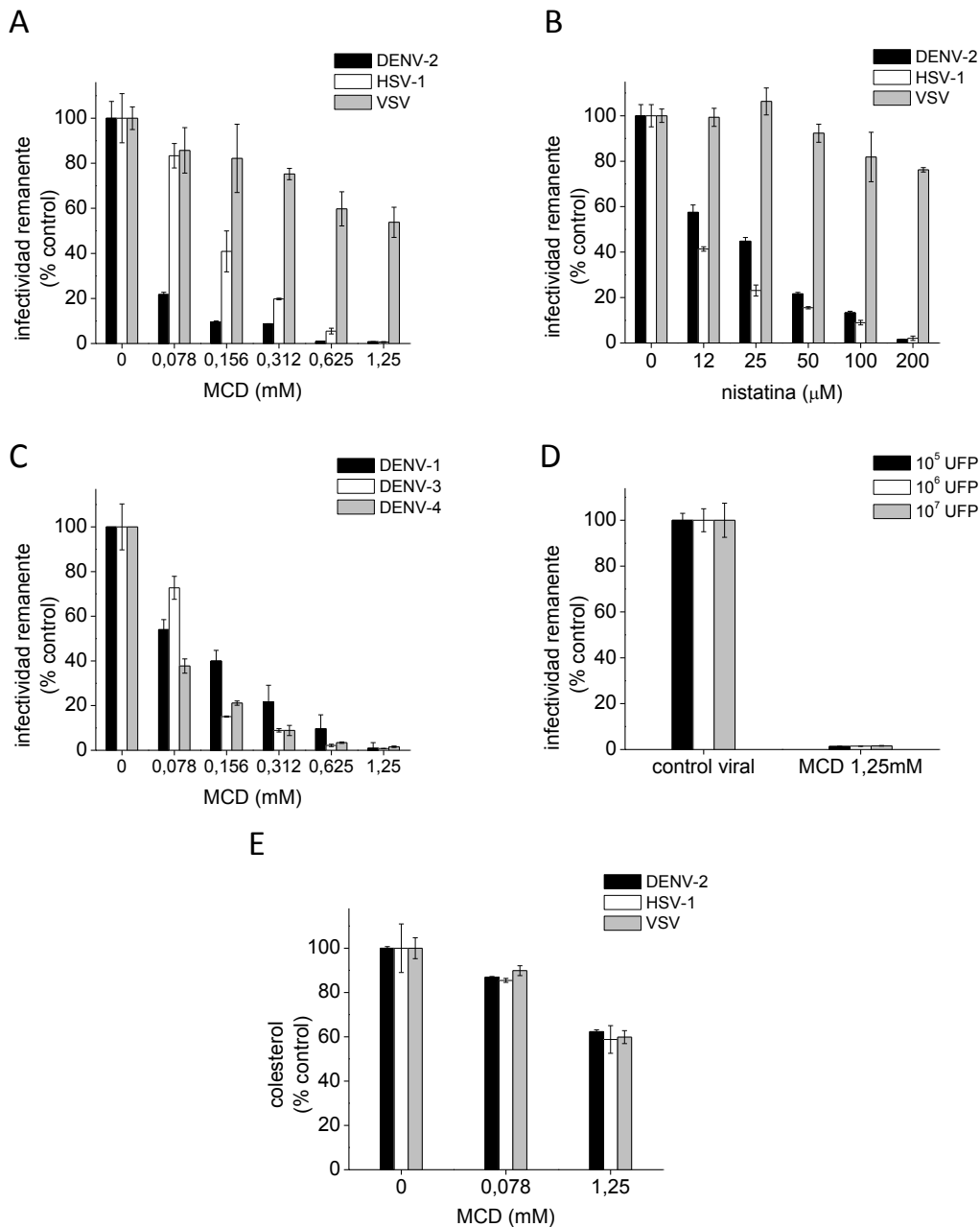


Figura R19. Efecto virucida de MCD y nistatina. A y B. Suspensiones de DENV-2, HSV-1 y VSV conteniendo 1×10^6 UFP/ml se incubaron con PBS conteniendo distintas concentraciones de MCD (A) o nistatina (B) durante 1 h a 37°C . Luego, las muestras fueron diluidas y la infectividad remanente se determinó por formación de placas en células Vero. C. Suspensiones de DENV-1, DENV-3 y DENV-4 conteniendo 1×10^6 UFP/ml fueron tratadas con MCD y la infectividad remanente se midió como en A. D. Suspensiones de DENV-2 conteniendo 10^5 , 10^6 o 10^7 UFP/ml fueron tratadas con MCD y la infectividad remanente medida como en A. E. Suspensiones de DENV-2, HSV-1 o VSV se incubaron con MCD durante 1h a 37°C , se filtraron para eliminar el exceso de droga y colesterol libres y se midió el contenido de colesterol en los viriones con el método del Amplex Red. Los resultados están expresados como porcentaje de infectividad (A-D) o colesterol (E) remanente en las muestras tratadas con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

El virus HSV-1 ha sido reportado en bibliografía como dependiente del contenido de colesterol en la envoltura viral para llevar a cabo una infección productiva (Bender *et al.*, 2003), por lo tanto, se ensayó como control positivo en paralelo al estudio de DENV-2. A pesar de que el nivel de inhibición a muy bajas concentraciones no fue tan drástico como se observó para DENV-2, hubo una marcada reducción de la infectividad de HSV-1 debida al tratamiento con MCD, como se observa en la figura R19A. A la concentración de 0,156 mM ya se puede observar una disminución del 90 % en el rendimiento viral. Por otro lado, como es sabido que VSV brota desde membranas sensibles al detergente no asociadas a *raft* (Brown y Lyles, 2003; Scheiffele *et al.*, 1999) se ensayó el efecto virucida de la droga sobre VSV como control negativo. De forma similar a la reportada en otros trabajos (Imhoff *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 1978; Ren *et al.*, 2008), la infectividad de VSV no se vio prácticamente afectada en presencia de bajas dosis de MCD y se observó sólo una débil reducción en el título viral, menor al 50% respecto a la suspensión de viriones sin tratar, en la máxima concentración de droga utilizada (figura R19A).

El requerimiento de colesterol en la envoltura de DENV-2 para mantener su infectividad se corroboró al analizar la actividad inactivante de nistatina. En la figura R19B se observa que también hubo reducción de la infectividad en función de la dosis de compuesto, alcanzado 99 % de inhibición con una concentración 200 μ M de la droga. Nuevamente, HSV-1 y VSV fueron incluidos como controles positivo y negativo, respectivamente. HSV-1 fue inhibido un 98% en la máxima concentración ensayada, de forma similar a DENV-2, mientras que sólo hubo una mínima reducción de infectividad del 20 % luego de tratar suspensiones de VSV con 200 μ M de nistatina (figura R19B).

Los efectos inhibitorios de ciertos compuestos sobre DENV pueden ser variables dependiendo del serotipo viral (Hidari *et al.*, 2008; Kaptein *et al.*, 2010; Talarico *et al.*, 2005; Talarico y Damonte, 2007). Sin embargo, la actividad virucida de las drogas que afectan colesterol no fue dependiente del serotipo viral. Se observó un nivel similar de reducción en la infectividad viral luego del tratamiento de suspensiones de DENV-1, DENV-3 y DENV-4 con MCD (figura R19C). En los tres casos la inactivación viral producida por el compuesto fue superior al 99 % para una concentración de 1,25 mM. Por otra parte, la efectividad inactivante de MCD no fue modificada por el inóculo inicial de virus en contacto con la droga. Cuando el ensayo de inactivación se realizó incubando distintas cantidades de DENV-2 con MCD 1,25 mM, la inhibición de la infectividad remanente fue similar y superior al 98 % en todo el rango de 10^5 - 10^7 UFP (figura R19D).

Para corroborar que la marcada caída de infectividad era causada por la extracción de colesterol de la envoltura viral, se determinó el contenido de colesterol viral en suspensiones de DENV-2 utilizando el método con el fluoróforo Amplex Red. Después de incubar los viriones de DENV-2 durante 1 h con MCD 1,25 mM se observó una reducción del 50 % en la concentración de colesterol respecto de los viriones sin tratar (figura R19E), un nivel de extracción de colesterol similar al reportado para otros virus luego de la exposición a estas dosis de MCD (Ren *et al.*, 2008; Sun y Whittaker, 2003). Por otra parte, la medición del contenido de colesterol en los viriones empleados como controles en el ensayo de actividad virucida, HSV-1 y VSV, mostró niveles similares de reducción luego del tratamiento con MCD (figura R19E).

III.2. Efecto de la recuperación de colesterol en la membrana viral

Para confirmar el rol crítico del colesterol en la envoltura viral, se trató de revertir el efecto causado por el tratamiento con MCD agregando suero fetal bovino (SFB) que reestableciera los niveles de colesterol viral. Con ese fin, suspensiones de DENV-2 fueron tratadas con MCD como en los experimentos del punto anterior, pero durante la incubación de los viriones con droga el medio contenía SFB. En estas condiciones, se observó una recuperación parcial de la infectividad de los viriones tratados con MCD, en el rango de concentraciones 0,078-0,312 mM, en presencia de SFB respecto a las muestras incubadas sin suero (figura R20A). Asimismo, los niveles de colesterol de la suspensión viral se vieron aumentados luego del tratamiento con MCD en presencia de SFB (figura R20B). Por el contrario, cuando el SFB fue agregado luego del tratamiento de los viriones con MCD en ausencia de suero, la infectividad no se recuperó (datos no mostrados). Esto sugiere que el efecto de MCD no es reversible y que el colesterol presente en el suero competiría con el colesterol viral dejando menos moléculas de MCD disponibles para actuar. También se intentó revertir el efecto inactivante de la droga reestableciendo los niveles virales de colesterol por medio de la adición de colesterol exógeno soluble en agua. Sin embargo, no fue posible realizar exitosamente este ensayo debido a que el colesterol mostró una importante actividad virucida sobre DENV-2. De hecho, el tratamiento de suspensiones de DENV-2 con diferentes concentraciones de colesterol produjo una inhibición dosis-dependiente de la infectividad, con un valor de CV_{50} de $1,32 \pm 0,28 \mu\text{M}$ y cerca del 90% de inhibición a una concentración de colesterol $1,5 \mu\text{M}$ (figura R20C).

