

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR

**“Estudio de la ruta de entrada del virus dengue
en líneas celulares monocíticas”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. Jael Miranda Guzmán

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

en la especialidad en

Infectómica y Patogénesis Molecular

Director de Tesis:

Dr. Juan Ernesto Ludert León

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 8 de Virología del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV-IPN), Unidad Zacatenco, bajo la tutoría del Dr. Juan Ernesto Ludert León y la asesoría de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres y de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca con el número de registro 262817 y del proyecto CONACyT con número 103783 otorgado al Dr. Juan Ernesto Ludert León.

DEDICATORIA

A mi hija Merari por hacer que mis metas cumplidas sean más valiosas. Porque al tenerla presente se ha convertido en mi puerto seguro y una columna fundamental en la toma de decisiones. Por su incondicional amor y aliento. Por su eterna confianza y tolerancia. Por su sonrisa y fortaleza.

A mi madre Trini por su siempre generoso apoyo. Por sus palabras, por su grandeza y humildad.

A mi hermana Arely por su dadivosidad, apoyo y cariño.

A mi sobrina Amaya por alegrarnos con su candidez y espontaneidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Ernesto Ludert por su guía, tolerancia, motivación y confianza. Así como por permitirme trabajar bajo su dirección y experiencia.

A la Dra. Rosa María del Ángel por permitirme trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Ana Lorena por sus siempre alentadoras palabras. Por su grata presencia y su confianza.

Al Dr. Sergio Isaac de la Cruz por sus invaluable consejos y apoyo, tanto afectivo como técnico. Gracias por tu amistad.

Al Dr. Pedro Luna y a Ravi, por su generoso apoyo con material, equipo y asesoría; además de sus amables sonrisas que hicieron grato mi paso por su laboratorio.

A Fernando Medina por su apoyo y consejos en el cultivo de las líneas celulares.

A Henry Puerta por compartir sus conocimientos y alegría.

A Ana, Humberto, Liliana, Cinthia, Rebeca, Salomé, Clemente y demás compañeros de laboratorio que hicieron especial mi estancia en él.

A los doctores que con sus palabras amenizaron mi estancia en el departamento. Por darme su confianza que me apoyó en los momentos de flaqueza.

A las secretarias Irma, Clarita y Marcela, por su amable disposición.

A mis compañeros del departamento y del CINVESTAV, que con su generosa contribución me ayudaron a lograr mis objetivos.

A mis amigos Israel y Gerardo por escucharme, apoyarme y alentarme incansablemente.

A mis amigos de artes marciales por enseñarme que nuestra fortaleza está en ser un grupo, ser amigos, acompañarnos y apoyarnos en el camino del aprendizaje. Gracias Sergio (Flintstone), Dany, Mario, Mauro, Mario, Juan, Gaby, Eder, Ernesto, Sergio, César, Naye y el resto de los chicos y chicas.

A Jorge por su grata compañía.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Abreviaturas	VI
Lista de Figuras y Tablas	XI
Resumen	XIII
Abstract	XIV
1. Introducción	1
1.1. Epidemiología	1
1.2. Situación actual del dengue	3
1.3. Transmisión y propagación del virus	6
1.4. Clasificación y manifestaciones clínicas del dengue	7
1.5. Inmunidad al virus dengue	9
1.6. Virus dengue	10
2. Antecedentes directos	13
2.1. Ciclo replicativo del virus dengue	13
2.2. Receptores para el virus dengue	14
2.3. Línea celular U937	17
2.4. Receptores para el virus dengue descritos en monocitos y macrófagos	17
2.5. Infección por DENV en células THP-1 y U937 expresando DC-SIGN	19
2.6. Vías de entrada del virus dengue	20
2.7. Entrada del virus dengue en monocitos	23
2.8. Tránsito del virus dengue dentro de la célula	24
2.9. Importancia de los macrófagos en la infección por virus dengue	24
3. Justificación	27
4. Hipótesis	27
5. Objetivos	27
5.1. Objetivo general	27
5.2. Objetivos particulares	27
6. Materiales y métodos	28
6.1. Cultivos celulares	28
6.2. Propagación y titulación viral	28
6.3. Compuestos inhibidores y anticuerpos	29

6.4. Ensayos de viabilidad celular luego del tratamiento con compuestos inhibidores	30
6.5. Ensayos de determinación del efecto de los compuestos inhibidores en las líneas celulares U937 y U937-DC-SIGN	30
6.6. Ensayos de inhibición de la entrada viral por uso de compuestos inhibidores y anticuerpos contra HSP70 y HSP90	31
6.7. Extracción de RNA viral	32
6.8. Ensayos de RT-PCR en tiempo real	32
6.9. Curva estándar de correlación entre Cq y UFP/mL	33
6.10. Determinación de la presencia del antígeno NS1 del virus dengue por ELISA	35
6.11. Ensayos de determinación de co-localización de la proteína E del virus dengue con Rab5 y Rab7 en la línea celular U937-DC-SIGN.	37
6.12. Análisis estadístico	37
7. Resultados	38
7.1. El tratamiento con PMA por 48 h y 24 h de reposo induce la diferenciación de las células U937 y U937-DC-SIGN	38
7.2. HSP70 y HSP90 participan en la infección por DENV4 a células U937 y U937-DC-SIGN	39
7.3. El DENV4 utiliza la vía de entrada mediada por clatrina y un pH ácido para su internalización en células U937 y U937-DC-SIGN	42
7.4. El virus dengue es transportado a través de endosomas tempranos a tardíos en células U937-DC-SIGN.	53
8. Discusión	57
9. Conclusiones	65
10. Perspectivas	66
11. Bibliografía	67
12. Anexos	83
12.1 Anexo 1	83

ABREVIATURAS

a. a.	Animoácido
A-555	Alexa 555
AC	Adenina-Citosina
ADE	Antibody-dependent enhancement - facilitación inmunológica mediada por anticuerpos
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
Ag	Antígeno
BHK-21	Baby hamster kidney - Fibroblastos de riñón de hámster
BHQ	Black Hole Quencher®
C	Proteína de cápside del virus dengue
CD	Cluster of differentiation - grupo de diferenciación
CDC	Centers for Disease Control and Prevention - Centros de Control y Prevención de Enfermedades
CHO	Chinese Hamster Ovary - Células de ovario de hámster chino tipo epiteliales
Cq	Ciclo umbral, threshold o de cuantificación
CU	Citosina-Uracilo
D	Dengue
D4C	Oligonucleótidos iniciadores reversos
D4F	Oligonucleótidos iniciadores directos
D4P	Sonda específica dirigida a un segmento del genoma del serotipo 4 del virus dengue
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin</i> - Molécula de adhesión intercelular 3 no asociada a integrina, específica de células dendríticas
DEF	Defunciones

DENV	Virus dengue
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIII	Dominio III de la proteína E del virus dengue
DSS	Síndrome de choque por dengue
E	Proteína de envoltura del virus dengue
Fc	Fracción cristalizable
FcyR	Receptor de la fracción cristalizable de gamma inmunoglobulina
FD	Fiebre por dengue
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue
FR	Forma replicativa
g	Gramo
h	Hora
h.p.i.	Horas posteriores a la infección
HSP70	Proteína de choque térmico 70
HSP90	Proteína de choque térmico 90
IFN	Interferón
IFN- γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
IR	Intermediario replicativo
kDa	Kilo daltones
rpm	Revoluciones por minuto
LPS	Lipopolisacárido

M1	Macrófagos tipo 1 (activación clásica o fenotipo pro-inflamatorio)
M2	Macrófagos tipo 2 (fenotipo anti-inflamatorio)
m-7GpppAmp	Capucha tipo 1
MCSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> - Factor estimulante de colonias de macrófagos
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight</i> - Desorción/ionización láser asistida por matriz-detector de tiempo de vuelo
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
MOI	Multiplicity of infection - Multiplicidad de infección
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
N	Normal
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
NS1	Proteína no estructural 1 del virus dengue
NS2a	Proteína no estructural 2a del virus dengue
NS2b	Proteína no estructural 2b del virus dengue
NS3	Proteína no estructural 3 del virus dengue
NS4a	Proteína no estructural 4a del virus dengue
NS4b	Proteína no estructural 4b del virus dengue
NS5	Proteína no estructural 5 del virus dengue
PAHO	Pan American Health Organization - Organización Pan Americana de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salina
pH	Potencial de hidrógeno

PMA	Acetato de forbol miristato
prM	Proteína precursora de la proteína de membrana del virus dengue
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Medio base para cultivo celular Roswell Park Memorial Institute
qRT-PCR	Retro-Transcripción-Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
Th1	Respuesta inmune de células T cooperadoras tipo 1
Th2	Respuesta inmune de células T cooperadoras tipo 2
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
U937	Línea celular promonocítica
U937-DC-SIGN	Línea celular promonocítica expresando DC-SIGN
UFP/mL	Unidades formadoras de placa por mililitro
UTR	Región no traducida
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana 1
WHO	World Health Organization - Organización Mundial de la Salud
α -HSP90	Anticuerpos dirigidos contra la proteína HSP90
α -HSP70	Anticuerpos dirigidos contra la proteína HSP70
α -NR	Anticuerpos dirigidos contra un antígeno no relacionado
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar
3'CS	Secuencia de ciclización 3'
3'NC	Región no codificante 3'
3'UAR	Región AUG 3'
5'CS	Secuencia de ciclización 5'

5'SLA	Estructura de tallo y burbuja A
5'UAR	Región AUG 5'
5'UTR	Región no traducida 5'

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras		Página
Figura 1	Distribución mundial del dengue, 2010	4
Figura 2	Ciclos de transmisión del DENV	6
Figura 3	Morfología de la partícula del virus dengue	11
Figura 4	Mapa genómico del virus dengue	11
Figura 5	Esquema general del ciclo replicativo de los falvivirus	14
Figura 6	Entrada y fusión de los flavivirus	21
Figura 7	Endocitosis mediada por clatrina	23
Figura 8	Curva estándar de correspondencia entre RNA y Cq	34
Figura 9	Curva de equivalencia entre los valores de Cq y UFP/mL	34
Figura 10	Células U937 y U937-DC-SIGN antes y después de ser diferenciadas	38
Figura 11	Medición de los niveles de progenie viral en células U937-DC-SIGN mediante RT-PCR tiempo real posterior al tratamiento con anticuerpos contra HSP70 y HSP90 y la posterior infección con DENV4	40
Figura 12	Medición de los niveles de progenie viral en células U937 mediante RT-PCR tiempo real posterior al tratamiento con anticuerpos contra HSP70 y HSP90 y la posterior infección con DENV4	41
Figura 13	Medición de la viabilidad celular de células U937 y U937-DC-SIGN bajo el tratamiento con diferentes concentraciones de dansilcadaverina y dynasore®	43
Figura 14	Medición de la viabilidad celular de células U937 y U937-DC-SIGN bajo el tratamiento con diferentes concentraciones de bafilomicina A1	44
Figura 15	Determinación del efecto de los compuestos inhibidores sobre la endocitosis de transferrina y la acidificación de vesículas en células U937	46

Figura 16	Determinación del efecto de los compuestos inhibidores sobre la endocitosis de transferrina y la acidificación de vesículas en células U937-DC-SIGN	47
Figura 17	Medición del efecto de los compuestos inhibidores de la entrada viral en la infección por DENV en células U937 y U-937-DC-SIGN	49
Figura 18	Células U937-DC-SIGN tratadas con anticuerpos contra HSP70 y HSP90 e infectadas con DENV4	50
Figura 19	Células U937-DC-SIGN tratadas con compuestos inhibidores de la entrada viral e infectadas con DENV4	51
Figura 20	Presencia del antígeno NS1 en sobrenadantes de células tratadas con compuestos inhibidores de la entrada viral	52
Figura 21	Co-localización de la proteína E del virus dengue con Rab5 en la línea celular U937-DC-SIGN.	54
Figura 21	Co-localización de la proteína E del virus dengue con Rab5 en la línea celular U937-DC-SIGN.	55
Tablas		
Tabla 1	Número de casos anuales confirmados de fiebre por dengue (FD), fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y defunciones por fiebre hemorrágica (DEF) en México en el período 2000 a 2012 y el primer semestre del 2013	5
Tabla 2	Moléculas de asociación a membrana para el DENV	15
Tabla 3	Número de UFP equivalentes/mL correspondientes a cada condición de los ensayos de inhibición de la infección por DENV empleando anticuerpos dirigidos contra las proteínas HSP70 y HSP90 para células U937 y U937-DC-SIGN.	
Tabla 4	Número de UFP equivalentes/mL correspondientes a cada condición de los ensayos de inhibición de la infección por DENV por el efecto de compuestos inhibidores de la entrada viral.	
Anexos		
Anexo 1	Tablas de valores de UFP equivalentes/mL	

RESUMEN

El dengue es la enfermedad producida por arbovirus de mayor importancia a nivel mundial. Aproximadamente 3.6 mil millones de personas habitan en zonas de riesgo de transmisión del virus dengue, agente causal de la enfermedad. Hasta el momento, no existen una vacuna o un tratamiento contra la infección. En México, el número de casos tanto de fiebre por dengue como de dengue severo o fiebre hemorrágica por dengue, han aumentado en más del cincuenta por ciento con respecto al año anterior; aunado a esto, los cuatro serotipos del virus dengue se encuentran en co-circulación en el país, lo cual se considera un factor de riesgo para la forma más grave de la enfermedad.

Para establecer una infección productiva, el virus dengue requiere su entrada en la célula blanco y la liberación del genoma viral en el citoplasma. Este proceso incluye diversos pasos, siendo algunos de ellos la unión del virus a sus receptores en la superficie celular, la internalización del virus, su tráfico a través de endosomas hacia un ambiente ácido y la fusión de las membranas endosomal y viral que permiten la liberación del RNA viral en el citoplasma.

El principal blanco celular del virus dengue *in vivo* son los macrófagos, sin embargo, estos juegan un papel dual en la infección por virus dengue. Por un lado, los macrófagos la inhiben promoviendo una respuesta inmune innata contra el virus, eliminan células infectadas y presentan antígenos virales a los linfocitos T y B dirigiendo la respuesta inmune específica. Por otro lado, son altamente permisivos a la infección, producen citosinas que incitan una respuesta inmune Th2 permisiva a la infección, eliminan células sanas cercanas a la infección y provocan un aumento en la permeabilidad capilar contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad.

Las líneas celulares monocíticas THP-1 y U937 han sido utilizadas como modelo *in vitro* de infección en macrófagos. Estas células se infectan a bajos niveles; sin embargo, cuando son transfectadas para la expresión de DC-SIGN, una lectina que es usada por el virus para ingresar a células dendríticas, su infección aumenta considerablemente.

Estudios llevados a cabo en células U937 y cultivos primarios de macrófagos indican que las proteínas HSP70 y HSP90 forman parte del complejo receptor del virus, y que el DENV utiliza la endocitosis mediada por clatrina para su entrada a estas células.

A fin de corroborar y analizar estos hallazgos, en este trabajo se usaron anticuerpos contra HSP70 y HSP90 para bloquear la unión de DENV e inhibidores de la endocitosis mediada por clatrina (dansilcadaverina/dynasore) y de la acidificación vesicular (bafilomicina A1) para analizar la entrada de DENV4 a través de la medición de la progenie viral producida usando qRT-PCR; en células U937 y U937-DC-SIGN diferenciadas a macrófagos.

Los resultados sugieren que el DENV4 usa a los receptores HSP70 y HSP90, la endocitosis mediada por clatrina y requiere un ambiente ácido para entrar en ambos tipos celulares. Estos resultados sugieren además que la línea celular U937-DC-SIGN, puesto que es más susceptible a la infección, podría sustituir a la línea U937 en el estudio de la infección por el virus dengue en macrófagos, especialmente en el estudio de eventos tempranos.

ABSTRACT

Dengue is the most important arboviral disease worldwide. Approximately 3.6 billion people live in areas at risk of dengue virus transmission, causative agent of the disease. So far, no vaccine or treatment against infection is available. In Mexico, the number of cases of both dengue fever or severe dengue hemorrhagic fever, have increased by more than fifty percent over the previous year. In addition, the four serotypes of dengue virus are found co-circulating in the country, which is considered a risk factor for the development of severe forms of the disease.