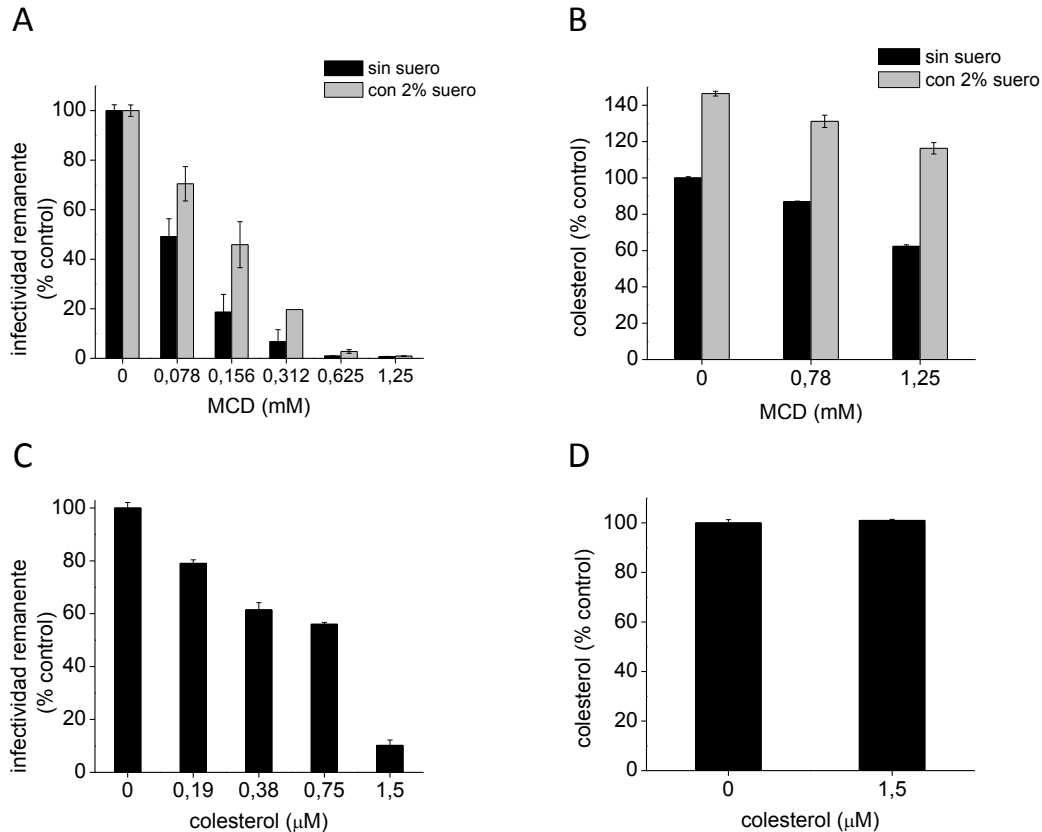


Figura R20. Efecto de la recuperación de colesterol sobre los viriones de DENV-2. **A.** Suspensiones conteniendo 1×10^6 UFP de DENV-2 fueron tratadas con varias concentraciones de MCD en medio de cultivo en presencia o ausencia de 2 % SFB durante 1 h a 37°C. Luego se determinó la infectividad remanente por UFP en células Vero. **B.** En suspensiones de DENV-2 tratadas con MCD en presencia y ausencia de SFB como en A y, luego de filtrar para eliminar la droga y colesterol libres, se midió el contenido de colesterol por el método del Amplex Red. **C.** Suspensiones de DENV-2 se incubaron con PBS conteniendo crecientes concentraciones de colesterol durante 1h a 37°C y la infectividad remanente se cuantificó por UFP como en A. **D.** Suspensiones virales de DENV-2 fueron incubadas con 1,5 μ M de colesterol como se explicó en C. y, luego de filtrar, se midió el contenido de colesterol por el método del Amplex red. En paralelo se realizó el mismo tratamiento y medición para suspensiones de DENV-2 sin colesterol. Los resultados están expresados como porcentaje de infectividad (A y C) o colesterol (B y D) remanente en las muestras tratadas con droga respecto de los controles no tratados y los valores corresponden al promedio de dos determinaciones independientes \pm DE.

Debido a que las concentraciones de colesterol normalmente empleadas para realizar la recuperación de infectividad durante el tratamiento con MCD están en el rango 50-100 μ M (Bremer *et al.*, 2009; Imhoff *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008; Sun and Whitakken, 2003; Yin *et al.*, 2010), fue técnicamente imposible reestablecer los niveles de colesterol en la membrana viral con esta experiencia. De todas formas, se intentó recuperar la infectividad utilizando concentraciones más bajas, no virucidas, de colesterol pero no se pudo observar cambio alguno en las mediciones

de infectividad remanente y, al aumentar las dosis de colesterol agregado, el efecto inactivante conjunto de ambas drogas resultó aún más inhibitorio sobre la infectividad de las partículas de DENV-2. Por otro lado, el agregado de colesterol exógeno, incluso en concentraciones virucidas, no produjo un aumento significativo en los niveles de colesterol viral medidos (figura R20D). Por lo tanto, se puede concluir que el colesterol de la envoltura viral se requiere para la infección pero, de acuerdo a los resultados que se muestran en las figuras R19 y R20, en un delicado punto de equilibrio, ya que tanto el defecto como el exceso de colesterol tienen similares efectos sobre la infectividad del virión.

III.3. Mecanismo de bloqueo en la infección con viriones inactivados con MCD

Debido a la indiscutible dependencia hasta acá demostrada que tiene DENV-2 respecto del colesterol presente en la envoltura viral, para llevar a cabo una infección productiva, se estudió cuál es el proceso, en la infección viral, que se encuentra bloqueado por la falta de colesterol en el virión. Para eso se analizaron, en forma comparativa, las distintas etapas del ciclo de multiplicación en la infección de células Vero con virus infeccioso e inactivado.

El primer paso analizado fue el de adsorción viral. Para eso, suspensiones de DENV-2 inactivadas o no con MCD se adsorbieron a células Vero durante 1 h a 4°C. Luego de ese tiempo se realizaron reiterados lavados con PBS frío para eliminar los viriones no adsorbidos del medio. La cantidad de viriones unidos a las células fue medida por medio de una RT-PCR en tiempo real. Como se puede observar en la figura R21A, los viriones de DENV-2 inactivados con MCD se unieron a las células Vero con una eficacia similar a la del control con viriones infecciosos.

A continuación, se analizó la internalización de partículas virales de DENV-2 inactivadas con MCD. Primero se dejó adsorber viriones tratados o sin tratar con MCD durante 1 h a 4°C y, luego de lavar con PBS frío, se incubaron las células infectadas durante 1 h a 37°C para permitir la internalización viral. Luego de ese tiempo, se incubaron las células con proteinasa K para eliminar los viriones adsorbidos pero no internalizados. Se determinó el número de moléculas de ARN viral internalizadas por medio de RT-PCR cuantitativa. Como se muestra en la figura R21B, el número de moléculas de ARN de DENV-2 internalizadas por cultivo fue similar en células infectadas con viriones inactivados o sin tratar con MCD. Por lo que tampoco la internalización viral parece ser el proceso bloqueado en los viriones tratados con MCD.

El siguiente paso del ciclo de multiplicación de DENV es el desnudamiento viral, que comienza cuando el virión entra en contacto con el bajo pH endosomal que induce la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma, permitiendo, de esta forma, la liberación de la nucleocápside al citoplasma. Para evaluar si los viriones de DENV-2 reducidos en colesterol eran capaces de llevar a cabo la fusión de las membranas y desnudamiento viral, se realizó un seguimiento de la distribución de la proteína C, de la cápside viral, en células infectadas con viriones inactivados o no con MCD. Dado que luego de la fusión de las membranas endosomal y viral la nucleocápside es liberada al citoplasma, la proteína de cápside va desapareciendo de las vesículas endocíticas. Este proceso de desnudamiento prácticamente se completa en células Vero infectadas con DENV-2 luego de 30 min de incubación a 37°C (Acosta *et al.*, 2012). Por lo tanto, se infectaron células Vero con DENV-2 inactivado y control, la infección fue sincronizada inicialmente durante 1h a 4°C y luego se incubaron los cultivos a 37°C. Como se esperaba, al infectar las células con DENV-2 infeccioso se observó un patrón característico de fluorescencia puntillada en el citoplasma a los 10 min a 37 °C después de la adsorción de 1 h a 4 °C (figura R21C). De acuerdo con la cinética de infección reportada para DENV-2 en células Vero (Acosta *et al.*, 2012), la cantidad de fluorescencia correspondiente a la proteína C se vió marcadamente reducida o prácticamente indetectable a los 45 min post-adsorción. Por el contrario, en células infectadas con viriones inactivados con MCD esa fluorescencia se mantuvo constante entre los 10 y los 45 min post-adsorción, indicando un bloqueo en el desnudamiento viral durante la infección con DENV-2 inactivado con MCD. Los niveles de fluorescencia correspondientes a la marcación de la proteína C fueron medidos mediante cuantificación de la señal por medio del software FIJI (figura R21D). El número de partículas fluorescentes por célula cada 100 μm^2 a los 10 min post-adsorción fue similar tanto para el control como para los viriones tratados con MCD. A los 45 min, la cantidad de partículas en las células infectadas con viriones infecciosos fue reducida casi un 98% respecto a los 10 min, mientras que en las células infectadas con viriones tratados la fluorescencia se mantuvo con sólo un 6 % de inhibición. Esta cuantificación confirma la retención de la marcación de la proteína C en las células infectadas con viriones inactivados por MCD que se observa en las imágenes de la figura R21C.

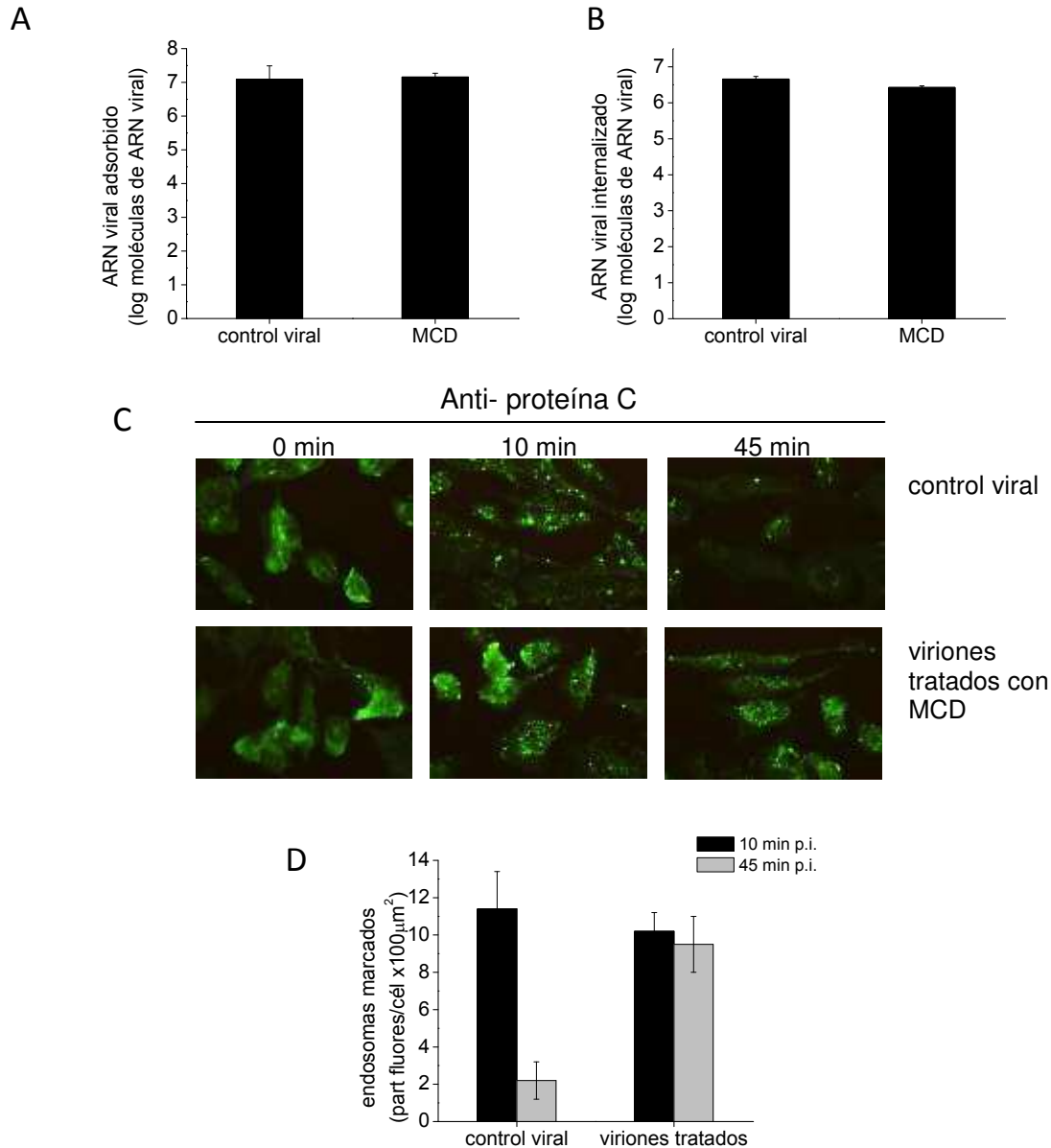


Figura R21. Entrada de viriones inactivados con MCD. A. Adsorción viral. Suspensiones de DENV-2 tratadas (MCD) o no (control viral) con MCD durante 1 h a 37°C fueron filtradas a través de membranas de celulosa para eliminar la droga libre. Luego se adsorbieron sobre monocapas de células Vero durante 1 h a 4°C. El ARN total se extrajo utilizando Trizol y la cantidad de moléculas de ARN de DENV-2 unido se determinó mediante RT-PCR cuantitativa. **B. Internalización viral.** Viriones tratados o no con MCD se adsorbieron a células Vero durante 1 h a 4°C. Luego de lavar los cultivos con PBS, se incubaron a 37°C durante 1 h y se trataron con proteinasa K. El ARN total se extrajo de las células y se realizó una RT-PCR cuantitativa para determinar el número de moléculas de ARN viral internalizadas. Los valores son el promedio de dos determinaciones independientes \pm DE. **C. Desnudamiento viral.** Suspensiones de DENV-2 inactivadas o no con MCD se adsorbieron a células Vero durante 1 h a 4°C y luego se incubaron a 37°C. A los tiempos indicados, las células se fijaron y se procesaron para tinción de la proteína C por inmunofluorescencia con Ac monoclonal anti-C de DENV-2 seguido de suero anti-IgG de ratón conjugado a FITC. **D. Cuantificación de imágenes.** La fluorescencia observada en C se cuantificó por microscopía confocal usando el programa FIJI los resultados se expresan como partículas fluorescentes por célula cada 100 μm^2 .

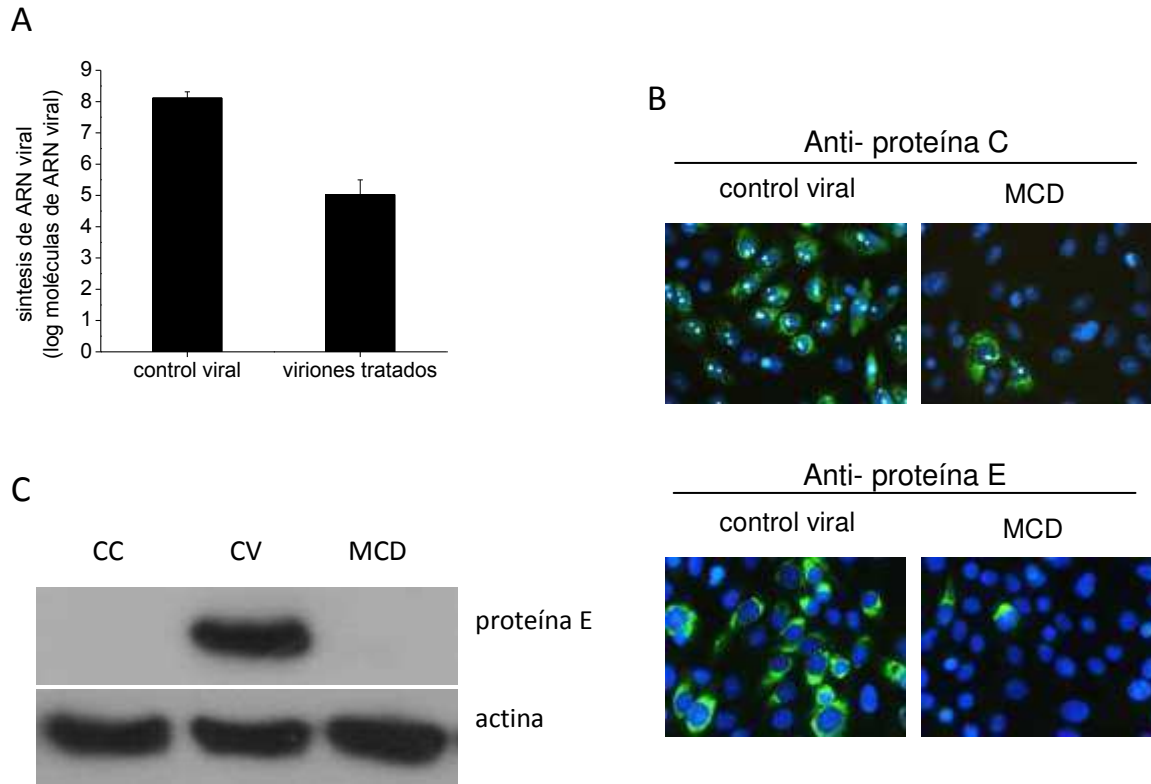


Figura R22. Síntesis de macromoléculas virales. A. Síntesis de ARN viral. Células Vero se infectaron con DENV-2 inactivado con MCD (MCD) o sin tratar (control viral) durante 1 h a 4°C y, luego de lavar con PBS e incubarlas durante 24 h a 37°C, se extrajo el ARN total y se cuantificó mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores son el promedio de dos determinaciones independientes \pm DE. **Expresión de proteínas virales. B. Inmunofluorescencia.** Células Vero fueron infectadas con DENV-2 tratado con MCD (MCD) o sin tratar (control viral). A las 24h p.i., una serie de cultivos se fijaron con metanol y se revelaron con Ac monoclonal contra la proteína C de DENV-2 o Ac monoclonal contra la glicoproteína E seguido de un anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC. **C. Western blot.** Otra serie de cultivos se lisaron en buffer de siembra y se sometieron a electroforesis, y la glicoproteína E fue detectada por *Western blot* con un anticuerpo monoclonal anti-E. CC: control celular. CV: células infectadas con viriones controles. MCD: células infectadas con viriones tratados con MCD.

Para confirmar que el desnudamiento del genoma viral está bloqueado en las células infectadas con DENV-2 inactivado por MCD se examinaron a continuación las etapas de síntesis de macromoléculas virales. En primer lugar, se estudió la síntesis de ARN viral por extracción del ARN total a partir de células infectadas con viriones controles o inactivados con MCD y posterior RT-PCR en tiempo real. La cuantificación del ARN viral sintetizado luego de la infección de células Vero con DENV-2 tratado con MCD mostró una marcada inhibición de aproximadamente 3 unidades logarítmicas en comparación a la infección con DENV-2 no tratado con droga (figura R22A). Esto

confirma que, debido a la incapacidad de fusionar de los viriones, el ARN viral no es liberado al citoplasma ni replicado al extraer el colesterol de la membrana viral.

También se analizó la síntesis de proteínas virales para verificar que su expresión estuviese bloqueada debido a la falla en el desnudamiento de los viriones inactivados con MCD. Como se observa en la figura R22B, la expresión de las proteínas de cápside y de envoltura, determinada por tinción mediante inmunofluorescencia a las 24 h p.i., estuvo inhibida en aquellas células Vero infectadas con viriones DENV-2 inactivados. La incapacidad de traducción de los viriones fue también evaluada por electroforesis y *Western blot*. De nuevo, la glicoproteína viral E no pudo ser detectada (figura R22C) en aquellas células infectadas con DENV-2 inactivado a diferencia de la fuerte expresión que se observó luego de la infección de células Vero con DENV-2 sin tratar, confirmando que los viriones inactivados no llevan a cabo el proceso de síntesis proteica.

III.4. Antigenicidad de la glicoproteína de envoltura en viriones inactivados

Los compuestos que afectan la envoltura viral pueden afectar la antigenicidad de la glicoproteína de envoltura del virión. Para examinar si la extracción de colesterol por MCD alteraba la antigenicidad de la glicoproteína E presente en la superficie viral se determinó la reactividad de suspensiones de DENV-2 tratadas o no con MCD frente a un anticuerpo monoclonal contra la glicoproteína E por medio de electroforesis y *Western blot*.