To establish a productive infection, dengue virus requires entry into the target cell and the viral genome to be released into the cytoplasm. This process includes several steps; virus binding to receptors on the cell surface, internalization of the virus, traffic through endosomes to an acid environment and the fusion of the viral and endosomal membranes to allow the release viral RNA in the cytoplasm.

The major cellular target of dengue virus *in vivo* are macrophages. However, they play a dual role in dengue virus infection. On one hand, macrophage inhibit infection promoting an innate immune response against the virus, removing infected cells and presenting viral antigens to T and B cells; thus, directing specific immune response. On the other hand, they are highly permissive to infection generating the cytokines and inducing a Th2 immune response permissive to infection, and causing an increase in capillary permeability, all this contributing to the pathogenesis of the disease.

Monocytic cell lines THP-1 and U937 have been used as *in vitro* model of infection in macrophages. These cells are infected at low levels; however, when transfected for the expression of DC-SIGN, a lectin which is used by the virus to enter the dendritic cells, their infection increases considerably.

Studies carried out in U937 cells and primary cultures of macrophages indicate that HSP70 and HSP90 proteins are part of the virus receptor complex and that the DENV uses clathrin-mediated endocytosis for entry to these cells.

In order to corroborate and expand these findings, in this work we used antibodies against HSP70 and HSP90 to block the binding of DENV and inhibitors of clathrin-mediated endocytosis (dansylcadaverine / dynasore) and vesicular acidification (bafilomycin A1) to analyze the DENV4 infection through the measurement of viral progeny produced in U937 and U937-DC-SIGN differentiated macrophages using qRT-PCR.

The results suggest that the DENV4 uses HSP70 and HSP90, as part of the receptor complex, and enter the cell via clathrin-mediated endocytosis and requires an acidic environment to enter both cell types. These results further suggest that the cell line U937-DC-SIGN might replace U937 line in the study of dengue virus infection in macrophages, particularly in the study of early events.

1. INTRODUCCIÓN

Los virus dengue (DENV) son flavivirus que se distinguen entre ellos por la respuesta serológica que provocan. Existen 4 serotipos bien definidos (DENV1-DENV4) y cualquiera de ellos es capaz de provocar la enfermedad llamada dengue (Simmons *et al.* 2012).

Dengue es un término introducido a la terminología médica, adaptado del swahili *dinga, dyenga, ki-dinga pepo o ki denga pepo*, que significa "golpe súbito causado por un espíritu maligno" (Ooi *et al.* 2006, Secretaría de Salud 2003). Se usa para identificar a una enfermedad producto de la compleja interacción entre el mosquito vector, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*; el virus, cualquiera de los cuatro serotipos que aunque están cercanamente relacionados, son antigénicamente diferentes; y el hospedero, el humano. Esta enfermedad se caracteriza por causar infecciones asintomáticas o subclínicas, fiebre por dengue (FD) o dengue severo o grave, o fiebre hemorrágica por dengue (FHD) (Burnett 2013, Endy 2010, WHO 2009).

1.1. Epidemiología.

A pesar de que hace solo cien años se iniciaron los primeros estudios sobre enfermedades transmitidas por mosquito, los síntomas característicos del dengue han permitido especular sobre su existencia en China desde hace mil años (Gubler 1998, Reiter 2001). En el siglo XVII se registraron los primeros brotes de la enfermedad en la India francesa y en Panamá. Y en el siglo XVIII en Indonesia, Egipto, los Estado Unidos de América – en Filadelfia donde Benjamín Trush la llamó fiebre quebranta huesos-, India, Perú, Kenia y Tanzania; señalando la presencia de la enfermedad en tres continentes: Asia, África y América. Desde entonces, los trópicos y subtrópicos han sido el centro de la emergencia del dengue como un problema de salud pública, presentado brotes de manera constante (Gubler 2002, Halstead 2006, Simmons *et al.* 2012). En América, los brotes de dengue se han presentado

desde el siglo XIX. A mediados del siglo XX, el serotipo de virus dengue circulante en América fue el DENV2. Posteriormente, se importó a Jamaica el serotipo DENV3 proveniente de Asia, también a Venezuela y Puerto Rico (Neff *et al.* 1967). La primera epidemia de FD documentada en laboratorios estaba relacionada con el serotipo de DENV3 y ésta afectó a la Cuenca del Caribe y Venezuela entre 1963 y 1964. En 1968-1969, otra epidemia se presentó en varias islas del Caribe y mientras ésta transcurría se aislaron los serotipos de DENV2 y 3. Durante la década de 1970, Colombia se vio afectada por extensos brotes asociados con los serotipos DENV2 y 3; en ese período estos serotipos se hicieron endémicos en el Caribe. En 1977, se introdujo el serotipo DENV1 que después de su detección inicial en Jamaica se propagó a la mayoría de las islas del Caribe causando brotes explosivos. La presencia de estos tres serotipos llevó a la presencia de infecciones secundarias con DENV2-DENV1 y DENV3-DENV1. Se observaron brotes similares en Sudamérica septentrional, América Central y México. Fue en 1981 cuando se introdujo DENV4 y DENV2 genotipo III al Caribe, y pronto se propagaron al resto del continente (Halstead, 2006). Los primeros casos de dengue hemorrágico se registraron en 1981, en Cuba (Kourí *et al.* 1986), posteriormente casos de dengue severo se reportaron en la mayoría de los países, como Brasil, Colombia, Ecuador, Honduras, México y Venezuela (Gubler 2002; Torres *et Castro* 2007).

En un intento por detener la transmisión de la enfermedad, a principios de la segunda mitad del siglo XX, la Organización Pan Americana de la Salud (Pan American Health Organization-PAHO) junto con las autoridades de varios países del continente americano; realizaron una campaña de erradicación contra *Aedes aegypti*, el mosquito vector en América en ese momento. Esta campaña fue exitosa y redujo la presencia del mosquito vector de manera importante (Halstead 2006, Hanley *et al.* 2013). Sin embargo, la falta de continuidad y participación de todos los países infestados por el mosquito en los años subsecuentes, condujo a la re-infestación y al aumento de la presencia del mosquito en el continente, así

como a la reaparición de la enfermedad (Gubler 2011, Monath 1994, Reiter 2001).

En México, la transmisión del DENV fue registrada por primera vez en 1941 y, debido a la erradicación del vector en 1963, disminuyó el número de casos. Sin embargo, en 1978 reapareció en México en la frontera sur como FD. Esto sucedió en el Estado de Chiapas, de donde se propagó en el siguiente año a los Estados de Oaxaca, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán, principalmente. En 1980 se presentó una epidemia que afectó a quince Estados, incluyendo a Estados del Norte, Coahuila, Chiapas, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Hidalgo, Morelos, Querétaro y Zacatecas. Durante esta década, el país experimentó varias epidemias por DENV1. En 1982 se detectó la transmisión de DENV1 y DENV4 en los Estados de Oaxaca y Tamaulipas, y se presentó transmisión en Guerrero y Puebla. Entre 1983 y 1986 se demostró la circulación de DENV1, DENV2 y DENV4; con la presencia en Jalisco y el Estado de México (Secretaría de Salud 2003).

Entre 1990 y 1993 hubo una disminución importante en la incidencia de la FD; sin embargo, la presencia del virus se extendió y dispersó con la forma hemorrágica de la enfermedad en 1994. Entre 1994 y 1998 se registraron 155011 casos con una media anual de 31002. Para 1999 se notificaron 14667 casos en 21 Entidades Federativas y se detectó la circulación de los cuatro DENV en el país (Secretaría de Salud 2003).

1.2. Situación actual del dengue.

Actualmente, el dengue es la enfermedad causada por arbovirus más importante en humanos y es una causa seria de morbilidad y mortalidad en la mayoría de las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Esto como consecuencia de que en los últimos 50 años la incidencia de la enfermedad ha aumentado 30 veces junto con un incremento de la propagación a nuevos países y, en la pasada década, del medio urbano al rural. Se estima que

ocurren 50 millones de infecciones por DENV anualmente (Guzmán *et al.* 2010, Halstead 1988, WHO 2009) en aproximadamente 120 países y cerca de 3.6 mil millones de personas viven en países donde la enfermedad es endémica. La propagación de la enfermedad a regiones al norte como Nepal y al sur como Buenos Aires, Argentina; se ha promovido debido a cambios en la urbanización, el crecimiento de la población y el incremento de la movilidad (Mandell *et al.* 2006, Ng 2011), y de la misma manera ha sucedido en el resto del mundo. Otro factor que ha demostrado puede ser decisivo, es la falta de un control efectivo del mosquito en las áreas donde el dengue es endémico (Gubler 1998, Ng 2011, OPS 1995).

En la Figura 1 se observa la distribución actual del dengue en el mundo, en el cual se aprecia una marcada presencia de la enfermedad tanto en América como en la región Asia Pacífico.

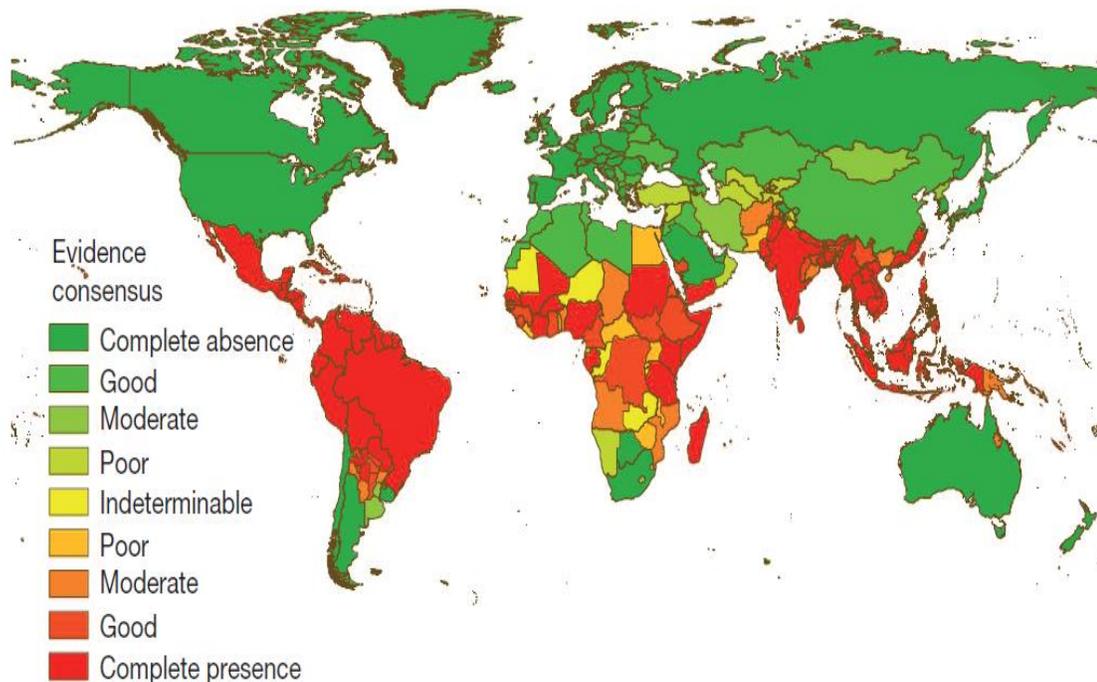


Figura 1. Distribución mundial del dengue, 2010. Se indican las regiones en las que hay presencia de dengue, en rojo en donde se ha reportado mayor presencia de la enfermedad y disminuye hasta llegar a verde, en donde no se han reportado casos. Fuente: Bhatt 2013.

En América, en el 2011, el número de casos de dengue y el de muertes por dengue disminuyeron aproximadamente un 40%. Esta tendencia continuó en el 2012. No obstante, en América continúa la co-circulación de los 4 serotipos del DENV, lo cual aumenta el riesgo de aparición de formas severas de la enfermedad, y las condiciones propicias para continuar con la transmisión del dengue (PAHO/WHO 2013).

Durante los últimos 12 años, en México, el número de casos tanto de FD como FHD ha aumentado de manera considerable como se muestra en la Tabla 1. El 2009 fue el año con el mayor número de casos totales (52 534), lo que significa un aumento de casi 31 veces en el número de casos con respecto al año 2000. Y, aunque en el 2011 se observó una disminución del número de casos totales con respecto al 2010 de aproximadamente 45%, en el 2012 estas cifras aumentaron considerablemente. En el 2013, en la primera mitad del año ya se han presentado un total 10,574 casos de FD y FHD, esta cifra supera al número de casos que se presentaron en la primera mitad del 2012 (6 390). Es necesario mencionar que estos números podrían subestimar el número de casos reales ocurridos en el país (SINAVE-IndRE-CENAPRECE 2013).

Tabla 1. Número de casos anuales confirmados de fiebre por dengue (FD), fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y defunciones por fiebre hemorrágica (DEF) en México en el período 2000 a 2012 y el primer semestre del 2013.

Casos confirmados en México (país)									
Año	FD	FHD	Total	DEF	Año	FD	FHD	DEF	Total
2000	1 706	50	1 756	SD	2007	40 559	7 897	29	48 456
2001	6 033	191	6 224	SD	2008	26 596	6 719	25	33 315
2002	9 844	1 429	11 273	SD	2009	41 972	10 562	38	52 534
2003	5 018	1 419	6 537	SD	2010	22 352	6 336	47	28 588
2004	6 076	1 769	7 835	SD	2011	10 970	4 608	36	15 568
2005	16 862	4 255	21 117	SD	2012	32 662	17 706	64	40 368
2006	22 810	4 477	27 287	SD	2013	7 590	2 984	11	10 574

DEF= Número de defunciones reportado. SD=Sin dato. Fuente: DGE-SINAVE.

1.3. Transmisión y propagación del virus.

La transmisión del virus relacionada con *Aedes aegypti* se demostró en 1903 (Mandell *et al.* 2006). Con la rápida expansión de las poblaciones urbanas en las últimas décadas, han aumentado tanto el hábitat como la disponibilidad de alimento para el mosquito vector y, junto con la carencia de un sistema eficiente para su control, se ha potenciado el riesgo de transmisión del virus (Padmanabha *et al.* 2012, Reiter 2001).

La existencia de primates que pueden ser infectados por el virus sugiere un papel de estos como reservorios; sin embargo, el humano ha resultado ser el principal reservorio, así como el principal medio de transmisión entre humanos (Cecilio *et al.* 2009). Existen dos ciclos de transmisión del DENV. Uno peridoméstico, por especies de *Aedes*, y uno selvático en donde el virus es transmitido por especies de *Aedes* arbóreas entre primates no humanos. El último se ha observado en Malasia, África y Senegal (Chen *et Vasilakis* 2011, Hanley 2013, Holmes *et Twiddy* 2003, Kyle *et Harris* 2008).

En las Américas, el DENV persiste en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión hombre-*Aedes aegypti*-hombre (Gubler 2012, OPS 1995), como lo indica la Figura 2, con epidemias periódicas.

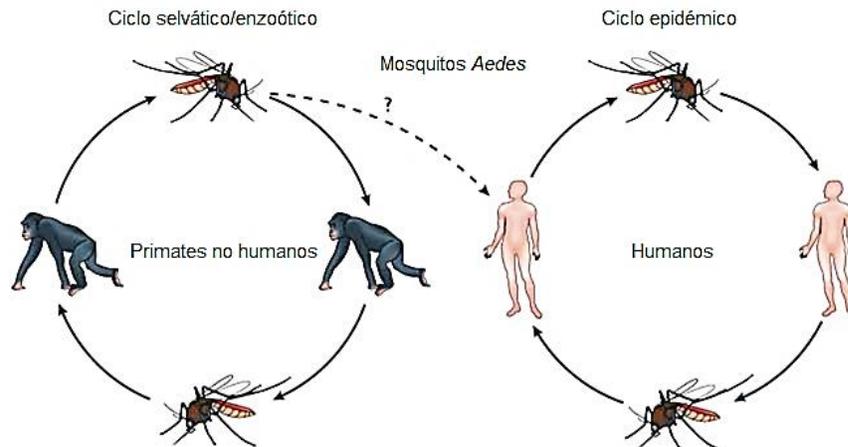


Figura 2. Ciclos de transmisión del virus dengue (Stephen *et al.* 2007).

El DENV es transmitido a los humanos por mosquitos del género *Aedes* (*Stegomyia*) (Foster *et al.* 2009, Gubler 2002, Halstead 2004, OPS 1995, Villegas *et al.* 2010, WHO 2009), siendo los más importantes *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* y *Ae. scutellaris* (Domingo-Carrasco *et al.* Gascón-Bustrenga 2005, Gubler 1988, WHO 2009), en el orden mencionado. Los mosquitos de las especies *aegypti* y *albopictus*, son los principales vectores en América y África (Were 2012), y en Asia (Raharimalala *et al.* 2012, Rezza 2007); respectivamente.

1.4. Clasificación y manifestaciones clínicas del dengue.

La mayoría de las infecciones por dengue son asintomáticas; sin embargo, cuando se presenta la enfermedad, los síntomas pueden llevar de una enfermedad febril autolimitada, hasta una enfermedad severa e incluso mortal. Esta enfermedad solía clasificarse como fiebre por dengue (DF) y fiebre por dengue hemorrágica (DHF), esta última con cuatro grados de severidad, I a IV; el III y IV definidos como síndrome de choque por dengue (DSS) (Halstead 2004). La DHF era diagnosticada como tal cuando se cumplían cuatro criterios: fiebre con una duración de entre 2 y 7 días, evidencia o tendencia a hemorragia por una prueba de torniquete positiva o hemorragia espontánea, un conteo de plaquetas menor a $100 \times 10^9/L$ y fuga de plasma (cambios en el hematocrito y efusión pleural). Sin embargo, la dificultad para definir casos de la enfermedad como FHD llevó al establecimiento de una clasificación diferente. Esta última clasificación fue presentada por la WHO en el 2009 definiéndose solo dos categorías, dengue y dengue severo o grave.

El dengue se caracteriza por fiebre y dos o más de los siguientes síntomas: vómito, náusea, salpullido, dolor retro-ocular, muscular, de cabeza y/o articular; leucopenia y prueba de torniquete positiva. Este también incluye signos de alerta como vómito persistente, dolor abdominal, sangre en mucosas, hepatomegalia, letargia, un incremento en el hematocrito y conteo de plaquetas disminuido (Stephen *et al.* 2007, WHO 2009).

En el dengue severo, aunado a los síntomas del dengue, se observa fuga de plasma que puede dirigir a choque y derrame pleural que lleve a estrés respiratorio, hemorragia severa y/o falla orgánica múltiple (falla hepática o renal agudas, encefalopatía o encefalitis). Algunas manifestaciones inusuales son la cardiomiopatía y la encefalitis (Simmons *et al.* 2012, WHO 2009).

Clínicamente, el dengue puede ser difícil de diferenciar de otras arbovirosis (Goddard 2000) o enfermedades exantemáticas, como sucede con la enfermedad provocada por el virus chikungunya (Soumahoro *et al.* 2010), rubeola, parvovirus humano B19, roséola infantum, fiebre escarlata (Pull *et al.* 2012) y la fiebre amarilla.

Existen varios factores de riesgo para desarrollar FHD o dengue severo, como es el aumento de la infección que se presenta con DENV en individuos que experimentan una infección secundaria, fenómeno conocido como ADE (del inglés *antibody-dependent enhancement*) o aumento de la infección mediada por anticuerpos. El ADE sucede cuando el individuo tiene presencia de anticuerpos no neutralizantes o heterólogos en cantidades subneutralizantes (Halstead *et al.* 1977). Estos anticuerpos pueden participar en el aumento de la severidad de la enfermedad en infecciones secundarias, ya que permiten que virus opsonizados se unan a células que presentan receptores Fc gamma (FcγR-CD16, 32 y 64); las cuales, ahora se infectan más eficientemente. Así, no solo aumenta el número de células infectadas (ADE-extrínseco), sino también aumenta la producción viral por célula (ADE-intrínseco) (Dejnirattisai *et al.* 2010, Kou *et al.* 2011) y se presenta además una intensa producción de citocinas. La virulencia de la cepa es otro factor; por ejemplo, Leitmeyer, Rico-Hesse y cols. (1999) sugieren que la cepa americana de DENV2 presenta menor virulencia que la cepa del mismo serotipo circulante en el sureste asiático. Otros factores implicados en la severidad son la edad, el sexo, el estado nutricional (Goddard 2000), la memoria heterogénea de células T, el fondo genético del individuo y factores

de mimetización de proteínas virales (Chen *et al.* 2009, Stephen *et al.* 2007, Sun *et al.* 2007).

Aunque las terceras y cuartas infecciones son muy raras (WHO 2011), se calcula que el riesgo de presentar FHD no es mayor para los que sufren una tercera o cuarta infección que para los que sufren una segunda infección (Gibbons *et al.* 2007).

En la actualidad no existe tratamiento específico, ni vacunas, para el dengue.

1.5. Inmunidad al virus dengue.

Una infección por DENV provoca una fuerte respuesta humoral que protege de por vida contra la reinfección por el mismo serotipo y ofrece una protección por corto tiempo contra otro serotipo. Sin embargo, la inmunidad mediada por células T también contribuye significativamente a limitar o eliminar la infección viral (Halstead 2004, Simmons *et al.* 2012). Además, en niños menores de seis meses, los anticuerpos neutralizantes transmitidos a partir de la madre son protectores.

Se han detectado que la respuesta humoral está dirigida contra varias proteínas virales (Abubakar *et al.* 2002), siendo las proteínas más inmunogénicas la proteína no estructural (NS) 1 (Chuang 2013), proteína premembrana (prM) (da Silva Voorham *et al.* 2012, de Alwis *et al.* 2011) y proteína de la envoltura (E), dominio II (bloquean principalmente la fusión de la membrana) y dominio III (bloquean la unión a receptor) (Reddy *et al.* 2012, Sukupolvi-Petty *et al.* 2013). También se han detectado anticuerpos dirigidos contra las proteínas NS2a y NS3 (Abubakar *et al.* 2002, Fibriansah *et al.* 2013, Garcia *et al.* 1997, Stephen *et al.* 2007).

1.6. Virus dengue.

El virus dengue tiene un genoma de RNA, de una sola cadena de polaridad positiva, de aproximadamente 11000 nucleótidos (Henchal *et al.* 1990, Paranjape *et al.* 2010, Rice 2007, WHO 2009) y pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus* (Westaway *et al.* 1997, WHO 2009), al igual que otros patógenos humanos como los virus de la encefalitis Japonesa, encefalitis de San Luis, de la Fiebre Amarilla y del Oeste del Nilo (Heinz *et al.* 2012). Además, otros tres virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) causan enfermedades febriles similares o idénticas al dengue; (Halstead 2004) como el virus chikungunya (Mohd *et al.* 2013, Taraphdar *et al.* 2012), Oropuche (Pinheiro *et al.* 1981) y O'nyong nyong (Suhrbier *et al.* 2012).

Morfológicamente, el virión maduro de DENV tiene un diámetro de ~500 Å en su forma lisa (30 °C) o ~550 Å en su forma hinchada (37 °C) (Zhang *et al.* 2013). Su configuración es icosaédrica, con una envoltura lipídica derivada de la membrana de la célula huésped que constituye entre el 15-20% del peso total de la partícula. Los carbohidratos representan entre el 9-10% del peso de la partícula y se encuentran como glicolípidos o glicoproteínas (Beasley *et al.* 2008). La membrana se encuentra rodeada por una cubierta formada por 180 copias de E distribuida en 90 homodímeros, que son dos monómeros orientados antiparalelamente (Modis *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2004) con el péptido fusogénico localizado en el extremo distal del dominio DII oculto en una bolsa entre los dominios DI y DIII.

Se pueden distinguir dos formas del virión, una madura y otra inmadura (Perera *et al.* 2008) (Figura 3). El virión inmaduro contiene al precursor prM y la proteína E presenta una conformación estructural distinta a la observada en el virión maduro. La proteína E se observa en forma de una vara paralela a la membrana que forma picos en la forma inmadura del virión, por lo que en esta forma es ligeramente más grande (60nm) que el virión maduro (Beasley *et al.* 2008, Perera *et al.* 2008, Thiel *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2013).

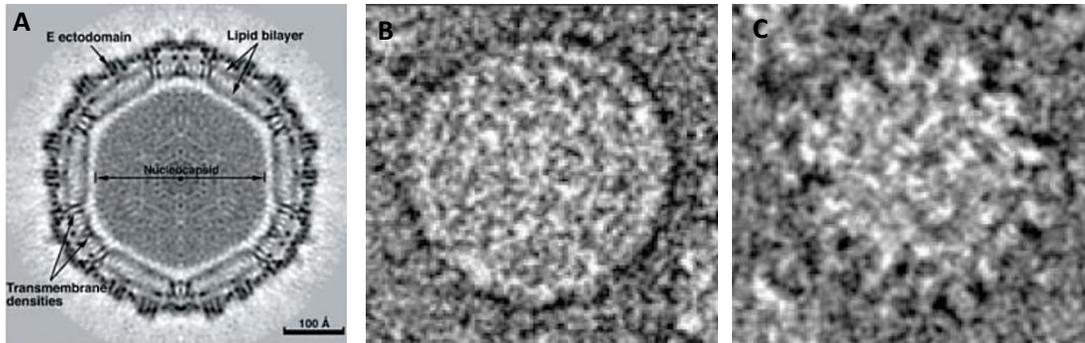


Figura 3. Morfología de la partícula del virus dengue. A la izquierda (A), una particular inmadura del virus. En el centro (B), partícula viral madura. A la derecha (C), partícula viral inmadura. Imágenes adquiridas por crio-microscopía electrónica (Zhang *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2013).

El genoma de RNA del virus dengue es traducido como una única poliproteína, la cual es cortada co- y post-traduccionalmente por proteasas tanto virales como del huésped para producir 3 proteínas estructurales (cápside, membrana y envoltura) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Chiu *et al.* 2005, Henchal *et al.* Putnak 1990, Paranjape *et al.* Harris 2010, Rice 2007, WHO 1997) (Figura 4).

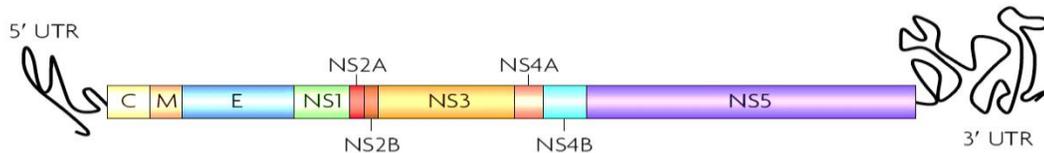


Figura 4. Mapa genómico del virus dengue (Guzman *et al.* 2010). Se muestran las dos regiones no traducidas (UTR), así como los 10 genes que constituyen el genoma.

Las proteínas no estructurales realizan una función específica y necesaria para la replicación del virus. La cápside (C) está compuesta una proteína estructural (nucleótidos 95 al 436) que participa en la encapsidación del genoma viral (Nemésio *et al.* 2011, Nemésio *et al.* 2013, Viral Bioinformatics Resource Center 2013). Como precursor de una glicoproteína de membrana, está prM (nucleótidos 437 al 934, extensión de 164 a. a.) que en su forma madura M (nucleótidos 710 al 934, extensión de 73 a.a.), es una de las proteínas virales de la envoltura (Viral Bioinformatics Resource Center 2013, Wong *et al.* 2012). Finalmente, la proteína E (nucleótidos 935 al 2419, extensión de 497 a. a.) es la proteína más grande de envoltura, ésta permite la unión al receptor y dirige la fusión de la membranas del virus y la del

endosoma para iniciar la infección viral (Nemésio *et al.* 2011, Viral Bioinformatics Resource Center 2013).

NS1 (nucleótidos 2420 al 3475, extensión de 352 a. a.) es la primera proteína no estructural, participa en la replicación viral y en la inducción de la apoptosis en el huésped. NS1 puede usarse como marcador de infecciones por DENV en etapas tempranas de la enfermedad. Debido a que el aumento y disminución de las concentraciones de NS1 correlacionan con el aumento y disminución de algunos síntomas clínicos, se ha propuesto que NS1 podría ser un factor en la patogénesis del dengue (Muller *et al.* 2013, Viral Bioinformatics Resource Center 2013). La proteína NS2A (nucleótidos 3476 al 4129) es un componente del complejo de replicación viral que participa en el ensamble del virión y, además, actúa como antagonista de la respuesta inmune del hospedero (Xie *et al.* 2013). NS2B (nucleótidos 4130 al 4519) actúa como co-factor de la proteína NS3. La proteína NS3 (nucleótidos 4520 al 6376) tiene actividad como proteasa, helicasa, trifosfatasa e induce apoptosis. Por su actividad de helicasa, se une al RNA viral. Su actividad como endopeptidasa es del tipo serina (Kim *et al.* 2013, Viral Bioinformatics Resource Center 2013). NS4A (nucleótidos 6377 al 6757, extensión de 150 a. a.) está unida al péptido 2K el cual es solo un fragmento de una poliproteína del DENV que actúa como péptido señal de NS4B (NS4A-2K-NS4B). Por su parte, NS4B (nucleótidos 6827 al 7573) es una pequeña proteína hidrofóbica de 248 aminoácidos (Nemésio *et al.* 2012, Viral Bioinformatics Resource Center 2013). Ambas, NS4A y NS4B, junto con NS2A y NS5, han sido implicadas en la modulación de la respuesta a INF inducida durante la replicación viral (Morrison *et al.* 2012) y son responsables de las modificaciones membranales observadas en células infectadas (Nemésio *et al.* 2012). NS5 (nucleótidos 7574 al 10270, extensión de 899 residuos) es una polimerasa de RNA dependiente de RNA, con actividad de metiltransferasa y participa en el complejo de replicación (Viral Bioinformatics Resource Center 2013, Yap *et al.* 2007), por lo que se encuentra altamente conservada (Chien *et al.* 2006).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1. Ciclo replicativo del virus dengue.

El DENV infecta a las células susceptibles a través de la unión de la glicoproteína E viral a una molécula receptora en la superficie celular. Una vez que se ha unido, el virus es internalizado a través de la formación de una vesícula cubierta por clatrina (Salas-Benito *et Del Ángel* 1997, van der Schaar *et al.* 2007). La vesícula es separada de la membrana celular por acción de dinamina y dirigida a través de endosomas tempranos hacia endosomas tardíos (van der Schaar *et al.* 2007). En los endosomas tardíos el pH es menor, cercano a 5.5; este pH ácido detona re-arreglos estructurales en la proteína de envoltura (E) provocando la externalización del péptido fusogénico, el cual interacciona con la membrana endosomal generando un poro de fusión por el cuál la cápside conteniendo el genoma viral se libera en el citoplasma (Modis *et al.* 2004, Yu *et al.* 2009, Zaitseva *et al.* 2010, Zaitseva *et Chernomordik* 2012), sitio en el cual se disocian las proteínas C liberando al RNA genómico.

El paso inicial de la replicación del genoma viral involucra la síntesis de *novο* de una cadena de sentido negativo intermediaria usando la cadena de sentido positivo como molde. El resultado es una doble cadena de RNA intermediaria, la forma replicativa (FR), que subsecuentemente sirve como molde para la síntesis de las cadenas de RNA genómico vía un complejo intermediario replicativo (IR). La regulación molecular de la replicación del DENV se basa en elementos *cis-* y *trans-* para modular la circularización del genoma y facilitar la traducción y la síntesis de RNA (Jin *et al.* 2011, Villordo *et al.* 2013). La síntesis de la cadena de sentido negativo resulta en la formación de la forma replicativa (FR) de doble cadena. La FR entra en transición hacia un intermediario replicativo (IR). Así, se generan grandes cantidades de cadenas positivas de RNA usando la cadena de RNA de sentido negativo como molde. Lo que resulta en un genoma de sentido positivo que experimenta una segunda ronda de traducción (Paranjape *et*

Harris 2010, Yu *et al.* 2008). Las proteínas estructurales prM y E se insertan en la membrana del retículo endoplásmico, en donde el virión es ensamblado junto con la proteína C formando una cápside que contiene el genoma viral replicado. Esta partícula viral inmadura es transportada a través de la vía secretoria hacia Golgi y en el trans-Golgi, en un pH bajo, la proteasa furina corta el péptido pr a partir de prM. La maduración (y liberación de pr) se presenta cuando el virión es liberado de la célula (Kuhn *et al.* 2002, Li *et al.* 2008, Modis *et al.* 2004, Modis *et al.* 2005, Perera *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2003). Un esquema del ciclo replicativo de los flavivirus se observa en la Figura 5.