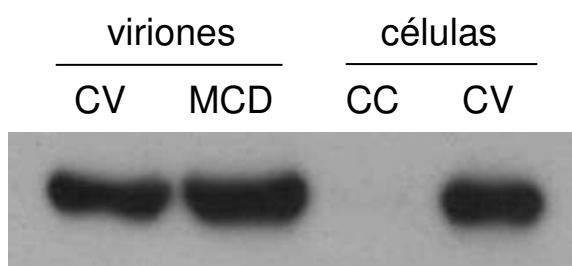


Figura R23. Efecto de MCD en la antigenicidad del virión. Suspensiones de DENV-2 clarificadas se trataron o no con MCD 1,25 mM durante 1 h a 37°C. Luego las muestras se lisaron en buffer de siembra y se resolvieron por electroforesis. En paralelo como controles positivos y negativos, se sembraron lisados de células Vero infectadas con DENV-2 control o sin infectar, respectivamente. La glicoproteína E se detectó por *Western blot* con un anticuerpo monoclonal anti-E (CV: control viral: MCD viriones tratados con MCD, CC: control celular).

Como se observa en la figura R23 la reactividad frente al anticuerpo no fue afectada por el tratamiento con MCD y el patrón electroforético de la proteína de envoltura de DENV-2 fue similar en viriones tratados y sin tratar, así como en extractos obtenidos a partir de células infectadas con DENV-2. Por lo tanto, el tratamiento con MCD y la comprobada extracción del colesterol viral inactiva los viriones de DENV-2 sin afectar significativamente la antigenicidad viral.

Discusión: Rol de colesterol viral para la infección productiva

Los resultados presentados en este trabajo muestran una dependencia diferencial al contenido de colesterol en las membranas celular y viral para la iniciación de una infección productiva de DENV. El pretratamiento de diferentes líneas celulares con compuestos reactivos al colesterol como MCD o nistatina no afectan la subsecuente infección con DENV, como se mostró en el Capítulo I, mientras que la incubación de los viriones con los mismos compuestos provoca una marcada inhibición de la infectividad.

En relación al colesterol viral, se ha informado que el efecto de la extracción del colesterol de la membrana viral resulta en una reducción de la infectividad para una gran cantidad de virus pertenecientes a muy diversas familias. En este grupo están incluidos el HIV-1 (Graham *et al.*, 2003), herpesvirus humano 6 (Huang *et al.*, 2006), canine distemper virus (Imhoff *et al.*, 2007), virus de la gastroenteritis transmisible (Ren *et al.*, 2008), virus de varicela- zoster (Hambleton *et al.*, 2007), virus pseudorabia (Desplanques *et al.*, 2010), virus de la hepatitis B de humanos y patos (Funk *et al.*, 2008; Bremer *et al.*, 2009), virus influenza (Sun and Whittaker, 2003) y virus Lassa (Schlie *et al.*, 2010). En la familia *Flaviviridae*, también se demostró dependencia del colesterol para la infección del virus de la Hepatitis C, cuyo contenido de colesterol viral parece más decisivo que el asociado a la membrana celular (Aizaki *et al.*, 2008).

Nuestros resultados han demostrado, por primera vez, una alta susceptibilidad de los cuatro serotipos a la inactivación frente al efecto de la MCD. Esta pérdida de infectividad está asociada a la reducción del contenido de colesterol en los viriones, sin embargo, el agregado de colesterol externo por medio de suero fetal bovino o el colesterol soluble en agua no permitieron un restablecimiento total de los niveles de infectividad. Sólo la incubación simultánea de los viriones con MCD y colesterol sérico produjo una parcial recuperación de la infección, pero no se pudo revertir la pérdida de infectividad cuando el colesterol o suero se agregaron luego del

tratamiento con MCD. La acción irreversible de MCD en la infección viral fue también informada por otros autores imposibilitados de recuperar el contenido de colesterol (Desplanques *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008; Sun and Whittaker, 2003).

Si bien parece que MCD afecta directamente la infectividad por medio de la extracción de colesterol, podrían existir otros efectos secundarios. No puede descartarse que MCD también extraiga otros lípidos de la envoltura viral, a pesar de que varios estudios reportaron sólo mínimos efectos sobre los fosfolípidos de las membranas en relación al efecto que ejerce sobre el colesterol (Desplanques *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008; Sun and Whittaker, 2003; Zidovetzki y Levitan, 2007).

La incubación de los viriones únicamente con colesterol exógeno mostró también un alto efecto de inactivación. Esta acción inhibitoria, sin embargo, no mostró correlación con un aumento del contenido de colesterol al compararlo con el contenido de partículas virales sin tratar. Lee *et al.* (2008) reportaron un bloqueo de la infección de DENV-2 al realizar el tratamiento con colesterol y los autores sugieren que puede ser debido al incremento de rigidez resultante que funcionaría como barrera para permitir la fusión de las membranas y detendría el ciclo viral en la entrada a la célula blanco.

Es también interesante remarcar la alta susceptibilidad de DENV al tratamiento con MCD ya que la infectividad de DENV se redujo marcadamente a una concentración del compuesto mucho menor que aquellas requeridas para afectar la infectividad de otros virus: una reducción del 50 % de la infectividad de DENV se detectó en presencia de 0,005 mM de MCD mientras que los valores para alcanzar la misma reducción de otros virus fueron superiores a 1 mM. El contenido de colesterol de la envoltura viral puede estar relacionado con este comportamiento.

Para los arbovirus que pertenecen a la familia *Togaviridae* como el virus Sindbis o Mayaro, se ha demostrado que la composición lipídica de la envoltura viral así como el contenido de colesterol son similares a los de la membrana plasmática de la que brotaron los viriones (Hafer *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2011). Los flavivirus adquieren su envoltura viral a partir del retículo endoplasmático y son secretados a través de la vía constitutiva de secreción (Welsch *et al.*, 2009). Típicamente, el retículo endoplasmático contiene sólo una pequeña fracción, menos del 1 % del colesterol celular (Lange *et al.*, 1999). En nuestros experimentos, los stocks de DENV fueron crecidos en células de mosquito C6/36. Las células de mosquito son auxótrofas al colesterol y contienen una baja cantidad de esteroides, sólo provistos por el suero bovino presente en el medio

de cultivo (Clayton, 1964; Krebs y Lan, 2003). Por lo tanto, el contenido de colesterol en los viriones de DENV crecidos en células de mosquito es muy bajo al compararlo con viriones crecidos en células Vero de mamífero y, concomitantemente, la concentración de MCD necesaria para producir un nivel de reducción similar de la infectividad es 10 veces mayor para aquellos viriones producidos en células Vero en relación a los propagados en C6/36 (dato no mostrado).

En el presente estudio estábamos interesados en comprender el mecanismo por el cual la interacción de la membrana lipídica viral con MCD afecta la infectividad viral. Como se demostró, ni la adsorción viral ni la internalización se vieron afectadas en los viriones inactivados en comparación con las partículas virales control, indicando que la interacción inicial de la glicoproteína E con el receptor celular no se vio afectada. En el mismo sentido, la estructura funcional de la proteína de envoltura viral requerida para la reactividad antigénica no pareció alterada en los viriones tratados como se determinó en un ensayo de *western blot* con Ac monoclonales.

Por el contrario, el paso de fusión que sigue entre la envoltura viral y la membrana endosomal parece estar impedido, bloqueando la salida de la nucleocápside a partir del endosoma observada en células infectadas con viriones sin tratar como consecuencia del desnudamiento viral. En consecuencia, la infección está totalmente inhibida, dada la falla en la síntesis de ARN y la expresión de proteínas virales en células infectadas con viriones tratados con MCD. La eliminación del colesterol de la envoltura mediante MCD también afecta el proceso de fusión del virus influenza (Sun and Whittaker, 2003). Todavía queda por establecer cómo es que el compuesto interactúa con la envoltura de la partícula viral de DENV para producir rearrreglos en la bicapa lipídica que afecten la fusión de las membranas celular y viral y bloqueen el escape endosomal de los viriones que ingresan.



CONCLUSIONES

La entrada primaria de DENV-2 y DENV-1 en las líneas celulares mieloides U937 y K562 en ausencia de Ac está mediada por una internalización dependiente de pH ácido, clatrina, dinamina y es independiente de la integridad de *lipid-rafts*.

El sistema de infección de DENV-2 en presencia de Ac, como modelo de aproximación al ADE *in vitro*, muestra una implicancia diferencial de los FcR involucrados en los sistemas de las líneas celulares U937 y K562 dependiente del isotipo del Ac. Mientras el Ac 3H5 implica una internalización solo mediada por FcγRIIA, el complejo de virus- Ac formado con el clon 2H2 puede ser internalizado tanto por el FcγRIIA como por el FcγRIA.

La vía de entrada de DENV-2 mediada por el FcγRIIA, en cualquiera de las dos líneas celulares elegidas, es dependiente de pH ácido y clatrina como sucede en ausencia de Ac. En este caso, además, existe una parcial dependencia de colesterol para alcanzar una infección productiva.

La entrada de DENV-2 con mayor implicancia del FcγRIA está mediada por un mecanismo de internalización viral dependiente de pH e independiente de clatrina y colesterol.

El carragenano-λ presenta una buena actividad antiviral frente a DENV-2 en ausencia de Ac en las líneas mieloides usadas en este trabajo. El tiempo de adición del compuesto muestra que, esta droga, impide tanto la adsorción como la internalización de los viriones de DENV-2 a las células. Por otro lado, también inhibe la entrada de DENV-2 en presencia de Ac cuando está mediada por FcγRIIA, pero no se observa susceptibilidad de DENV-2 cuando el sistema en estudio utiliza una entrada viral principalmente mediada por FcγRIA.

MCD tiene una importante actividad virucida contra los 4 serotipos de DENV.

La MCD extrae de forma eficiente el colesterol asociado a la envoltura viral de DENV-2. Ese efecto de la MCD es irreversible aunque puede contrarrestarse en presencia de SFB. La incubación de los viriones de DENV-2 con colesterol exógeno también mostró un alto efecto de inactivación sobre DENV-2.

El mecanismo de acción de la MCD no afecta la adsorción ni la internalización viral de DENV-2. Este compuesto actúa impidiendo la fusión de la membrana celular con la envoltura viral impidiendo que el genoma de DENV alcance el citoplasma para una infección productiva.

La estructura funcional de la proteína de envoltura viral de DENV-2 requerida para la reactividad antigénica no se mostró alterada en los viriones tratados con MCD.

Consideraciones finales

Con no poca preocupación ya he expresado que, a pesar de la creciente incidencia de DENV como patógeno humano, no existe vacuna o quimioterapia antiviral para la prevención o tratamiento de esta virosis.

El presente trabajo responde preguntas relacionadas a mecanismos y factores involucrados en los primeros pasos del ciclo viral en células representativas de la enfermedad y en la infección mediada por Ac. En relación a los estudios de entrada viral realizados, y en conjunto a los antecedentes de nuestro laboratorio, que han documentado un comportamiento antiviral diferencial de DENV dependiente de factores virales y celulares, reportando además vías de entrada alternativas para la internalización de los viriones de DENV, existen claras implicancias para el diseño de agentes quimioterapéuticos que pretendan utilizar la entrada viral como blanco. Por lo tanto, es necesario encontrar factores que sean comunes a las vías de internalización usadas por el virus para lograr el diseño de compuestos antivirales efectivos en todos los casos. Por otro lado, si bien se observó que la entrada viral también depende de los R γ Fc involucrados, todavía es necesario conocer la verdadera relevancia que esos receptores tienen en la enfermedad que DENV provoca. Finalmente, queda también por comprender el rol del receptor primario de DENV en la infección en presencia de Ac para saber si, las diferencias observadas en la entrada viral, pueden tenerlo siempre como último responsable de la internalización de los viriones en estas líneas celulares.

Aunque todavía queden muchas preguntas por responder, los conocimientos generados en este trabajo de tesis son, sin duda, un avance necesario para enfrentar esta enfermedad con cada vez mayor incidencia global.



BIBLIOGRAFÍA

Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. 2008a. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol.* 89(2):474-84.

Acosta EG, Talarico LB, Damonte EB. 2008b. Cell entry of dengue virus. *Future virol.* 3(5), 471- 479

Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. 2009. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol.* 11(10):1533-49.

Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. 2011. Infectious dengue-1 virus entry into mosquito C6/36 cells. *Virus Res.* 160(1-2):173-9.

Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. 2012. Differential requirements in endocytic trafficking for penetration of dengue virus. *PLoS One.* 7(9):e44835.

Acosta EG, Piccini LE, Talarico LB, Castilla V, Damonte EB. 2014. Changes in antiviral susceptibility to entry inhibitors and endocytic uptake of dengue-2 virus serially passaged in Vero or C6/36 cells. *Virus Res.* 184:39-43.

Aderem A, Underhill DM. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 17:593-623.

Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. 2008. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 82(12):5715-24.

Alhoot MA, Wang SM, Sekaran SD. 2011. Inhibition of dengue virus entry and multiplication into monocytes using RNA interference. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(11):e1410

Alhoot MA, Wang SM, Sekaran SD. 2012. RNA interference mediated inhibition of dengue virus multiplication and entry in HepG2 cells. *PLoS One.* 7(3):e34060.

Alvarez DE, Lodeiro MF, Filomatori CV, Fucito S, Mondotte JA, Gamarnik AV. 2006. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. *Novartis Found Symp.* 277:120-35.

Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. 1996. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell.* 11:1825-34.

Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz AC. 1997. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol.* 71(6):4226-32.

Ang F, Wong AP, Ng MM, Chu JJ. 2010. Small interference RNA profiling reveals the essential role of human membrane trafficking genes in mediating the infectious entry of dengue virus. *Virol J.* 1;7:24.

Appanna R, Wang SM, Ponnampalavanar SA, Lum LC, Sekaran SD. 2012. Cytokine factors present in dengue patient sera induces alterations of junctional proteins in human endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg.* 87(5):936-42.

Avilés, G.; Rangeon, G.; Baroni, P.; Paz, V.; Monteros, M.; Sartini, J. L.; Enria, D. 2000 Outbreak of Dengue-2 virus in Salta, Argentina, 1988. *Medicina (B Aires).* 60: 875-879.

Ayala-Nuñez NV, Jarupathirun P, Kaptein SJF, Neyts J, Smit JM. 2013. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection is inhibited by SA-17, a doxorubicin derivative. *Antiv Rese* 100(1): 238–245

- Barrow E, Nicola AV, Liu J. 2013. Multiscale perspectives of virus entry via endocytosis. *Virology* 5;10:177.
- Basu A, Chaturvedi UC. 2008. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 53(3):287-99.
- Bavari S, Bosio CM, Wiegand E, Ruthel G, Will AB, Geisbert TW, Hevey M, Schmaljohn C, Schmaljohn A, Aman MJ. 2002. Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med.* 195(5):593-602.
- Bantel-Schaal U, Hub B, Kartenbeck J. 2002. Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J. Virol.* 76:2340-49
- Bender, F.C., Whitbeck, J.C., Ponce, D.L., Lou, H., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H. 2003. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J. Virol.* 77, 9542-9552.
- Benmerah A, Lamaze C. Clathrin-coated pits: vive la différence? 2007. *Traffic.* 8(8):970-82.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 496(7446):504-7.
- Bielefeldt-Ohmann H. 1998. Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes. *Virus Res.* 57(1):63-79.
- Bishop NE. 1997. An Update on Non-clathrin-coated Endocytosis. *Rev Med Virol.* 7(4):199-209.
- Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, Tassaneeritthep B, Marovich MA. 2011. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.* 85(4):1671-83.
- Boonnak K, Slike BM, Donofrio GC, Marovich MA. 2013. Human FcγRII cytoplasmic domains differentially influence antibody-mediated dengue virus infection. *J Immunol.* 190(11):5659-65.
- Booth JW, Kim MK, Jankowski A, Schreiber AD, Grinstein S. 2002. Contrasting requirements for ubiquitylation during Fc receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *EMBO J.* 21(3):251-8.
- Bournazos S, Hart SP, Chamberlain LH, Glennie MJ, Dransfield I. 2009. Association of FcγRIIIa (CD32a) with lipid rafts regulates ligand binding activity. *J Immunol.* 182(12): 8026-36.
- Bremer, C.M., Bung, C., Kott, N., Hardt, M., Glebe, D. 2009. Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cell. Microbiol.* 11, 249-260.
- Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE 2001. Biological basket weaving: formation and function of clathrin coated vesicles. *An Rev Cell and Dev Bio.* 17, 517-568.
- Brown, E.L., Lyles, D.S. 2003. A novel method for analysis of membrane microdomains: vesicular stomatitis virus glycoprotein microdomains change in size during infection, and those outside of budding sites resemble sites of virus budding. *Virology* 310, 343-358.
- Bruhns P1, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daëron M. 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 113(16):3716-25.

Bulich R, Aaskov JG. 1992. Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies. *J Gen Virol.* 73 (11):2999-3003.

Burke DS, Monath TP. 2001. Flaviviruses. 1043 - 1125. In: Knipe DM., Howley PM. *Field's Virology Fourth Edition Volume 1.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia Pa.

Cameron AJ, McDonald KJ, Harnett MM, Allen JM. 2002. Differentiation of the human monocyte cell line, U937, with dibutyryl cyclicAMP induces the expression of the inhibitory Fc receptor, FcγRIIb. *Immunol Lett.* 83(3):171-9.

Cardosa MJ, Wang SM, Sum MS, Tio PH. 2002. Antibodies against prM protein distinguish between previous infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *BMC Microbiol.* 2:9.

Carr CM, Kim PS. 1993. A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell.* 73(4):823-32.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2013. <http://www.healthmap.org/dengue/en/>, <http://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>

Chan KR, Zhang SL, Tan HC, Chan YK, Chow A, Lim AP, Vasudevan SG, Hanson BJ, Ooi EE. 2011. Ligation of Fc gamma receptor IIB inhibits antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(30):12479-84

Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM. 2005. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science.* 308(5728):1643-5.

Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. 2007. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 88(2):365-75.

Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. 2000. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 28(3):183-8.

Chavez-Salinas S, Ceballos-Olvera I, Reyes-Del Valle J, Medina F, Del Angel RM. 2008. Heat shock effect upon dengue virus replication into U937 cells. *Virus Res.* 138(1-2):111-8

Chee H-Y, AbuBakar S. 2004. Identification of a 48 kDa tubulin or tubulin-like C6/36 mosquito cells protein that binds dengue virus 2 using mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 11-17

Chen RF, Yeh WT, Yang MY, Yang KD. 2001. A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 30(1):1-7.

Chen R, Vasilakis N. 2011. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses.* 3(9):1562-608.

Chen Y, Maguire T, Hileman RE et al. 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* 3, 866-871.

Chen YC, Wang SY, King CC. 1999. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J. Virol.* 73: 2650- 57.

- Chokephaibulkit K, Perng GC. 2013. Challenges for the formulation of a universal vaccine against dengue. *Exp Biol Med* (Maywood). 238(5):566-78.
- Chotiwan N, Roehrig JT, Schlesinger JJ, Blair CD, Huang CY. 2014. Molecular determinants of dengue virus 2 envelope protein important for virus entry in FcγRIIA-mediated antibody-dependent enhancement of infection. *Virology*. 456-457:238-46.
- Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH. 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res*. 38(11):2264-72.
- Clayton RB. 1964. The utilization of sterols by insects. *J. Lipid Res*. 15, 3-19.
- Clement C, Tiwari V, Scanlan PM, Valyi-Nagy T, Yue BY and Shukla D. 2006. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol* 174:1009–21
- Clemente R, de Parseval A, Perez M, de la Torre JC. 2009. Borna disease virus requires cholesterol in both cellular membrane and viral envelope for efficient cell entry. *J Virol*. 83(6):2655-62.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*. 80: 11418-31.
- Corver J, Ortiz A, Allison SL, Schlich J, Heinz FX, Wilschut J. 2000. Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology*. 269, 37-46.
- Côté M, Zheng YM, Liu SL. 2012. Membrane fusion and cell entry of XMRV are pH-independent and modulated by the envelope glycoprotein's cytoplasmic tail. *PLoS One*. 7(3):e33734.
- Cui J, Fu X, Xie J, Gao M, Hong M, Chen Y, Su S, Li S1. 2014. Critical role of cellular cholesterol in bovine rotavirus infection. *Virol J*. 11(1):98.
- Dai X, Jayapal M, Tay HK, Reghunathan R, Lin G, Too CT, Lim YT, Chan SH, Kemeny DM, Floto RA, Smith KG, Melendez AJ, MacAry PA. 2009. Differential signal transduction, membrane trafficking, and immune effector functions mediated by FcγRI versus FcγRIIa. *Blood*. 114(2):318-27.
- Dalrymple N, Mackow ER. 2011. Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *J Virol*. 85(18):9478-85.
- Damonte EB, Pujol CA, Coto CE. 2004. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Adv Virus Res*. 63:239-85.
- Das S, Chakraborty S, Basu A. 2010. Critical role of lipid rafts in virus entry and activation of phosphoinositide 3' kinase/Akt signaling during early stages of Japanese encephalitis virus infection in neural stem/progenitor cells. *J. Neurochem*. 115: 537-549.
- Daughaday CC, Brandt WE, McCown JM, Russell PK. 1981 Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun*. 32(2):469-73.
- Dautry-Varsat A. 1986. Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie*. 68(3):375-81.