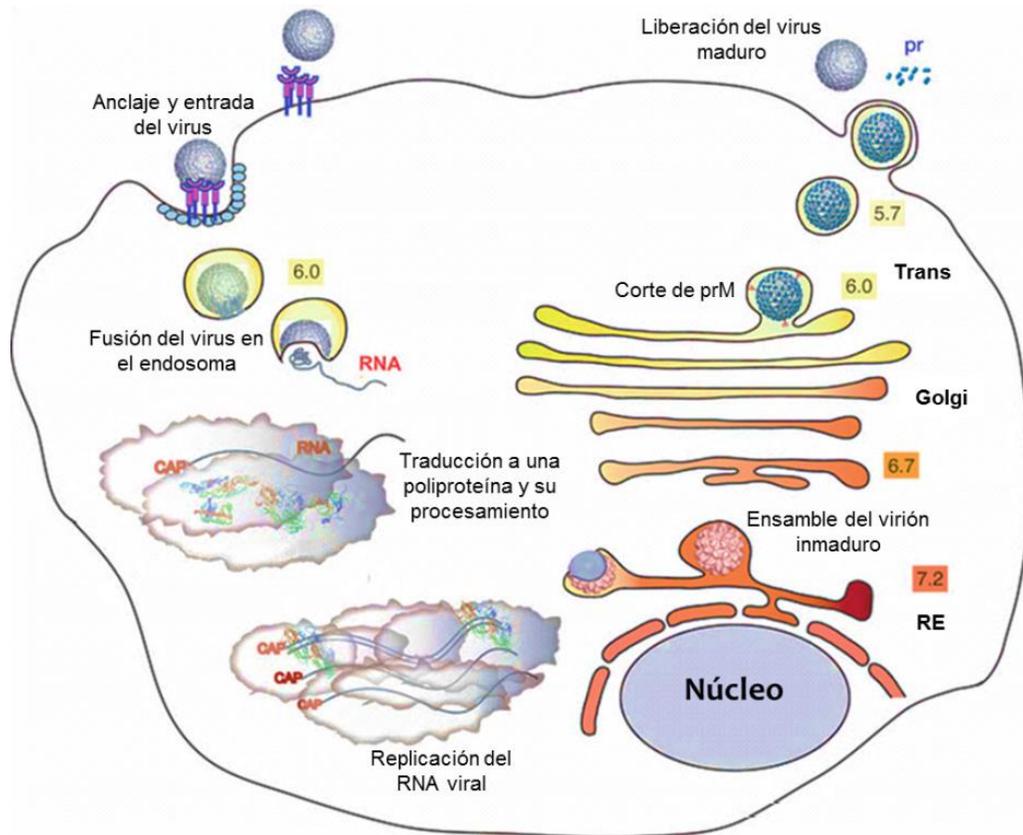


Figura 5. Esquema general del ciclo replicativo del virus dengue (Perera *et al.* 2008).

2.2. Receptores celulares para el virus dengue.

Se han descrito varias moléculas que pueden mediar la unión del virus dengue a la superficie celular (Chen *et al.* 1997, Jindadamrongwech *et al.*

2004, Lozach *et al.* 2005, Miller *et al.* 2008, Muñoz *et al.* 1998, Navarro-Sanchez *et al.* 2003, Perera *et al.* 2008, Ramos *et al.* 1997, Tassaneeritthep *et al.* 2003) actuando como factores de anclaje (Jindadamrongwech *et al.* 2004) o parte de un complejo receptor (Jindadamrongwech *et al.* 2004, Reyes-del Valle *et al.* 2005). Se ha observado que el DENV une a estas moléculas a través de la proteína E (Chen *et al.* 1996). Estos elementos se han descrito en diferentes tipos celulares, tanto de mamífero como de mosquito, y además, se ha observado que definen el tropismo del DENV; puesto que diferentes serotipos virales han mostrado unirse a un receptor específico mientras que otros no lo hacen (Thepparit *et al.* Smith 2004), como es el caso del DENV1 que se une al receptor de laminina (37kDa/67kDa) en células hepáticas (HepG2), comportamiento que no se observa en los otros serotipos. Posiblemente se deba a diferencias en la afinidad entre los diferentes serotipos del DENV (Bielefeldt-Ohmann 1998) por cada receptor y, paralelamente, entre genotipos y cepas de un mismo serotipo (Sukupolvi-Petty *et al.* 2013). En la Tabla 2 se muestra un resumen de las moléculas que han sido descritas como receptores para el DENV.

Tabla 2. Moléculas de asociación a membrana para el virus dengue.

Molécula	Tipo celular	Referencias
Heparán sulfato	Células Vero, HuH- 7, BHK, CHO	Chen <i>et al.</i> 1997, Hung 1999, Hilgard 2000
DC-SIGN	Células dendríticas	Navarro <i>et al.</i> 2003, Tassaneeritthep <i>et al.</i> 2003
Glicoproteína de 45 kDa	Células C6/36	Salas-Benito 1997
Proteína de 74-kDa	Células Vero	Martínez-Barragán y Del Ángel 2001
Proteínas de ~40 y ~70 kDa	Células-tipo B y línea celular monocítica	Bielefeldt-Ohmann 1998
Proteína de 100-kDa	Células de leucemia de eritrocito	Rothwell <i>et al.</i> 1996
Proteínas de 29, 34 y 43 kDa	Línea celular endotelial (ECV304)	Wei 2003
HSP90 y HSP70	Células de neuroblastoma y macrófagos	Reyes-del Valle <i>et al.</i> 2005

Continuación Tabla 2.

Molécula	Tipo celular	Referencias
Proteínas de 27, 45, 67 y 87 kDa	Monocitos/macrófagos	Moreno-Altamirano <i>et al.</i> 2002
GRP-78	Células hepáticas HepG2	Jindadamrongwech <i>et al.</i> 2004
Receptor de laminina de 37 y 67kDa	Células hepáticas HepG2	Thepparit y Smith 2004
Receptor de manosa	Macrófagos	Miller <i>et al.</i> 2008
Molécula asociada a CD 14	Monocitos/macrófagos Precursor de células dendríticas	Chen <i>et al.</i> 1999, 1997 Kwan <i>et al.</i> 2005
Proteínas de 65 kDa	Neuroblastoma	Ramos-Castañeda 1997
Proteínas de 67 and 80 kDa	C6/36	Múñoz <i>et al.</i> 1998

Algunas de las moléculas descritas en la Tabla 2 pueden actuar como factores de anclaje a la membrana celular, tal es el caso del heparán sulfato, una molécula con una amplia distribución. El heparán sulfato se ha observado en la asociación del DENV a la superficie celular, tanto en células de mamífero como la línea celular CHO, células Vero (Germi *et al.* 2002), HepG2 y endoteliales (Artpradit *et al.* 2013, Cabrera-Hernandez *et al.* 2007, Dalrymple *et al.* Mackow 2011), así como en células de mosquito (Sakoonwatanyoo *et al.* 2006, Smith 2012). La misma función se ha visto en células que portan DC-SIGN, en donde la entrada del DENV a la célula no requiere la internalización de esta lectina, ni de su señalización (Lozach *et al.* 2005).

Por el contrario, existen receptores que si requieren de la señalización para la internalización del virus. Como es el caso del receptor de manosa, que ingresa a su molécula cargo a través de la endocitosis mediada por clatrina (Miller *et al.* 2008) o, cuando el DENV está formando complejos con anticuerpos subneutralizantes dirigidos contra las proteínas E (Mondotte *et al.* 2007) o prM (da Silva *et al.* 2012, Rodenhuis-Zybert *et al.* 2010), que utiliza de manera circunstancial a los receptores Fcγ para infectar a células que los presenta en superficie (Flipse *et al.* 2013).

2.3. Línea celular U937.

La línea celular U937 promonocítica de linfoma histiocítico humano, ha sido ampliamente utilizada como modelo *in vitro* para el estudio de las funciones de macrófagos en diversos eventos, como el proceso de proliferación (Tabolacci *et al.* 2011); apoptosis (Matsunaga *et al.* 2012) y su inhibición por vitaminas (Perez-Cruz *et al.* 2003); diferenciación de monocitos a macrófagos (Tabolacci *et al.* 2011); síntesis y liberación de citocinas (Arif *et al.* 2011, Sun *et al.* 2013, Vongsakul *et al.* 2011); actividad fagocítica; citotoxicidad (Bernal *et al.* 1982); diferenciación de monocitos a monoblastos (Kim *et al.* 1998); expresión de moléculas de adhesión (Shelley *et al.* 2002), de receptores a IFN-gamma en la superficie de monocitos (Finbloom 1991) y de los receptores Fcgamma (Brown *et al.* 2006); así como en la observación de vías de señalización (Kang *et al.* 2011). De igual manera, esta línea celular ha sido usada en la caracterización de la infección por dengue a través del estudio del ADE (Brown *et al.* 2009, Midgley *et al.* 2012, Puerta *et al.* 2010, Puerta *et al.* 2013).

2.4. Receptores para el virus dengue descritos en monocitos y macrófagos.

El DENV puede infectar diferentes tipos celulares, incluyendo a los monocitos/macrófagos, quienes son su principal blanco en la infección (Arpradit *et al.* 2013, Cabrera-Hernandez *et al.* 2007, Chávez 2008, Dalrymple *et al.* 2011, Mackow 2011, Germi *et al.* 2002, Lozach *et al.* 2005, Mondotte *et al.* 2007, Puerta *et al.* 2010). No obstante, pocos receptores protéicos se han caracterizado en este tipo celular.

Se ha observado que el receptor de manosa es una molécula que contribuye en la unión del DENV a macrófagos (Miller *et al.* 2008).

En 1998, Bielefeldt-Ohmann determinó la participación de dos proteínas con un peso molecular de ~40 y ~70 kDa en la unión a DENV en células tipo

B (BM13674) y una línea celular monocítica (HL60). Además, observó que los distintos serotipos virales unen con diferente afinidad a los receptores en la célula y que a pesar de presentarse la unión del virus a la célula, esto no implicaba infección. Por lo que, además de la interacción con sus receptores en la superficie celular, el virus requiere otros pasos para su entrada. Así mismo, se ha descrito una molécula asociada a CD-14 como receptor para el DENV2 en monocitos/macrófagos (Chen *et al.* 1999). Su participación como molécula receptora se ha comprobado por bloqueo a través del uso de anticuerpos específicos a esta molécula, así como por su silenciamiento con RNA interferente (Alhoot *et al.* 2011).

En cultivos primarios de macrófagos provenientes de monocitos humanos, se han identificado proteínas de membrana con pesos moleculares de aproximadamente 27, 45, 67 y 87 kDa, como posibles receptores para DENV2 usando cromatografía de afinidad. Así como en células U937 diferenciadas y no diferenciadas a macrófagos por tratamiento con PMA, se observaron dos receptores putativos para DENV2, con pesos moleculares de 45 y 67 kDa, que concuerdan con dos de las proteínas determinadas en los cultivos primarios (Moreno-Altamirano *et al.* 2002).

Por otro lado, Reyes-del Valle y cols. (2005) observaron la participación de dos proteínas en la infección por DENV en macrófagos provenientes de células monocíticas diferenciadas, U937. Determinaron la unión a la glicoproteína E de una proteína de 84 kDa y de otra de 74 kDa a través de la técnica de cromatografía de afinidad y por ensayos de *pull down*. Usando un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF, identificaron a la primera proteína como HSP90. Ellos, para corroborar que estas proteínas actúan en la unión del virus a la superficie celular, realizaron ensayos de inhibición de la infección a través del uso de anticuerpos contra estas proteínas y observaron que esto provocaba una disminución en la infección por el DENV. Basados en estos resultados, determinaron que HSP70 y HSP90 participan en la

unión del virus a macrófagos actuando como parte de un complejo receptor (Reyes-del Valle *et al.* 2005).

2.5. Infección por el virus dengue en células THP-1 y U937 expresando DC-SIGN.

Las células dendríticas son reconocidas por ser las células presentadoras de antígenos más poderosas. Éstas expresan en su superficie una lectina tipo C denominada DC-SIGN (del inglés *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*), la cual se encuentra abundantemente en células dendríticas inmaduras y menormente en células maduras o activadas. Sin embargo, no todas las células dendríticas expresan DC-SIGN, como son las células dendríticas foliculares o residentes de la piel (Svajger *et al.* 2010).

La unión de patógenos por esta molécula ha sido descrita para virus tales como virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) (Cambi *et al.* 2009, Feinberg *et al.* 2001, Geijtenbeek *et al.* 2000, Mitchell *et al.* 2001), virus de la hepatitis C (Cocquerel *et al.* 2006, Cormier *et al.* 2004), citomegalovirus (Halary *et al.* 2002) y coronavirus (Marzi *et al.* 2004); para bacterias (Bergman *et al.* 2004, Tailleux *et al.* 2003) y para parásitos (Caparrós *et al.* 2005).

En el caso del DENV, éste utiliza la afinidad de DC-SIGN por los carbohidratos, para unirse a través de la glicoproteína E (Alen *et al.* 2012). Por otro lado, se ha observado que la presencia de esta molécula interfiere con el ADE, siendo reproducible en células dendríticas maduras pero no en células inmaduras (Boonnak *et al.* 2008).

Una estrategia para estudiar la participación de una molécula en un evento específico, es su expresión en una línea celular que bajo condiciones normales no la expresa (Rodrigo *et al.* 2006). En el estudio de la participación de DC-SIGN en la unión del DENV a la superficie celular, Tassaneeritthep y cols. (2003), utilizaron células monocíticas THP-1

transfectadas para la expresión de DC-SIGN. Las células de la línea celular THP-1 se infectan con DENV a niveles inferiores al 1% y al expresar DC-SIGN la infección puede aumentar hasta un 80%. Para corroborar la participación de la molécula receptora, ellos utilizaron anticuerpos dirigidos contra DC-SIGN, y observaron que la presencia de estos provoca una disminución del 50 % en el número de células infectadas.

La línea celular monocítica U937 también ha sido modificada para la expresión de DC-SIGN. Estas células se han usado para el estudio de la función de DC-SIGN como receptor para el adenovirus 2C (Günther *et al.* 2011), en el estudio de la interacción entre DC-SIGN y glucanos de Lewis asociados a tumor colon-rectal y su efecto en la diferenciación y función de las células dendríticas (Nonaka *et al.* 2011); así como para investigar el papel de DC-SIGN en la transmisión del VIH-1 (Wang *et al.* 2007) y en la determinación de la relación en los anticuerpos producidos contra diferentes epitopos en respuesta a infecciones primarias por DENV (de Alwis *et al.* 2011).

Kraus, de Silva y cols. (2007), en su trabajo sobre la comparación del palqueo y la citometría de flujo para la medición de la neutralización del DENV, muestran la diferencia en el número de células infectadas con una MOI de 0.1 de DENV3, tanto en células U937, cuya infección es de ~0.1%, y U937-DC-SIGN donde la infección aumenta hasta ~42%. Así mismo, mencionan que cualquiera de los serotipos del DENV infectan ambos tipos celulares aumentando la infección por el virus más de 10 veces en las células U937 expresando DC-SIGN.

2.6. Vías de entrada del virus dengue.

La entrada del DENV en su célula blanco se puede resumir en los siguientes pasos: adsorción en la superficie celular a través de un receptor (Hung *et al.* 1999), internalización, tránsito dentro de la célula y liberación del genoma viral en el citoplasma (Smit *et al.* 2011) (Figura 6).

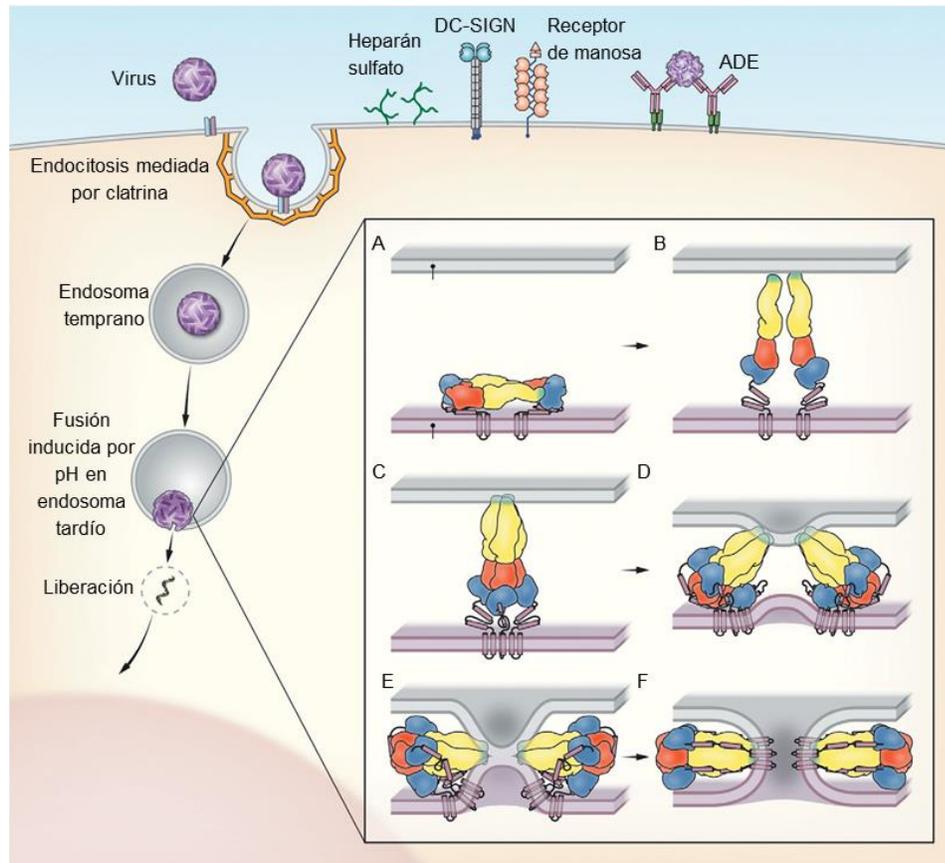


Figura 6. Entrada y fusión de los flavivirus. El virus se une a un receptor o factor de anclaje en la superficie celular. A continuación es internalizado a través de la endocitosis mediada por clatrina y dirigido al tráfico endosomal en donde ocurre la fusión. Posteriormente, se expone el virus a un pH ácido, que provoca que los dímeros de proteína E sobre un virión maduro se desasocien y proyecten fuera de la superficie viral (a). En esta orientación, el péptido de fusión de la proteína E interacciona con la membrana endosomal (b) y permite la formación de un trímero central (c). El dominio III de E se dobla contra la superficie exterior del trímero (d), empuja el dominio anclado en la membrana viral lo cual promueve un giro que empuja al dominio anclado en la membrana viral hacia la membrana endosomal. Se genera un estado de hemifusión (e) que termina con la fusión de las membranas (f). Adaptado de: Pierson *et al.* 2013.

La proteína E del DENV permite la unión del virus a la superficie celular y, además, le confiere tropismo (Mondotte *et al.* 2007). Esta unión sucede posiblemente; primero, por la unión a un factor de anclaje como son el heparán sulfato y DC-SIGN (Bielefeldt-Ohmann 1998), moléculas que son abundantes en la superficie celular pero presentan baja afinidad por E. Estas moléculas acercan y aumentan la posibilidad de interacción de la glicoproteína viral con un receptor de alta afinidad, el cual va a promover la internalización del DENV.

Una vez unido el virus al receptor, este requiere ser internalizado. La mayoría de los estudios realizados para DENV indican que este es proceso está mediado por clatrina, tanto en células de mosquito (Acosta *et al.* 2008, Mosso *et al.* 2008) como en células de mamífero (Alhoot *et al.* 2012, van der Schaar *et al.* 2008). Sin embargo, así como se logra la inhibición de la entrada a la célula mediada por clatrina a través del uso de compuestos inhibidores y de el uso de dominantes negativas de componentes de esta vía indican que esta es la vía de entrada usada por DENV, la falta de una total inhibición de la entrada del DENV; sugiere que el virus puede estar usando rutas alternativas (Acosta *et al.* 2009, Acosta *et al.* 2012).

La endocitosis mediada por clatrina inicia con la formación de pozas de clatrina en la membrana celular, la ubicación del receptor con la molécula cargo en una poza de clatrina; la curvatura y formación de una invaginación que dará origen a una vesícula, el corte o escisión de la vesícula a partir de la membrana y el desprendimiento de clatrina (Ramanan *et al.* 2011).

La dinamina es una proteína perteneciente a una familia de GTPasas que participan en el corte y remodelación de diversos organelos. Los miembros de esta familia comparten un dominio de GTPasa N-terminal así como un dominio de α -hélice intermedio y un dominio efector de GTPasa, un dominio de homología a plekstrina y un dominio rico en prolina y arginina. En la endocitosis mediada por clatrina, dinamina se ensambla sobre el cuello de la vesícula en formación constriñéndolo y provocando un aumento en la tensión en la membrana hasta inducir la fisión de la vesícula. Para llevar a cabo este proceso, dinamina requiere de la energía obtenida de la hidrólisis de GTP (Schmid *et Frolov* 2011) (Figura 7). Este proceso también se observa en otras vías de internalización como es la fagocitosis.

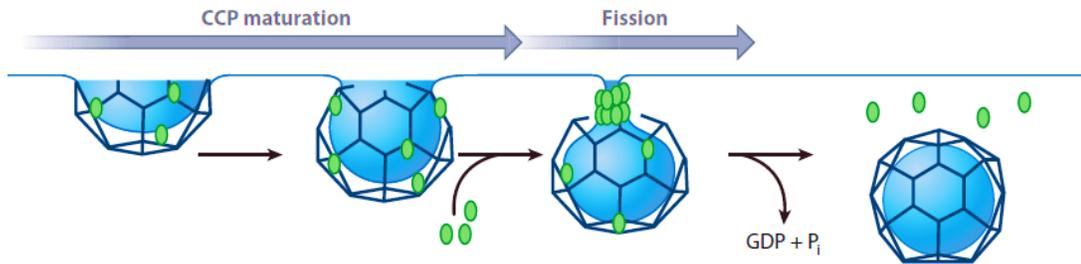


Figura 7. Endocitosis mediada por clatrina. Primero el receptor con la molécula cargo (DENV, por ejemplo) se ubica en una poza preformada de clatrina. Se induce la formación de la vesícula cubierta por clatrina. Posteriormente dinamina se ensambla en el cuello de la vesícula en formación y, a través de la hidrólisis de GTP, se produce la fisión de la vesícula a partir de la membrana celular (Schmid *et Frolov* 2011).

En el caso de virus unidos a anticuerpos en una concentración subneutralizante, la unión a la membrana celular se presenta a través de los receptores Fc γ , usando como ruta de entrada a la fagocitosis (Chawla *et al.* 2013, Rodrigo *et al.* 2006, Wu *et al.* 2012) inducida por la señalización iniciada por estos receptores (Boonnak *et al.* 2013).

2.7. Entrada del virus dengue en monocitos.

Alhoot y cols. (2011) estudiaron la ruta de entrada del DENV2 en monocitos de sangre periférica a través del silenciamiento por siRNA de una proteína asociada a CD-14, la cual ha sido señalada como receptor para el DENV en monocitos (Chen *et al.* 1999 y 1997, Kwan *et al.* 2005); y de la endocitosis mediada por clatrina por el silenciamiento de la cadena pesada de clatrina y de dinamina-2. El silenciamiento de cualquiera de estos factores mostró una disminución en la presencia de RNA viral en los sobrenadantes de las células infectadas mayor al 50% determinada por qRT-PCR. De manera que los autores concluyen que DENV2 utiliza a la proteína CD-14 como un receptor y la endocitosis mediada por clatrina para su entrada en monocitos primarios (Alhoot *et al.* 2011). Sin embargo, debido a que ninguno de los tratamientos logró más que un 50% de inhibición, la posibilidad de que DENV utilice vías de entrada alternas en estas células no puede ser descartada.

2.8. Tránsito del virus dengue dentro de la célula.

El DENV internalizado, ya sea por endocitosis mediada por clatrina o por fagocitosis, es dirigido a través de endosomas tempranos (Krishnan *et al.* 2007) hacia endosomas tardíos y, finalmente, a lisosomas para su degradación (van der Schaar *et al.* 2007, Somsel Rodman *et Wandinger-Ness* 2000). Sin embargo, las partículas virales en los endosomas tardíos, debido a la reducción del pH intraendosomal, sufren un cambio conformacional en la proteína E que induce la exposición del péptido fusogénico que interacciona insertándose en la membrana endosomal e induce la formación de un poro que permite la liberación de la cápside, conteniendo el genoma viral, en el citoplasma (Ang *et al.* 2010, Perera *et al.* 2008). Esta ruta general de tránsito del DENV en la célula está en controversia, puesto que Acosta y cols. (2012) observaron que algunos serotipos virales lo usan (DENV2), pero otros no (DENV1).

2.9. Importancia de los macrófagos en la infección por virus dengue.

Los macrófagos son células fagocíticas profesionales y también presentadoras de antígeno. En el primer caso, son la primera línea de defensa en el sistema inmune, como parte de la respuesta inmune innata; y en el segundo, como un enlace con la respuesta inmune adaptativa. Estas células fueron descubiertas en 1880 por Elie Metchnikoff en invertebrados, y posteriormente se observaron en vertebrados (Tauber 2003). Los macrófagos provienen de los monocitos, se originan en la médula osea a partir de un progenitor mieloide común. Estos son liberados al flujo sanguíneo en donde circulan por varios días antes de anclarse al endotelio en donde son diferenciados a macrófagos (Gordon *et Taylor* 2005). La migración y diferenciación de monocitos a macrófagos es aumentada después de la fagocitosis de partículas o la exposición a patógenos. La diferenciación de los macrófagos está influenciada por citocinas como IL-4 e IL-13 o el factor estimulante de colonias de macrófagos (*Macrophage Colony-Stimulating Factor* -M-CSF) que dirigen a una activación alterna, M2;

mientras que la presencia de IFN- γ o moléculas de patógenos como el LPS, dirigen a una activación tipo M1. Los dos tipos de macrófagos, M1 o M2, producen perfiles de citocinas distintos, pro- o anti-inflamatorio, respectivamente. Los macrófagos M1 actúan contra patógenos como bacteria y virus y producen grandes cantidades de citocinas. Los macrófagos tipo M2, pueden subdividirse en tres subtipos con funciones tales como la regulación de la respuesta inmune, el mantenimiento de la tolerancia y la reparación de tejido y heridas (Ying *et al.* 2013). Los monocitos/macrófagos se ha señalado como el blanco celular más importante para la infección por DENV *in vivo* (Halstead 1989, Halstead *et al.* 1977, Kou *et al.* 2008, Scott *et al.* 1980).

Ante una infección viral, la respuesta inmune esperada es una respuesta Th1. Sin embargo, durante la infección con DENV se ha observado una respuesta Th1 en etapas tempranas de la enfermedad y un cambio en etapas tardías (defervescencia) hacia una respuesta Th2, con una marcada presencia de IgE característica de esta última respuesta en las formas más severas de la enfermedad (Koraka *et al.* 2003, Mabalirajan *et al.* 2005, Míguez-Burbano *et al.* 1999). Chaturvedi *et al.* (1999, 2000) realizaron estudios *in vitro* que concuerdan con este cambio en la respuesta inmune. Estos autores midieron el perfil de citocinas producido en cultivos de leucocitos infectados con DENV, por ensayos de ELISA, y observaron que el primer día de infección se producen TNF- α , IL-2, IL-6 y el factor citotóxico. Al segundo día y tercer día aparece INF- γ . Los niveles de estas citocinas disminuyen rápidamente excepto el factor citotóxico humano e IL-2. Al cuarto y quinto día, aparecen IL-10 e IL-5, e IL-4, respectivamente (Chaturvedi *et al.* 1999, Chaturvedi *et al.* 2000). Así, la infección no solo induce un cambio a una respuesta inmune más permisiva, sino que además provoca alteraciones en las funciones de macrófagos provenientes de monocitos (Wati *et al.* 2007). Se ha observado que macrófagos M2, producto del estímulo de IL-4, aumentan su expresión del receptor de manosa, un receptor descrito para

dengue, lo cuál conlleva a un aumento en la susceptibilidad a la infección por el virus (Miller *et al.* 2008).

En resumen, se esperaría que el virus internalizado por los macrófagos fuera eliminado y se generara una respuesta Th1; sin embargo, estos muestran ser altamente permisivos a la infección por DENV y, además, se dirigen a una respuesta inmune tipo Th2 permisiva a la infección por el virus. Aunado a esto, la respuesta inmune generada provoca daño en tejido y permeabilidad capilar que conduce a fuga de plasma y hemorragia (Chaturvedi *et al.* 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Considerando que los macrófagos son células claves en la patogénesis del dengue debido a su capacidad secretora de citocinas y su papel en la diseminación del virus, cabe pensar que el bloqueo de la entrada del virus dengue a estas células podría ser una estrategia eficiente para el tratamiento de esta enfermedad.

4. HIPÓTESIS

La ruta de entrada seguida por el virus dengue en células U937 y U937-DC-SIGN es a través de endocitosis mediada por clatrina.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar la vía de entrada y tránsito de viriones en células U937 que expresan o no DC-SIGN.

5.2. Objetivos particulares

1. Determinar la participación de HSP70 y HSP90 como receptores en la entrada del virus dengue en la infección de células U937-DC-SIGN.
2. Evaluar la vía de entrada y tránsito del virus dengue en células U937 que expresan o no DC-SIGN.
3. Determinar la ruta de tráfico vesicular seguida por los virus en células U937-DC-SIGN.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cultivos celulares. Se usó la línea celular pro-monocítica U937 (ATCC® CRL1593.2™) y U937 expresando establemente DC-SIGN (U937-DC-SIGN), donada generosamente por el Dr. Aravinda M. de Silva de la Universidad de Carolina del Norte. Ambas líneas celulares se crecieron en medio Gibco® Advanced RPMI 1640 reducido en suero. También se usaron las líneas celulares BHK-21 y C6/36, derivadas de riñón de hámster y de mono, respectivamente. La primera línea se mantuvo en medio Gibco® DMEM y la segunda con medio Gibco® MEM. Para las tres primeras líneas celulares, el medio fue suplementado con 5% de suero fetal bovino (Invitrogen), aminoácidos no esenciales, 110 mg L⁻¹ de piruvato de sodio, L-glutamina 4 mM, 5 U mL⁻¹ de penicilina y 5 µg mL⁻¹ de estreptomina (Gibco®), y en el caso de la línea celular C6/36 se usó 7% de suero fetal bovino. Este medio fue denominado medio completo. Las células de las líneas U937 y U937-D-SIGN, se diferenciaron a macrófagos por la adición de acetato de forbol miristato (PMA; Sigma Aldrich) a una concentración final de 160 nM por 48 h. Las células se dejaron reposar con medio completo sin PMA por 24 h antes de su tratamiento o infección. En todos los casos las células se mantuvieron en una incubadora (NUAIRE US Autoflow, o Forma Scientific Modelo 3233) a 37°C en 5% de CO₂, excepto las células C6/36, las cuales se incubaron a 34°C.