- Davies PJ, Cornwell MM, Johnson JD, Reggianni A, Myers M, Murtaugh MP. 1984. Studies on the effects of dansylcadaverine and related compounds on receptor-mediated endocytosis in cultured cells. *Diabetes Care*. 7 Suppl 1:35-41.
- Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ. 2006. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*. 368(9530):170-3.
- Della-Porta AJ, Westaway EG. 1978. A multi-hit model for the neutralization of animal viruses. *J Gen Virol*. 38(1):1-19.
- Desplanques AS, Nauwynck HJ, Vercauteren D, Geens T, Favoreel HW. 2008. Plasma membrane cholesterol is required for efficient pseudorabies virus entry. *Virology*. 376(2):339-45.
- Desplanques AS, Pontes M, De Corte N, Verheyen N, Nauwynck HJ, Vercauteren D, Favoreel HW. 2010. Cholesterol depletion affects infectivity and stability of pseudorabies virus. *Virus Res*. 152(1-2):180-3.
- Dowd KA, Pierson TC. 2011. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. *Virology*. 411(2):306-15.
- Dulbecco R, Vogt M, Strickland AG. 1956. A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus. *Virology*. 2(2):162-205.
- Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH. 2012. Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses*. 4(5):800-32.
- Esko JD, Selleck SB. 2002. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem*. 71:435-71.
- Funk A, Mhamdi M, Hohenberg H, Heeren J, Reimer R, Lambert C, Prange R, Sirma H. 2008. Duck hepatitis B virus requires cholesterol for endosomal escape during virus entry. *J Virol*. 82(21):10532-42.
- García-García E, Brown EJ, Rosales C. 2007. Transmembrane mutations to FcγRIIIA alter its association with lipid rafts: implications for receptor signaling. *J Immunol*. 178(5):3048-58.
- Germi R, Crance JM, Garin D et al. 2002. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 292: 162-68.
- Ghigo, E., Kartenbeck, J., Lien, P., Pelkmans, L., Capo, C., Mege, J.L., and Raoult, D. 2008. Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. *PLoS Pathog* 4:e100008
- Glomb-Reinmund S, Kielian M. 1998. The role of low pH and disulfide shuffling in the entry and fusion of Semliki Forest virus and Sindbis virus. *Virology*. 248:372-81
- Gollins, S.W.; Porterfield, J.S. 1986. pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes. *J. Gen. Virol*. 67: 157-66.
- Gómez-Dantés H, Willoquet JR. 2009. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. *Cad Saude Publica*. 25 Suppl 1:S19-31.
- Goodridge HS, Underhill DM, Touret N. 2012. Mechanisms of Fc receptor and dectin-1 activation for phagocytosis. *Traffic*. 13(8):1062-71.

Graham DR, Chertova E, Hilburn JM, Arthur LO, Hildreth JE. 2003. Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. *J Virol.* 77(15):8237-48.

Green S, Rothman A. 2006. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.* 19(5):429-36.

Gubler DJ. 2006. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp.* 277:3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-3.

Guirakhoo F, Hunt AR, Lewis JG, Roehrig JT. 1993. Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH. *Virology.* 194(1):219-23.

Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. 2013. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol.* 158(7):1445-59.

Hafer A, Whittlesey R, Brown DT, Hernandez R. 2009. Differential incorporation of cholesterol by Sindbis virus grown in mammalian or insect cells. *J. Virol.* 83, 9113-9121.

Halstead SB. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med.* 42(5):350-62.

Halstead SB, O'Rourke EJ. 1977a. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* 265:739-741.

Halstead SB, O'Rourke EJ. 1977b. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146:201-21

Halstead SB, Lan NT, Myint TT, Shwe TN, Nisalak A, Kalyanarooj S, Nimmannitya S, Soegijanto S, Vaughn DW, Endy TP. 2002. Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. *Emerg Infect Dis.* 8(12):1474-79.

Halstead SB. 2006. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica.* 20(6):407-15.

Hambleton S, Steinberg SP, Gershon MD, Gershon AA. 2007. Cholesterol dependence of varicella-zoster virion entry into target cells. *J Virol.* 81(14):7548-58.

Harris E, Holden KL, Edgil D, Polacek C, Clyde K. 2006. Molecular biology of flaviviruses. *Novartis Found Symp.* 277:23-39; discussion 40, 71-3, 251-3.

Harrison SC. 2008. The pH sensor for flavivirus membrane fusion. *J Cell Biol.* 183(2):177-9.

Hase T, Summers PL, Eckels KH. 1989. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch Virol.* 104(1-2):129-43.

Helenius A, Kartenbeck J, Simons K, Fries E. 1980. On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol.* 84(2):404-20.

Heuser J. 1980. Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol.* 84(3):560-83.

- Hidari, K.I., Takahashi, N., Arihara, M., Nagaoka, M., Morita, K., Suzuki, T., 2008. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376: 91-95.
- Hilgard P, Stockert R. 2000. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology.* 32: 1069-77.
- Hirano M, Davis RS, Fine WD, Nakamura S, Shimizu K, Yagi H, Kato K, Stephan RP, Cooper MD. 2007 IgE immune complexes activate macrophages through FcγR4 binding. *Nat Immunol.* 8:762–71
- Hogle JM. 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol.* 56: 677-702.
- Hopkins CR, Trowbridge IS. 1983. Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol.* 97(2):508-21.
- Huang ZY, Barreda DR, Worth RG, Indik ZK, Kim MK, Chien P, Schreiber AD. 2006. Differential kinase requirements in human and mouse FcγR3 phagocytosis and endocytosis. *J Leukoc Biol.* 80(6):1553-62.
- Hulett, M. D., P. M. Hogarth. 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv. Immunol.* 57:1-127.
- Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL, King CC. 1999 Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology.* 257(1):156-67
- Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T. 2006. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 25(4):683-92
- Ichiyama K, Gopala Reddy SB, Zhang LF, Chin WX, Muschin T *et al.* 2013. Sulfated polysaccharide, curdlan sulfate, efficiently prevents entry/fusion and restricts antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro: a possible candidate for clinical application. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(4):e2188.
- Ilanguvaran S, Hoessli DC. 1998. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J.* 335(Pt 2):433-40.
- Imhoff, H., von Messling, V., Herrler, G., Haas, L. 2007. Canine distemper virus infection requires cholesterol in the viral envelope. *J. Virol.* 81: 4158-4165.
- Jindadamrongwech S, Theparit C, Smith DR. 2004. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch. Virol.* 149: 915-927.
- Johannsdottir HK, Mancini R, Kartenbeck J, Amato L, Helenius A. 2009. Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry. *J. Virol.* 83:440–53
- Jones AT. 2007. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med.* 11(4):670-84.
- Kaptein SJF, De Burghgraeve T, Froeyen M, Pastorino B, Alen MMF, Mondotte JA, Herdewijn P, Jacobs M, de Lamballerie X, Schols D, Gamarnik AV, Sztaricskai F, Neyts J. 2010. A derivative of the antibiotic doxorubicin is a selective inhibitor of dengue and yellow fever virus replication in vitro. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 54: 5269-5280.

Kato D, Era S, Watanabe I, Arihara M, Sugiura N, Kimata K, Suzuki Y, Morita K, Hidari KI, Suzuki T. 2010. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. *Antiviral Res.* 88, 236–243

Kaufmann B, Rossmann MG. 2011. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect.* 13(1):1-9.

Kerr MC, Teasdale RD. 2009. Defining macropinocytosis. *Traffic.* 10(4):364-71.

Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. 1988. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg.* 38(2):411-19.

Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. 1989. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 40(4):444-51.

Kontny U, Kurane I, Ennis FA. 1988. Gamma interferon augments Fc gamma receptor-mediated dengue virus infection of human monocytic cells. *J Virol.* 62(11):3928-33.

Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WW, Rose RC, Schlesinger JJ, Jin X. 2008. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol.* 80(1):134-46.

Kourí G, Guzmán MG, Bravo J. 1986. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bull Pan Am Health Organ.* 20(1):24-30.

Krebs KC, Lan Q. 2003. Isolation and expression of a sterol carrier protein-2 gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 12, 51-60.

Krishnan MN, Sukumaran B, Pal U, Agaisse H, Murray JL, Hodge TW, Fikrig E. 2007. Rab5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *J. Virol.* 81: 4881-85

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 108(5):717-25.

Kwan WH, Helt AM, Maranon C, Barbaroux JB, Hosmalin A, et al. 2005. Dendritic cell precursors are permissive to dengue virus and human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 79: 7291–99

Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. 2010. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 4(5):e646.

Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck TL. 1999. Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J. Lipid Res.* 2264-2270.

Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald K, Monks BG, Kurt-Jones E, Golenbock DT y Espevik T. 2002. LPS rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the TLR4/MD-2/CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J. Biol. Chem.* 277: 47834–43

Lee CJ, Lin HR, Liao CL, Lin YL. 2008. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J Virol.* 82: 6470- 80.

Lee E, Lobigs M. 2000. Substitutions at the putative receptor-binding site of an encephalitis flavivirus alter virulence and host cell tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry. *J. Virol.* 74, 8867–8875.