6.2. Propagación y titulación viral. La propagación del virus utilizando en este estudio (dengue serotipo 4, cepa viral H241) se hizo en cerebro de ratones lactantes CD-1 de 3 o 4 días de nacidos. A los 5 días post-inoculación, se sacrificaron los ratones y se extrajo el cerebro usando una jeringa para un volumen de 10 mL. Los cerebros se maceraron usando un homogeneizador tipo Dounce. La suspensión obtenida se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se repitió el procedimiento de centrifugación reduciendo el tiempo a 15 minutos. Este último paso se repitió hasta obtener un clarificado libre de precipitado. El clarificado se pasó por un filtro de 0.22 µM. La suspensión o clarificado

obtenido se alicuotó y conservó a -70°C hasta su uso. También se obtuvo un clarificado a través del mismo procedimiento pero sin llevar a cabo la inoculación del virus, la suspensión obtenida por este procedimiento se denominó “mock” y se utilizó como control. Así mismo, se realizó la propagación viral en células C6/36, en cuyo caso se infectaron con una $\text{MOI} = 1$, se incubaron a 34°C durante 8 días adicionando carbonato de sodio cada tercer día para mantener el pH. El título viral se determinó por un ensayo de plaqueo por dilución limitante en base 10 en células BHK-21. Se usaron aproximadamente 3×10^4 células por pozo en una multiplaca con 24 pozos y se permitió su crecimiento por 24 h. Se prepararon las diluciones del virus en solución amortiguadora Hank's (GIBCO® Hank's Balanced Salt Solution) agregando 50 μL de suspensión o clarificado viral a un volumen de 450 μL de medio. Se hicieron diluciones seriales hasta 1:10⁸. Se retiró el medio a las células y se agregaron 200 μL de la dilución correspondiente a cada pozo por duplicado. Se incubaron las células durante 1 h a 37°C en 5% de CO_2 . Posteriormente, se agregó 1 mL de medio MEM con 0.8% de carboximetilcelulosa a cada pozo. Se incubaron las células por 5 días a 37°C en 5% de CO_2 . Se retiró el medio y se agregaron 500 μL de una solución de Naftol BlueBlack [0.5 g de Naftol Blue Black (Sigma), 7.8 g de acetato de sodio (Sigma), 30 mL de ácido acético glacial (J.T.Backer) y agua bidestilada c.b.p 500 mL]. Las células se incubaron a T. A. por 20 min. Las placas se lavaron sumergiéndolas cuidadosamente en agua corriente. Se retiró el exceso de agua y se cuantificaron las placas visualmente. El título se expresó como UFP/mL.

6.3. Compuestos inhibidores y anticuerpos. Los compuestos bafilomicina A1, dansilcadaverina y dynasore®, fueron todos obtenidos de Sigma Aldrich, y los anticuerpos contra HSP70 (K-20), HSP90 (AB3466) y Anexina V (sc-4252) fueron obtenidos de Chemicon o Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos contra Rab5 (N1C3) y Rab7 [EPR7588(B)] se obtuvieron de GeneTex, Inc., y el anticuerpo anti-DENV (D1-4G2-4-15) se obtuvo de ATCC® HB112™.

6.4. Ensayos de viabilidad celular luego del tratamiento con compuestos inhibidores. Se realizó la medición de la viabilidad celular tras el tratamiento con diferentes concentraciones de cada compuesto inhibidor: para células U937: Dansilcadaverina: 50, 75 y 100 μM . Dynasore[®]: 40, 80 y 100 μM . Bafilomicina A1: 50, 100 y 150 nM. Para células U937-DC-SIGN: Dansilcadaverina: 30, 50, 70 y 90 μM . Dynasore[®]: 60, 70, 80 y 90 μM . Bafilomicina A1: 50, 100, 150 y 200 nM) de los compuestos inhibidores por el método colorimétrico MTS basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTS-CellTiter 96[®]AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; PROMEGA) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células U937 y U937-DC-SIGN sembradas y diferenciadas a macrófagos en placas con 96 pozos, se lavaron 2 veces posteriormente al tratamiento y se agregaron 50 μL de medio con 10 μl MTS por pozo. Se incubó la placa por 1 h a 37 °C en 5% de CO₂. Finalmente, se determinó la densidad óptica usando un lector de placas de ELISA a una absorbancia de 490 nm con una longitud de onda de referencia de 630.

6.5. Ensayos de determinación del efecto de los compuestos inhibidores en las líneas celulares U937 y U937-DC-SIGN. Se sembraron 2×10^5 células U937 o U937-DC-SIGN sobre laminillas (Corning) en multiplacas con 24 pozos. Las células se diferenciaron a macrófagos y se trataron con los compuestos inhibidores por 2 h manteniéndolas a 37 °C en 5% de CO₂. Las células U937 se trataron con 75 μM de dansilcadaverina, 80 μM de dynasore[®] y 50 nM de bafilomicina A1. Las células U937-DC-SIGN se trataron con 90 μM de dansilcadaverina, 80 μM de dynasore[®] y 100 nM de bafilomicina A1. Para ambas líneas celulares, la determinación del efecto de dansilcadaverina y dynasore[®] se hizo midiendo la endocitosis de 20 μM de transferrina acoplada a Alexa 555 (Invitrogen). El efecto de bafilomicina A1 se midió observando la presencia de marca fluorescente con Lyso Tracker[®]Red 20nm (DND-99; Invitrogen). Ambos compuestos, transferrina-

A-555 y Lyso Tracker[®], se agregaron a las células incubándolas por 1 h a 37 °C en 5% de CO₂. Posteriormente, las células se lavaron en dos ocasiones con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % por 1 h a 37 °C. Finalmente, las células se montaron en un portaobjetos usando 3 µL de Vectashield-DAPI (Vector laboratories). Se usaron como control, células incubadas con la concentración de transferrina y Lyso Tracker[®] indicada pero sin tratamiento. Las células se observaron por microscopía confocal y se tomaron micrografías de las células más representativas para cada condición.

6.6. Ensayos de inhibición de la entrada viral por uso de compuestos inhibidores y anticuerpos contra HSP70 y HSP90. Se sembraron células en multiplacas con 24 pozos que, posterior a la diferenciación, se alcanzaron aproximadamente 2×10^5 células por pozo. Se incubaron las células con 200 µL de gamma globulina humana (300 mg/mL) en medio sin suero y sin antibióticos/antimicóticos a una concentración de 1:50 por 30 minutos a 4°C para bloquear los receptores Fcγ. Posteriormente, se lavaron las células con PBS (pH 7.4) estéril y se incubaron con diluciones de anticuerpos, 1:100 y 1:300, dirigidos contra HSP70, HSP90 o un anticuerpo no relacionado (α-Anexina V), utilizado como control. El volumen final usado fue de 200 µL. Las células se incubaron por 1 hora a 4°C. Se lavaron las células con PBS y se agregó el virus a una multiplicidad de infección (MOI) igual a 1, en 200 µL de medio sin suero y sin antibióticos/antimicóticos. Se permitió la infección de los macrófagos por 1 hora a 37 °C en 5% de CO₂. Se eliminaron los virus no internalizados agregando glicina ácida (pH3) (20 µL) en el medio de infección a cada pozo. Se lavaron las células con PBS estéril por tres ocasiones y, finalmente, se agregaron 500 µL de medio completo. Las células se incubaron por 24 horas a 37 °C en 5% de CO₂. Se colectaron 200 µL del sobrenadante y se conservó a -20 °C hasta su uso.

6.7. Extracción de RNA viral. Se usó el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) para extraer y purificar el RNA viral a partir de 140 μL de sobrenadante de células U937 o U937-DC-SIGN diferenciadas a macrófagos. El RNA fue eluído con 60 μL de buffer de elución y almacenado a -20°C para su uso dentro de las siguientes 48 horas o a -80°C para lapsos mayores de tiempo. El procedimiento de extracción de RNA fue el siguiente: se preparó el acarreador de RNA a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, agregando 310 μL de buffer AVE a un vial con 310 μg de acarreador de RNA. Se tomaron 5.6 μL de la solución anterior y se mezclaron con 560 μL de la solución de lisis AVL. De dicha mezcla se tomaron 560 μL y se colocaron en un tubo tipo eppendorf con capacidad para 1.5 mL, en el mismo tubo se agregaron 140 μL de clarificado, se mezcló e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 560 μL de etanol absoluto frío (-20°C) y se mezcló por 15 segundos. Se tomaron 630 μL de la mezcla anterior y se colocaron en una columna con tubo colector, se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto a 4°C . Se cambió el tubo colector y se repitió el paso anterior. Se cambió el tubo colector y se adicionaron 500 μL de buffer AW1 a la columna, se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto a 4°C . Se cambió el tubo colector y adicionaron 500 μL de buffer AW2 a la columna, se centrifugó a 14 000 rpm por 3 minutos a 4°C . Se colocó la columna en un tubo tipo eppendorf para microcentrífuga de 1.5 mL estéril, se adicionaron 60 μL de solución AVE, se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto a 4°C para obtener RNA purificado. Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada (MIKO).

6.8. Ensayos de RT-PCR en tiempo real. Se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Johnson *et al.* (2005) bajo un sistema de detección en tiempo real basada en la hidrólisis de iniciadores fluorogénicos TaqMan®. La reacción de RT-PCR se realizó en un solo tubo, utilizando 2 μL del RNA. Se usaron 0.05 μL (100 pmol) de cada iniciador, D4F y D4C (Molbiol), 0.018 μL (25 pmol) de la sonda serotipo-específica –D4P– (Molbiol), 2.682 μL de agua DEPC, 5 μL de 2X Reaction Mix (solución amortiguadora con 0.4 Mm de cada dNTP y 6 mM MgSO_4) y 0.5 μL de la mezcla de enzimas SuperScript^R

III Platinum[®] One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen), para un volumen total de mezcla de 10 μ L por reacción. La secuencia de nucleótidos de los iniciadores dirigidos contra un fragmento del gen de la proteína E fueron: para D4F, TTGTCCTAATGATGCTGGTCG (en la posición 904 del genoma viral); para D4C: TCCACCTGAGACTCCTTCCA (posición 992); y D4P, TTCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG (posición 960). La sonda se utilizó acoplada a Quasar670[®] y un termoquencher tipo BHQ-3[®] (Black Hole Quencher[®]). La amplificación y la detección en tiempo real se realizó con el siguiente protocolo: transcripción reversa a 50°C por 30 min, 1 ciclo inicial a 95°C por 10 min; posteriormente 40 ciclos a 95°C por 15 s y 60°C por 1 min, con colección de datos de fluorescencia tras cada ciclo. Como control negativo de reactivos se usó agua grado biología molecular. Se utilizó como control positivo del proceso 2 μ L de RNA de DENV4. Se usó un termociclador Eco Real-Time PCR System (Illumina) generosamente proporcionado por el Dr. Pedro Luna del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV. Los datos generados fueron analizados con el software EcoStudy versión 4.0.4420. Se determinó como negativa aquella muestra que presentó un Cq mayor a 38 ciclos.

6.9. Curva estándar de correlación entre Cq y UFP/mL. Para hacer cuantitativos los datos generados a partir de la qRT-PCR, se realizó una curva estándar utilizando RNA extraído a partir de 140 μ L de sobrenadante de células C6/36 infectadas con una MOI de 1 y recolectados 8 días post-infección. Se hicieron 7 diluciones seriales con base 10 del RNA inicial (16 μ g/ μ L).

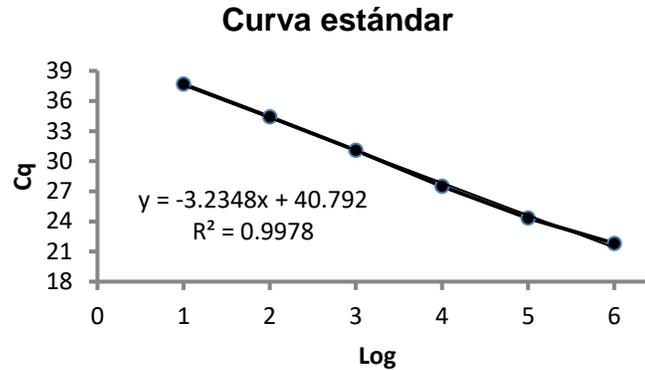


Figura 8. Curva estándar de correspondencia entre RNA y Cq. Se realizó la infección de células C6/36 con una MOI igual a 1. Se permitió la infección por 8 días y se colectó el sobrenadante a partir del cual se realizó la medición del título viral y la extracción de RNA. Se realizó qRT-PCR para 7 diluciones seriales con base 10 del RNA viral extraído. n = 2.

En la Figura 8 se señala la ecuación que describe un valor de pendiente de -3.24, cercano al valor esperado de -3.33, el cual indica la eficiencia óptima de la PCR; así mismo, se observa un valor de R^2 igual a 0.9978, que nos permite correlacionar los valores de Cq con los valores de RNA, y por lo tanto de UFP/mL de manera confiable.

Para hacer la correlación de los Cq obtenidos por qRT-PCR y el valor de UFP/mL, se llevó a cabo una curva estándar (Figura 9).

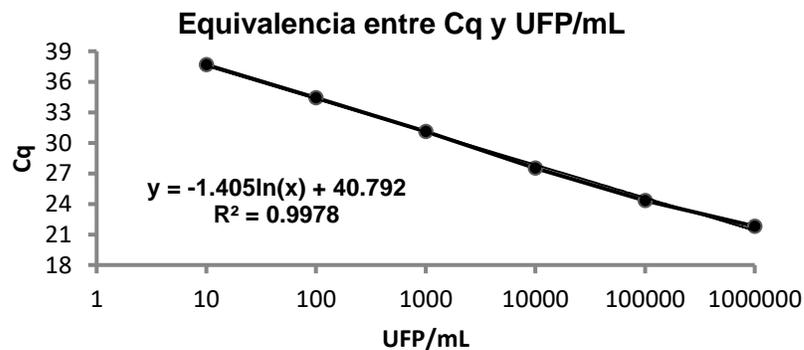


Figura 9. Curva de equivalencia entre los valores entre Cq y UFP/mL. Se llevó a cabo la titulación del virus presente en el sobrenadante de células C6/36 previamente infectadas con una MOI igual a 1 e incubadas por 8 días. Simultáneamente se realizó la extracción de RNA viral de 140 μ L del mismo sobrenadante. Se realizó qRT-PCR para 7 diluciones seriales con base 10 del RNA viral extraído y se calculó la cantidad de UFP equivalentes/mL de sobrenadante. n = 2.

La curva estándar se hizo utilizando RNA extraído a partir de 140 μL de sobrenadante de células C6/36 infectadas con DENV4. Un volumen de 50 μL del mismo sobrenadante se utilizó para determinar el título viral (por triplicado) en células BHK-21. Debido a que el título viral obtenido está dado en unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL) y el volumen de RNA utilizado en la qRT-PCR es de 2 μL que provienen de 60 μL de RNA total obtenido a partir de 140 μL del sobrenadante, se utilizó la siguiente fórmula: $\text{UFP/mL} = \{(1000 \mu\text{L} / 140 \mu\text{L}) * [(2 \mu\text{L} * 140 \mu\text{L}) / 60 \mu\text{L}]\} * \text{UFP/mL}$. El título viral obtenido fue de 3×10^5 UFP/mL. Por lo tanto, la concentración inicial del RNA utilizado correspondió a 1×10^7 UFP/mL. Una vez obtenida la fórmula, ésta se utilizó para transformar los valores de C_q de cada experimento de qRT-PCR a UFP equivalentes/mL.

6.10. Determinación de la presencia del antígeno NS1 del virus dengue por ELISA. Se determinó la presencia del antígeno NS1 del DENV en el sobrenadante de las células U937-DC-SIGN tratadas con compuestos inhibidores mediante la prueba Platelia™ Dengue NS1 Ag (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France) conforme al protocolo propuesto por el fabricante. Brevemente, se agregaron sucesivamente en cada pozo: 70 μL de diluyente (tampón fosfato, Tween®20, suero de feto de ternera, <1.5% ProClin™300), 30 μL de muestra y 100 μL de conjugado diluido [conjugado (50x): diluyente-1:50. AcM anti-NS1 combinado con peroxidasa, <1.5% ProClin™300, diluyente]. Se incubó la microplaca en baño maría durante 90 ± 5 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Al finalizar la incubación, cada pozo se lavó 6 veces con 300 μL de la solución de lavado. Se distribuyeron 160 μL de sustrato TMB [3,3',5,5'tetrametilbencidina (<0.1%), H_2O_2] en todos los pozos. Se permitió el desarrollo de la reacción en la oscuridad durante 30 ± 5 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción enzimática añadiendo 100 μL de la solución de paro (Ácido sulfúrico 1N) a cada pozo. Las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 620 nm con un lector de microplacas de ELISA (ELx808 Absorbance Microplate Reader - Bio-Tek Instruments). Los resultados se

expresan en porcentaje de NS1-DENV con respecto a la infección directa MOI 1. Este ensayo se realizó con sobrenadantes conservados 24 h en refrigeración.

6.11. Ensayos de determinación de co-localización de la proteína E del virus dengue con Rab5 y Rab7 en la línea celular U937-DC-SIGN. Se sembraron 2×10^5 células U937-DC-SIGN sobre laminillas (Corning) en multiplacas con 24 pozos. Las células se diferenciaron a macrófagos. Se incubaron con DENV4 a una MOI=10 (Rab5) o una MOI=5 (Rab7 y DENV4), durante 2 h a 4°C. Se transfirieron a 37°C y se mantuvieron por 12, 15 y 20 minutos (Rab5, DENV4 y Rab7, respectivamente). Posteriormente, se realizó la fijación de las células utilizando 500 μ L de para-formaldehído al 4% a 37°C por 30 min. Las células se lavaron 3 veces con 500 μ L PBS y se permeabilizaron al tratarlas con 200 μ L una solución de tritón al 1% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células 3 veces con PBS. Para marcar la presencia de las GTPasas Rab5 (Rab 5B antibody, clona N1C3. GeneTex Inc.) y Rab7 [Rab7A, clona EPR7588(B). GeneTex Inc.], y el DENV [D1-4G2-4-15 (ATCC® HB112™)]; primero se utilizó una solución de PBS con un 10% de suero fetal bovino como solución de bloqueo de blancos inespecíficos durante 30 minutos a temperatura ambiente; y posteriormente, las células se incubaron con una solución con los anticuerpos dirigidos contra Rab5 o Rab7 (1:500) o 4G2 (dirigido contra la proteína E del virus DENV, 1:500) en PBS y 10% de solución permeabilizadora. Esta interacción se permitió durante 3 h a 37°C. Después, las células se lavaron 3 veces con una solución de PBS y 0.5% de tritón, y una vez con PBS. Como marcaje secundario, se utilizó un anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa-594 (Invitrogen) en el caso de los anticuerpos contra Rabs y anti-ratón acoplado a ficoeritrina [Goat Anti-Mouse IgG1 (γ 1 chain specific), SouthernBiotech] en el caso del anticuerpo 4G2. Las células se incubaron por 2 h a temperatura ambiente y posteriormente fueron lavadas 3 veces con una solución de PBS y 0.5% de tritón, dos veces con PBS y enjuagadas en una ocasión con agua. Finalmente, las células se

montaron en un portaobjetos usando 3 μL de Vectashield-DAPI (Vector laboratories). Como control se utilizaron células tratadas como se indica anteriormente sin el uso del anticuerpo primario para cada caso. Las células se observaron por microscopía confocal y se tomaron micrografías de las células más representativas para cada condición.

6.12. Análisis estadístico. La diferencia entre los resultados obtenidos con el control y los diferentes tratamientos se analizó usando el programa para análisis estadístico GraphPad Prism versión 5.01. Se realizó el análisis de la varianza de los datos de una vía por ANOVA, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett en todos los casos. Se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. El tratamiento con PMA por 48 h y 24 h de reposo induce la diferenciación de las células U937 y U937-DC-SIGN de monocitos a macrófagos.

Estudios previos han demostrado que el uso de PMA en células monocíticas induce la diferenciación de éstas a macrófagos (Daigneault *et al.* 2010, Huberman *et al.* 1979, Sintiprungrat *et al.* 2010, Vongsakul *et al.* 2011). Uno de los principales cambios observados, es la expresión de una integrina, CD11c, la cual participa en la adhesión de las células a un sustrato (Shelley *et al.* 2002). Cuando las células son tratadas con PMA y se permite un periodo adicional de reposo, éstas se unen más firmemente y muestran un incremento en el número de organelos en el citoplasma celular, como mitocondrias y lisosomas (Daigneault *et al.* 2010).

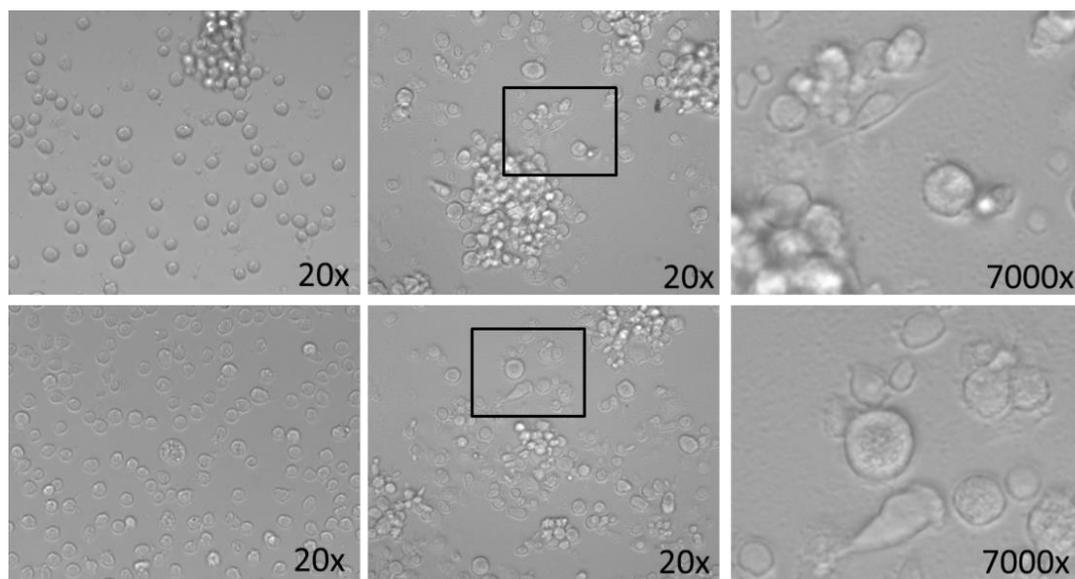


Figura 10. Células U937 y U937-DC-SIGN antes y después de ser diferenciadas a macrófagos. A células U937 y U937-DC-SIGN, se les trató con 160nM de PMA durante 48 h y se les permitió el reposo durante 24 h adicionales. Panel superior, células U937. A la izquierda, células promonocíticas no diferenciadas, 20x. Al centro, células diferenciadas, 20x. A la derecha, un acercamiento de 7000x de la región señalada en un cuadro en la imagen central. Panel inferior, células U937-DC-SIGN. A la izquierda, células promonocíticas no diferenciadas, 20x. Al centro, células diferenciadas, 20x. A la derecha, un acercamiento de 7000x de la región dentro del cuadro con marco negro de la imagen central.

Las células U937 se encuentran en suspensión con una morfología redonda-ovalada. Cuando son tratadas con PMA, se diferencian a macrófagos iniciando con un proceso de adhesión. Como se observa en la Figura 10, las células diferenciadas presentan diversas formas, principalmente redondas; sin embargo, también presentan prolongaciones que aumentan la superficie de adhesión al sustrato. Las micrografías muestran que la expresión adicional de DC-SIGN por las células U937 no dirige a una diferencia morfológica visible al microscopio óptico, con respecto a la línea celular parental, U937. Estas células conservan un nivel similar de adhesión; sin embargo, las células U937 tienden a agruparse en cúmulos más frecuentemente y de mayor tamaño que las U937-DC-SIGN.

7.2. HSP70 y HSP90 participan en la infección por DENV4 a células U937 y U937-DC-SIGN.

En estudios previos en el laboratorio se determinó que las proteínas HSP70 y HSP90 forman parte de un complejo receptor para el DENV en células U937 diferenciadas a macrófagos (Reyes-del Valle *et al.* 2005). Como se señaló anteriormente, células tipo macrófagos obtenidas a partir de células U937-DC-SIGN son significativamente más permisivas a la infección que las obtenidas de células U937. Para conocer si las proteínas HSP70 y HSP90 en la superficie de membrana actúan como un complejo receptor también en las células U937-DC-SIGN, realizamos el bloqueo de las proteínas HSP70 y HSP90 usando anticuerpos dirigidos contra éstas en diferentes concentraciones y fueron infectadas con DENV4 a una MOI de 1. Se tomaron los sobrenadantes 24 h.p.i. para evaluar la posible inhibición de la infección producida por este tratamiento. Estos cambios se cuantificaron por una diferencia en la producción de progenie viral medida por qRT-PCR.

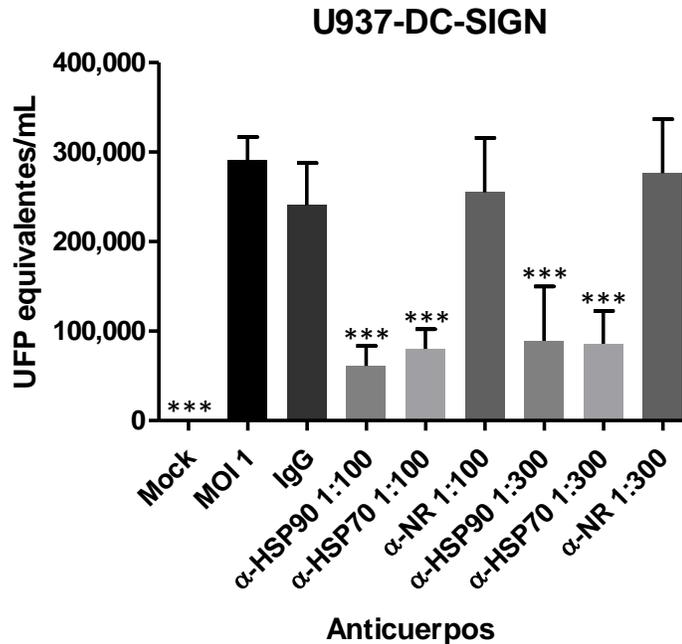


Figura 11. Medición de los niveles de progenie viral en células U937-DC-SIGN mediante RT-PCR tiempo real posterior al tratamiento con anticuerpos contra HSP70 y HSP90 y la posterior infección con DENV4. Aproximadamente 2×10^5 células U937-DC-SIGN (diferenciadas a macrófagos) fueron incubadas gamma globulina (IgG) y con anticuerpos contra HSP70, HSP90 o un anticuerpo no relacionado (α -HSP70, α -HSP90 o α -NR) a diferentes diluciones (1:100 y 1:300) antes de ser infectadas con DENV4. Se colectaron los sobrenadantes a las 24 h.p.i., se extrajo el RNA viral y se detectó la progenie viral por un ensayo de RT-PCR en tiempo real. Se graficaron los valores de UFP equivalentes/mL para cada condición. $n = 6$. ANOVA de una vía con prueba Dunnett, $p < 0.05$, las barras de error son +DS.

Como se observa en la Figura 11, el tratamiento con anticuerpos contra las proteínas HSP70 (~80,000 y ~86,000 UFP equivalentes/mL; dilución 1:100 y 1:300, respectivamente) o HSP90 (~60,000 y ~89,000 UFP equivalentes/mL; dilución 1:100 y 1:300, respectivamente), provoca una disminución en las UFP equivalente/mL con respecto a aquellas que se infectaron directamente (MOI 1) (~290,000 UFP equivalentes/mL). La disminución se observó para ambas diluciones de anticuerpos utilizadas, aunque no se observó una reducción dosis dependiente. Estos resultados indican una disminución mayor al 60% en la progenie viral derivada de células tratadas con α -HSP70 ó α -HSP90. Debido a que este efecto no se observa en las células que se trataron solamente con gamma globulina (IgG) o un anticuerpo no relacionado (α -NR) antes de la infección, estos resultados

sugieren que las proteínas HSP70 y HSP90 forman parte del complejo receptor para DENV en células U937-DC-SIGN.

Con el objetivo de corroborar estos resultados, realizamos el mismo tratamiento en células U937 que no expresan DC-SIGN, para las cuales el uso de HSP70 y HSP90 como parte del complejo receptor ya había sido reportado (Reyes-del Valle 2005).

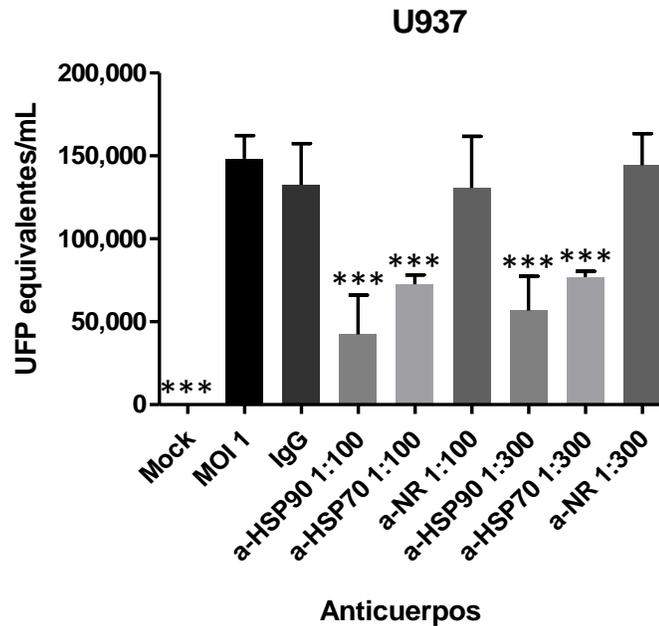


Figura 12. Medición de los niveles de progenie viral en células U937 mediante RT-PCR tiempo real posterior al tratamiento con anticuerpos contra HSP70 y HSP90 y la posterior infección con DENV4. A células, 2×10^5 , U937 diferenciadas a macrófagos, se les incubó con gamma globulina y además con anticuerpos contra HSP70, HSP90 o un anticuerpo no relacionado (α -HSP70, α -HSP90 o α -NR) a diferentes diluciones (1:100 y 1:300) antes de ser infectadas con DENV4. Se colectaron los sobrenadantes a las 24 h.p.i., se extrajo el RNA viral y se detectó la progenie viral por un ensayo de RT-PCR en tiempo real. Se graficaron los valores de UFP equivalente/mL para cada condición. $n = 8$. ANOVA de una vía con prueba Dunnett, $p < 0.05$, las barras de error son +DS.

En la Figura 12 se puede observar que el tratamiento de las células U937 con los anticuerpos α -HSP70 y α -HSP90 resulta en un comportamiento similar al observado en las células U937-DC-SIGN (Figura 11), en el que se detectó una disminución significativa en la presencia de progenie viral en los sobrenadantes de células infectadas cuando éstas son tratadas previamente con anticuerpos bloqueadores de la interacción entre el DENV y las proteínas

HSP70 (~72,000 y ~76,000 UFP equivalentes/mL; dilución 1:100 y 1:300, respectivamente) y HSP90 (~42,000 y ~57,000 UFP equivalentes/mL; dilución 1:100 y 1:300, respectivamente) con respecto a las células infectadas directamente (~148,000 UFP equivalentes/mL). Estos resultados que concuerdan con lo observado por Reyes-del Valle y cols. (2005), permiten sugerir que efectivamente las proteínas HSP70 y HSP90 participan en la infección de las células U937-DC-SIGN, posiblemente como parte del complejo receptor del DENV. Los valores de UFP equivalentes/mL se resumen en la Tabla 3 del Anexo 1.

7.3. El DENV4 utiliza la vía de entrada mediada por clatrina y un pH ácido para su internalización en células U937 y U937-DC-SIGN.