- Lee E, Lobigs M. 2002. Mechanism of virulence attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis virus and Murray Valley encephalitis virus. *J. Virol.* 76, 4901–4911.
- Lee RC, Hapuarachchi HC, Chen KC, Hussain KM, Chen H, Low SL, Ng LC, Lin R, Ng MM, Chu JJ. 2013. Mosquito cellular factors and functions in mediating the infectious entry of chikungunya virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(2):e2050.
- Lejeune M, Moreau F, Chadee K. 2011. Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* signals via EP4 receptor and alters claudin-4 to increase ion permeability of tight junctions. *Am J Pathol.* 179(2):807-18.
- Liao Z, Graham DR, Hildreth JE. 2003. Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 19(8):675-87.
- Lim HY, Ng ML. 1999. A different mode of entry by dengue-2 neutralisation escape mutant virus. *Arch Virol.* 144(5):989-95.
- Lim SP, Wang QY, Noble CG, Chen YL, Dong H, Zou B, Yokokawa F, Nilar S, Smith P, Beer D, Lescar J, Shi PY. 2013. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral Res.* 100(2):500-19.
- Lindenbach, BD y Rice, CM. 2001. Flaviviridae: the viruses and their replication. En: Knipe, DM, Howley, PM, *Fundamental Virology.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 589-639.
- Littaua R, Kurane I, Ennis FA. 1990. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol.* 144(8):3183-86.
- Lopez, S y Arias, C. 2010. How Viruses Hijack Endocytic Machinery. *Nature Education* 3(9):16
- Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. 2006. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J. Virol.* 80:1361–66
- Lu X, Xiong Y, Silver J. 2002. Asymmetric requirement for cholesterol in receptor-bearing but not envelope-bearing membranes for fusion mediated by ecotropic murine leukemia virus. *J Virol.* 76(13):6701-09.
- Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell.* 10(6):839-50.
- Mady BJ, Erbe DV, Kurane I, Fanger MW, Ennis FA. 1991. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection mediated by bispecific antibodies against cell surface molecules other than Fc gamma receptors. *J Immunol.* 147(9):3139-44.
- Mady BJ, Kurane I, Erbe DV, Fanger MW, Ennis FA. 1993. Neuraminidase augments Fc gamma receptor II-mediated antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol.* 74 (5):839-44.
- Mandl CW, Kroschewski H, Allison SL, Kofler R, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX. 2001. Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo. *J. Virol.* 75, 5627–5637.
- Margheri G, D'Agostino R, Trigari S, Sottini S, Del Rosso M. 2014. The β -Subunit of Cholera Toxin has a High Affinity for Ganglioside GM1 Embedded into Solid Supported Lipid Membranes with a Lipid Raft-Like Composition. *Lipids.* 49(2):203-6.
- Marsh M, Helenius A. 2006. Virus entry: open sesame. *Cell.* 124(4):729-40.

- Martín JJ, Holguera J, Sánchez-Felipe L, Villar E, Muñoz-Barroso I. 2012. Cholesterol dependence of Newcastle Disease Virus entry. *Biochim Biophys Acta*. 1818(3):753-61.
- Martínez-Gutiérrez M, Castellanos JE, Gallego-Gómez JC. 2011. Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology*. 54(4):202-16.
- Masuh, E. 2008. Re-emergence of dengue in Argentina: Historical development and future challenges. *Dengue Bulletin* 32: 44-54.
- Matsuda S, Gidlund M, Chiodi F, Cafaro A, Nygren A, Morein B, Nilsson K, Fenyö EM, Wigzell H. 1989. Enhancement of human immunodeficiency virus (HIV) replication in human monocytes by low titres of anti-HIV antibodies in vitro. *Scand J Immunol*. 30(4):425-34.
- Mayor S, Pagano RE. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 8:603–12
- McClure MO, Marsh M, Weiss RA. 1988. Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *EMBO J*. 7(2):513-18.
- Medigeshi GR, Hirsch AJ, Streblov DN, Nikolich-Zugich J, Nelson JA. 2008. West Nile virus entry requires cholesterol-rich membrane microdomains and is independent of alphavbeta3 integrin. *J. Virol*. 82: 5212- 19.
- Meertens L, Bertaux C, Dragic T. 2006. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J. Virol*. 80:11571–78
- Melendez AJ, Tay HK. 2008. Phagocytosis: a repertoire of receptors and Ca(2+) as a key second messenger. *Biosci Rep*. 28(5):287-98.
- Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. 2010. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 79:803-33.
- Miller S y Krijnse-Locker J. 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol*. 6: 363-74
- Milne RS, Nicola AV, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH. 2005. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 79(11):6655-63.
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. 2015. <http://www.msal.gov.ar/dengue/>
- Mizzen L, Hilton A, Cheley S, Anderson R. 1985. Attenuation of murine coronavirus infection by ammonium chloride. *Virology*. 142(2):378-88.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. 2003. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci*. 100(12):6986-91.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 427(6972):313-19.
- Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. 2011. Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using FcγR-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. *J Clin Virol*. 52(3):225-30.
- Monath TP. 1994. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci*. 91: 2395-2400.

Moore NF, Patzer EJ, Shaw JM, Thompson TE, Wagner RR. 1978. Interaction of vesicular stomatitis virus with lipid vesicles: depletion of cholesterol and effect on virion membranes. *J. Virol.* 27: 320-29.

Moreno-Altamirano MMB, Sánchez-García FJ, Muñoz ML 2002. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J. Gen. Virol.* 83: 1123-30.

Morens DM, Halstead SB. 1990. Measurement of antibody-dependent infection enhancement of four dengue virus serotypes by monoclonal and polyclonal antibodies. *J Gen Virol.* 71 (12):2909-14.

Mori S, Takeuchi T, Kanda T. 2008. Antibody-dependent enhancement of adeno-associated virus infection of human monocytic cell lines. *Virology.* 375(1):141-47.

Mosso C, Galván-Mendoza IJ, Ludert JE, del Angel RM. 2008. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology.* 378(1):193-99.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 3(1):13-22.

Nakayama E, Tomabechi D, Matsuno K, Kishida N, Yoshida R, Feldmann H, Takada A. 2011. Antibody-dependent enhancement of Marburg virus infection. *J Infect Dis.* 204 Suppl 3:S978-85.

Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A *et al.* 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 4:723-28.

Nicholson CO, Costin JM, Rowe DK, Lin L, Jenwitheesuk E, Samudrala R, Isern S, Michael SF. 2011. Viral entry inhibitors block dengue antibody-dependent enhancement in vitro. *Antiviral Res.* 89(1):71-4.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2005. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science.* 310(5753):1510-12.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24:19–28

Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8(1):34-47.

Nossal R. 2001. Energetics of clathrin basket assembly. *Traffic.* 2(2):138-47.

Organización Mundial de la Salud. 2010. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>

Orlandi PA, Fishman PH. 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol.* 141(4):905-15.

Palmgren MG. 1991. Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. *Anal Biochem.* 192(2):316-21.

Pedroso de Lima MC, Ramalho-Santos J, Martins MF, Pato de Carvalho A, Bairos V, Nir S. 1992. Kinetic modeling of Sendai virus fusion with PC-12 cells. Effect of pH and temperature on fusion and viral inactivation. *Eur J Biochem.* 205(1):181-6.

Pelkmans L. 2005. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim Biophys Acta.* 1746(3):295-304.

- Pelkmans L, Fava E, Grabner H, Hannus M, Habermann B, Krausz E, Zerial M. 2005. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*. 436(7047):78-86.
- Peng T, Wang JL, Chen W, Zhang JL, Gao N, Chen ZT, Xu XF, Fan DY, An J. 2009. Entry of dengue virus serotype 2 into ECV304 cells depends on clathrin-dependent endocytosis, but not on caveolae-dependent endocytosis. *Can J Microbiol*. 55(2):139-45.
- Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. 2008. Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res*. 80(1): 11–22
- Pierson TC, Xu Q, Nelson S, Oliphant T, Nybakken GE, Fremont DH, Diamond MS. 2007. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. *Cell Host Microbe*. 1(2):135-45.
- Pierson TC, Fremont DH, Kuhn RJ, Diamond MS. 2008. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. *Cell Host Microbe*. 4(3):229-38.
- Pierson TC, Diamond MS. 2008. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev Mol Med*. 10:e12.
- Pierson TC, Kielian M. 2013. Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin Virol*. 3(1):3-12.
- Pietiäinen, V.; Marjomäki, V.; Upla, P.; Pelkmans, L.; Helenius, A.; Hyypiä, T. 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol Biol Cell*. 15: 4911-2495
- Poh MK, Shui G, Xie X, Shi PY, Wenk MR, Gu F. 2012. U18666A, an intra-cellular cholesterol transport inhibitor, inhibits dengue virus entry and replication. *Antiviral Res*. 93(1):191-8.
- Puerta-Guardo H, Mosso C, Medina F, Liprandi F, Ludert JE, del Angel RM. 2010. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *J Gen Virol*. 91(2):394-403.
- Puerta-Guardo H, Raya-Sandino A, González-Mariscal L, Rosales VH, Ayala-Dávila J, Chávez-Mungía B, Martínez-Fong D, Medina F, Ludert JE, del Angel RM. 2013. The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability. *J Virol*. 87(13):7486-501.
- Quirin K, Eschli B, Scheu I, Poort L, Kartenbeck J, Helenius A. 2008. Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. *Virology*. 378:21–33
- Raghu H, Sharma-Walia N, Veettil MV, Sadagopan S and Chandran B. 2009. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Utilizes an Actin Polymerization-Dependent Macropinocytic Pathway To Enter Human Dermal Microvascular Endothelial and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *J. Virol*. 83 (10) 4895-4911
- Rajapakse S. 2011. Dengue shock. *J Emerg Trauma Shock*. 4(1):120-27.
- Randolph VB, Stollar V. 1990. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J Gen Virol*. 71(8):1845-50.
- Ravetch JV, Kinet JP. 1991. Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 9:457-92.

- Ren X, Glende J, Yin J, Schwegmann-Wessels C, Herrler G. 2008. Importance of cholesterol for infection of cells by transmissible gastroenteritis virus. *Virus Res.* 137: 220-224.
- Ren X, Yin J, Li G, Herrler G. 2011. Cholesterol dependence of pseudorabies herpesvirus entry. *Curr Microbiol.* 62(1):261-6.
- Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. 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.
- Robinson MS. 2004. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol.* 14(4):167-74.
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell.* 10(4):961-74.
- Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei HY, Wilschut J, Smit JM. 2010a. Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS Pathog.* 6(1):e1000718.
- Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. 2010b. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.* 67(16):2773-86.
- Rodrigo WW, Jin X, Blackley SD, Rose RC, Schlesinger JJ. 2006. Differential enhancement of dengue virus immune complex infectivity mediated by signaling-competent and signaling-incompetent human FcγRIIA (CD64) or FcγRIIA (CD32). *J Virol.* 80(20):10128-38.
- Rothwell SW, Putnak R, La Russa VF. 1996. Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. *Am J Trop Med Hyg.* 54(5):503-10.
- Rothwell C, Lebreton A, Young Ng C, Lim JY, Liu W, Vasudevan S, Labow M, Gu F, Gaitner LA. 2009. Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology.* 389(1-2):8-19.
- Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X. 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:567-73
- Salas-Benito J, Reyes-Del Valle J, Salas-Benito M, Ceballos-Olvera I, Mosso C, del Angel RM. 2007. Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77: 283-290.
- Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV. 2009. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* 5: e1000632
- Sánchez-San Martín C, López T, Arias CF, López S. 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* 78:2310-18
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. 1984. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol.* 120(5):653-69.
- Scheiffele P, Rietveld A, Wilk T, Simons K. 1999. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 274: 2038-44.

- Schlegel R, Dickson RB, Willingham MC y Pastan IH. 1982. Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin. *Proc Natl Acad Sci.* 79(7): 2291–95.
- Schlie K, Maisa A, Lennartz F, Ströher U, Garten W, Strecker T. 2010. Characterization of Lassa virus glycoprotein oligomerization and influence of cholesterol on virus replication. *J Virol.* 84(2):983-92.
- Seijo A, Romer Y, Espinosa M, Monroig J, Giamperetti S, Ameri D, Antonelli, LG. 2009. Brote de dengue autóctono en el Área Metropolitana de Buenos Aires: Experiencia del Hospital de Enfermedades Infecciosas F. J. Muñiz. *Medicina (B Aires).* 69: 593-600.
- Silva MC, Guerrero-Plata A, Gilfoy FD, Garofalo RP, Mason PW. 2007. Differential activation of human monocyte-derived and plasmacytoid dendritic cells by West Nile virus generated in different host cells. *J Virol.* 81(24):13640-48.
- Simmons CP, Chau TN, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Thien NT, Lien le B, Quy NT, Hieu NT, Hien TT, McElnea C, Young P, Whitehead S, Hung NT, Farrar J. 2007. Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. *J Infect Dis.* 196(3):416-24.
- Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen vV, Wills B. 2012. Dengue. *N Engl J Med.* 366(15):1423-32.
- Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, and Wilschut J. 2011. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses.* 3(2): 160–171.
- Snyers L, Zwickl H, Blaas D. 2003. Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 77:5360–69
- Soto-Acosta R, Mosso C, Cervantes-Salazar M, Puerta-Guardo H, Medina F, Favari L, Ludert JE, del Angel RM. 2013. The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology.* 442(2):132-47.
- Sousa Jr. IP, Carvalho CAM, Ferreira DF, Weissmuller G, Rocha GM, Silva JL, Gomes AMO. 2011. Envelope lipid-packing as a critical factor for the biological activity and stability of alphavirus particles isolated from mammalian and mosquito cells. *J. Biol.Chem.* 286, 1730-1736
- Spoden G, Freitag K, Husmann M, Boller K, Sapp M, Lambert C, Florin L. 2008. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16—involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS ONE.* 3:e3313
- St Vincent MR, Colpitts CC, Ustinov AV, Muqadas M, Joyce MA, Barsby NL, Epanand RF, Epanand RM, Khramyshev SA, Valueva OA, Korshun VA, Tyrrell DL, Schang LM. 2010. Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses. *Proc Natl Acad Sci.* 107(40):17339-44.
- Stiasny K.; Koessl C.; Heinz F.X. 2003. Involvement of lipids in different steps of the flavivirus fusion mechanism. *J. Virol.* 77: 7856-7862.
- Stiasny K, Fritz R, Pangerl K, Heinz FX. 2011. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids.* 41(5):1159-63.
- Su CM, Liao CL, Lee YL, Lin YL. 2001. Highly sulfated forms of heparin sulfate are involved in Japanese encephalitis virus infection. *Virology,* 286, 206–215

- Suhrbier A, La Linn M. 2003. Suppression of antiviral responses by antibody-dependent enhancement of macrophage infection. *Trends Immunol.* 24(4):165-8.
- Suikkanen S, Saajarvi K, Hirsimaki J, Valilehto O, Reunanen H, Vihinen-Ranta M, Vuento M. 2002. Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J. Virol.* 76:4401-11
- Sun X, Whittaker GR. 2003. Role for influenza virus envelope cholesterol in virus entry and infection. *J. Virol.* 77: 12543-51.
- Swanson JA. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(8):639-49.
- Takada A, Ebihara H, Feldmann H, Geisbert TW, Kawaoka Y. 2007. Epitopes required for antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. *J Infect Dis.* 196 Suppl 2:S347-56.
- Takeda A, Sweet RW y Ennis FA. 1990. Two receptors are required for antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection: CD4 and Fc gamma R. *J Virol.* 64(11): 5605-5610.
- Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RG, Faria PC, Nosedá MD, Duarte ME, Damonte EB. 2005. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Res.* 66:103-10.
- Talarico LB, Damonte EB. 2007. Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. *Virology* 363: 473-85.
- Talarico LB, Duarte ME, Zibetti RG, Nosedá MD, Damonte EB. 2007. An algal-derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection. *Planta Med.* 73(14):1464-8.
- Tamura M, Webster RG, Ennis FA. 1991. Antibodies to HA and NA augment uptake of influenza A viruses into cells via Fc receptor entry. *Virology.* 182(1):211-9.
- Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, Matsuura Y. 2010. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* 84: 2798-807.
- Tapia-Conyer R, Betancourt-Cravioto M, Méndez-Galván J. 2012 Dengue: an escalating public health problem in Latin America. *Paediatr Int Child Health.* 32(1):14-7.
- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A et al. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197: 823-829.
- Teissier E, Pécheur EI. 2007. Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins. *Eur Biophys J.* 36(8):887-99.
- Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, Aye KM, Aaskov J. 1997. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 56(5):566-72.
- Thorley JA, McKeating JA, Rappoport JZ. 2010. Mechanisms of viral entry: sneaking in the front door. *Protoplasma.* 244(1-4):15-24.
- Thorp EB, Gallagher TM. 2004. Requirements for CEACAMs and cholesterol during murine coronavirus cell entry. *J Virol.* 78(6):2682-92.
- Torres JR, Castro J. 2007. The health and economic impact of dengue in Latin America. *Cad Saude Publica.* 23 Suppl 1:S23-31.

- Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL, Rapoport TA. 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J.* 22:4346–55
- Tse SM, Furuya W, Gold E, Schreiber AD, Sandvig K, Inman RD, Grinstein S. 2003. Differential role of actin, clathrin, and dynamin in Fc gamma receptor-mediated endocytosis and phagocytosis. *J Biol Chem.* 278(5):3331-8
- Ubol S, Phuklia W, Kalayanarooj S, Modhiran N. 2010. Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. *J. Infect. Dis.* 201 (6), 923–935
- Umashankar M, Sanchez-San MC, Liao M, Reilly B, Guo A, Taylor G, Kielian M. 2008. Differential cholesterol binding by class II fusion proteins determines membrane fusion properties. *J. Virol.* 82: 9245-53.
- van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* 4(12):e1000244.
- van der Schaar HM, Wilschut JC, Smit JM. 2009. Role of antibodies in controlling dengue virus infection. *Immunobiology.* 214(7):613-29. Hipótesis entrada dengue con anticuerpos!
- Vasselon T, Hailman E, Thieringer R y Detmers PA. 1999. Internalization of monomeric lipopolysaccharide occurs after transfer out of cell surface CD14. *J. Exp. Med.* 190: 509–21
- Vezzani D, Carbajo AE. 2008. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103: 66-74.
- Vieth JA, Kim MK, Pan XQ, Schreiber AD, Worth RG. 2010. Differential requirement of lipid rafts for FcγRIIA mediated effector activities. *Cell Immunol.* 265(2):111-9.
- Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol.* 123(5):1107-17.
- Weissmann G, Sessa G. 1967. The action of polyene antibiotics on phospholipid-cholesterol structures. *J Biol Chem.* 242(4):616-25.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A *et al.* 2009. Composition and Three- Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microb.* 5: 365-75
- White J, Kartenbeck J, Helenius A. 1980. Fusion of Semliki forest virus with the plasma membrane can be induced by low pH. *J Cell Biol.* 87(1):264-72.
- Whitehorn J, Farrar J. 2011. Dengue. *Clin Med.* 11(5):483-7.
- Whitehorn J, Simmons CP. 2011. The pathogenesis of dengue. *Vaccine.* 29(42):7221-8.
- World Health Organization (WHO). 2009. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W *et al.* 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 6(7):816-20.
- Yacoub S, Mongkolsapaya J, Screaton G. 2013. The pathogenesis of dengue. *Curr Op Infect Dis.* 26(3):284-9.

- Yamanaka A, Kosugi S, Konishi E. 2008. Infection-enhancing and -neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *J Virol.* 82(2):927-37.
- Yamauchi Y, Helenius A. 2013. Virus entry at a glance. *J Cell Sci.* 126(6):1289-95.
- Yin J, Glende J, Schwegmann-Wessels C, Enjuanes L, Herrler G, Ren X. 2010. Cholesterol is important for a post-adsorption step in the entry process of transmissible gastroenteritis virus. *Antiviral Res.* 88: 311-316.
- Yip MS, Leung NH, Cheung CY, Li PH, Lee HH, Daëron M, Peiris JS, Bruzzone R, Jaume M. 2014. Antibody-dependent infection of human macrophages by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Viol J.* 11:82.
- Yoshimura A, Kuroda K, Kawasaki K, Yamashina S, Maeda T, Ohnishi S. 1982. Infectious cell entry mechanism of influenza virus. *J Virol.* 43(1):284-93.
- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. 2008. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.* 319: 1834-37.
- Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC. 2011. CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor. *Cell* 147, 868–880
- Zaremba S, Keen JH. 1983. Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J Cell Biol.* 97(5 Pt 1):1339-47.
- Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2004. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure.* 12(9):1607-18.
- Zhu YZ, Xu QQ, Wu DG, Ren H, Zhao P, Lao WG, Wang Y, Tao QY, Qian XJ, Wei YH, Cao MM, Qi ZT. 2012. Japanese encephalitis virus enters rat neuroblastoma cells via a pH-dependent, dynamin and caveola-mediated endocytosis pathway. *J Virol.* 86(24):13407-22.
- Zidovetzki R, Levitan I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta.* 1768(6):1311-24.
- Zompi S; Harris E. 2012. Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses.* 4(1): 62–82.
- Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. 2008. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J Gen Virol.* 89: 3047-51.