Una vez unido el DENV a sus receptores en la superficie celular, éste es internalizado en la célula. La vía de internalización o entrada a la célula más comúnmente observada para el DENV es aquella mediada por clatrina. En esta vía de entrada, los receptores con el virus unido son dirigidos a pozas de clatrina que, posteriormente, dan origen a una vesícula cubierta por clatrina que es escindida a partir de la membrana celular. Tal escisión está regulada por la actividad de dinamina (Schmid et Frolov 2011).

El uso de compuestos inhibidores para el estudio de las rutas endocíticas es una estrategia frecuentemente recurrida. Dansilcadaverina es uno de los compuestos más utilizados para el estudio de la endocitosis mediada por receptor (Davies *et al.* 1980, Haigler *et al.* 1980, Levitzki *et al.* 1980), como ha sido el caso de clatrina (Chu *et al.* 2004, McMahon *et al.* 2011, Navarro-García *et al.* 2007, Wang *et al.* 2003) en la endocitosis del DENV (Acosta *et al.* 2008, Acosta *et al.* 2011) y chikungunya (Lee *et al.* 2013). Otro fuerte inhibidor de esta vía endocítica es dynasore®, un compuesto que eficientemente bloquea la actividad de dinamina, evitando la formación de la vesícula cubierta por clatrina (Lee *et al.* 2013, Varkevisser *et al.* 2013).

Con base en lo anterior, se eligió a la dansilcadaverina y al dynasore® para evaluar si la endocitosis mediada por clatrina es la ruta de entrada utilizada por DENV a las células U937 que expresan o no DC-SIGN. Para ello se determinaron las concentraciones óptimas de cada uno de estos compuestos inhibidores mediante la medición del efecto de diversas concentraciones sobre la viabilidad celular, así como su efecto en la entrada de transferrina tanto en células U937 como U937-DC-SIGN. Además, se evaluó la viabilidad de las células expuestas a DMSO, vehículo en el cual se diluyeron los componentes.

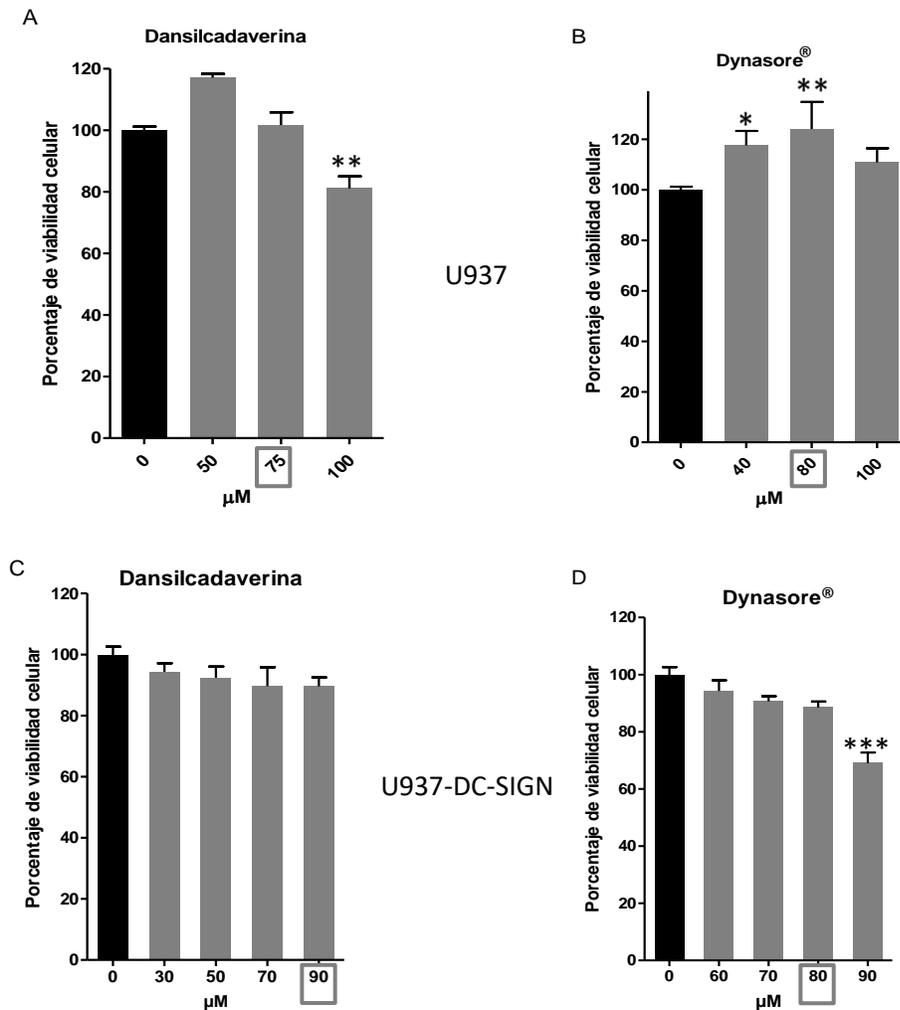


Figura 13. Medición de la viabilidad celular de células U937 y U937-DC-SIGN bajo el tratamiento con diferentes concentraciones de dansilcadaverina y dynasore®. Se trataron células, U937 (A y B) y U937-DC-SIGN (C y D) con concentraciones crecientes de dansilcadaverina y dynasore. Se incubaron por 2 h con los compuestos inhibidores, posteriormente se mantuvieron 24 h con medio completo (a 37°C y 5% de CO₂) y se realizó la medición de la viabilidad celular por el método MTS. n = 6. ANOVA de una vía con prueba Dunnett, p<0.05, las barras de error son +DS.

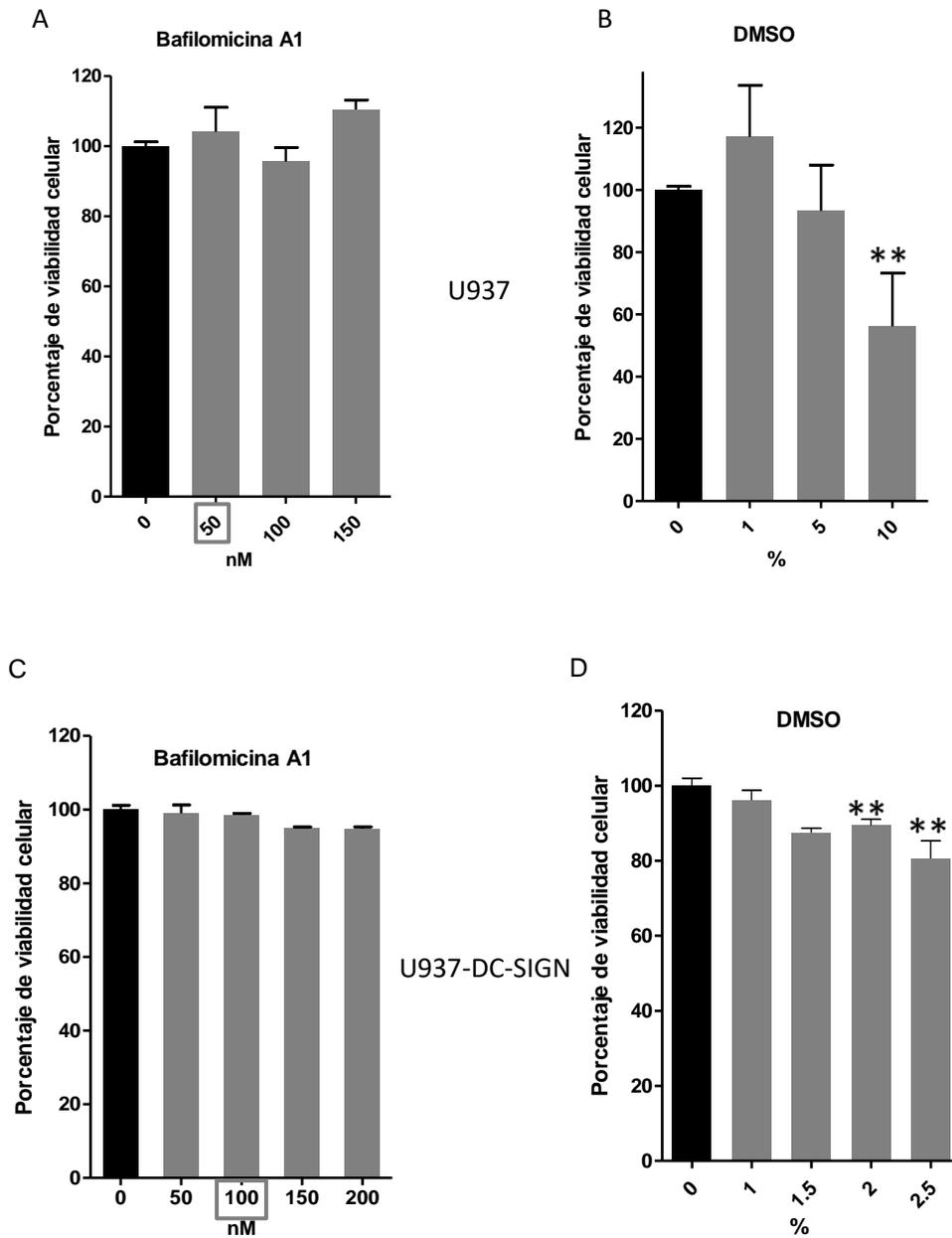


Figura 14. Medición de la viabilidad celular de células U937 y U937-DC-SIGN bajo el tratamiento con diferentes concentraciones de bafilomicina A1. Se trataron células, U937 (A y B) y U937-DC-SIGN (C y D) con concentraciones crecientes de bafilomicina A1. Se midió el efecto sobre la viabilidad celular de dimetil sulfóxido (DMSO), vehículo de los compuestos inhibidores, bajo diferentes concentraciones. Las células se incubaron por 2 h con el compuesto inhibidor o DMSO, posteriormente se mantuvieron 24 h con medio completo (a 37°C y 5% de CO₂) y se realizó la medición de la viabilidad celular por el método MTS. n = 6. ANOVA de una vía con prueba Dunnett, p<0.05, las barras de error son +DS.

Con base en los resultados obtenidos y en lo reportado en la literatura, se definieron las concentraciones óptimas de trabajo seleccionando aquellas

en las que los compuestos inhibidores que no mostraron un efecto negativo significativo en la viabilidad celular. Las concentraciones seleccionadas de los compuestos inhibidores para las células U937 fueron: 75 μ M de dansilcadaverina, 80 μ M de dynasore® y 50 nM de bafilomicina A1. En el caso de las células U937-DC-SIGN se eligieron las siguientes concentraciones: 90 μ M de dansilcadaverina, 80 μ M de dynasore® y 100 nM de bafilomicina A1 (Figuras 13 y 14).

Después de determinar las concentraciones óptimas de cada uno de los compuestos inhibidores, se buscó conocer si éstas tenían el efecto esperado sobre sus blancos. Para evaluar el efecto de dansilcadaverina y dynasore® se seleccionó transferrina marcada con un fluorocromo (Alexa 555), debido a que esta proteína es internalizada vía clatrina y ha sido frecuentemente usada en el seguimiento del efecto de compuestos inhibidores en la entrada mediada por clatrina (Blaising *et al.* 2013).

Así mismo, para evaluar el efecto de bafilomicina A1, se usó Lyso Tracker®. Este compuesto presenta tropismo por organelos acídicos y se ha usado para marcar la presencia de lisosomas en macrófagos (Daigneault *et al.* 2010). Así mismo, se ha utilizado para determinar el efecto de compuestos que interfieren en la reducción del pH en la célula (Fang *et al.* 2013) y posterior al uso de compuestos que afectan la acidificación de endosomas como es el caso de la bafilomicina A1 (Mosso *et al.* 2008).

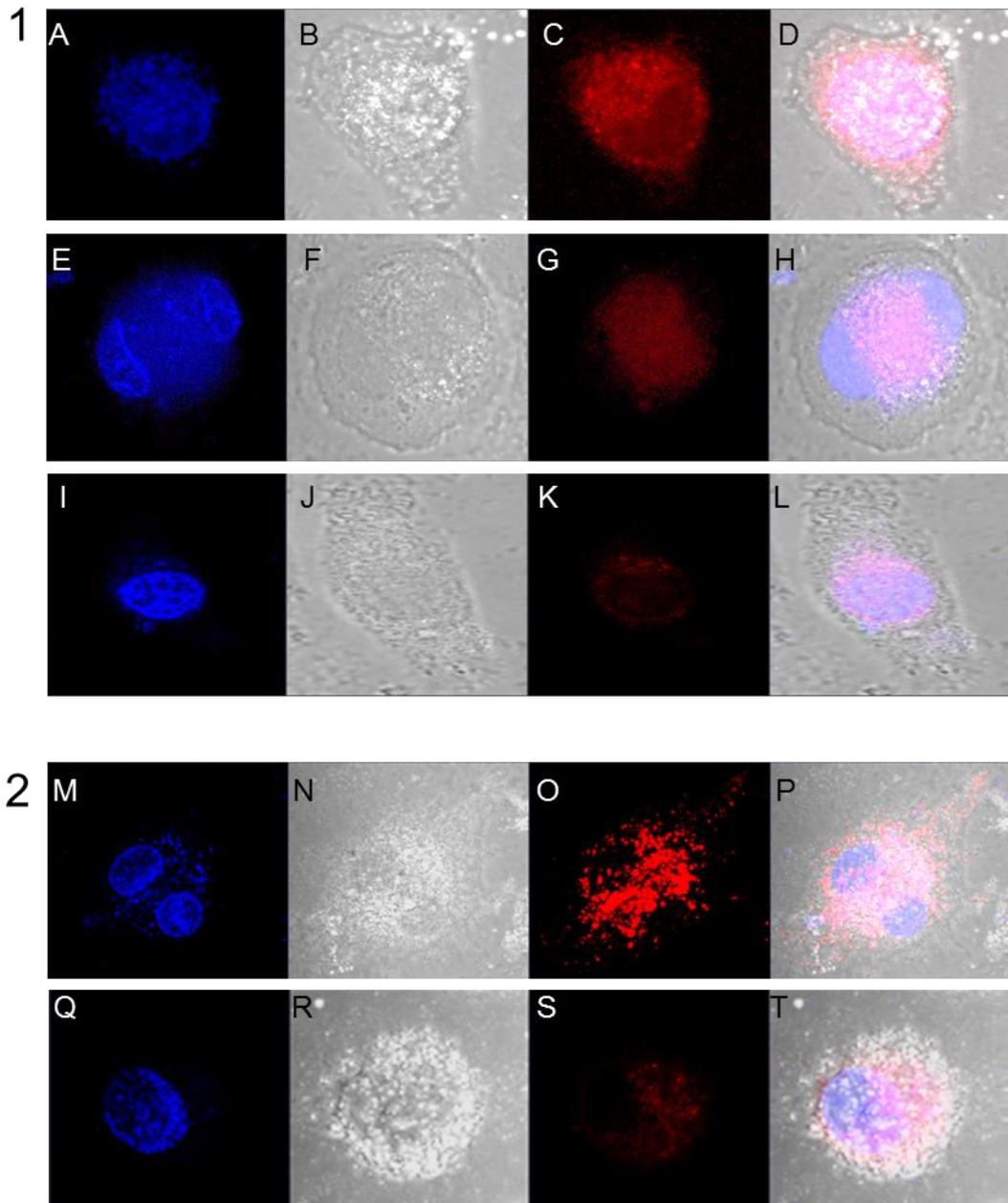


Figura 15. Determinación del efecto de los compuestos inhibidores sobre la endocitosis de transferrina y la acidificación de vesículas en células U937. Se trataron células U937 con una concentración de 75 μM de dansilcadaverina (Panel 1: E-H), 80 μM de Dynasore® (Panel 1 I-L) y 50 nM de bafilomicina A1 (Panel 2: Q-T); durante 2 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Posteriormente, se incubaron con 20 μM de transferrina acoplada a Alexa-555 (Panel 1: rojo; C-D, G-H y K-L) o 20 nm Lyso Tracker® (Panel 2: rojo; O-P y S-T) durante 1 h a 37°C con 5% de CO_2 . Se montaron las células para microscopia confocal. Se realizó la contra-tinción de los núcleos celulares con DAPI (azul).

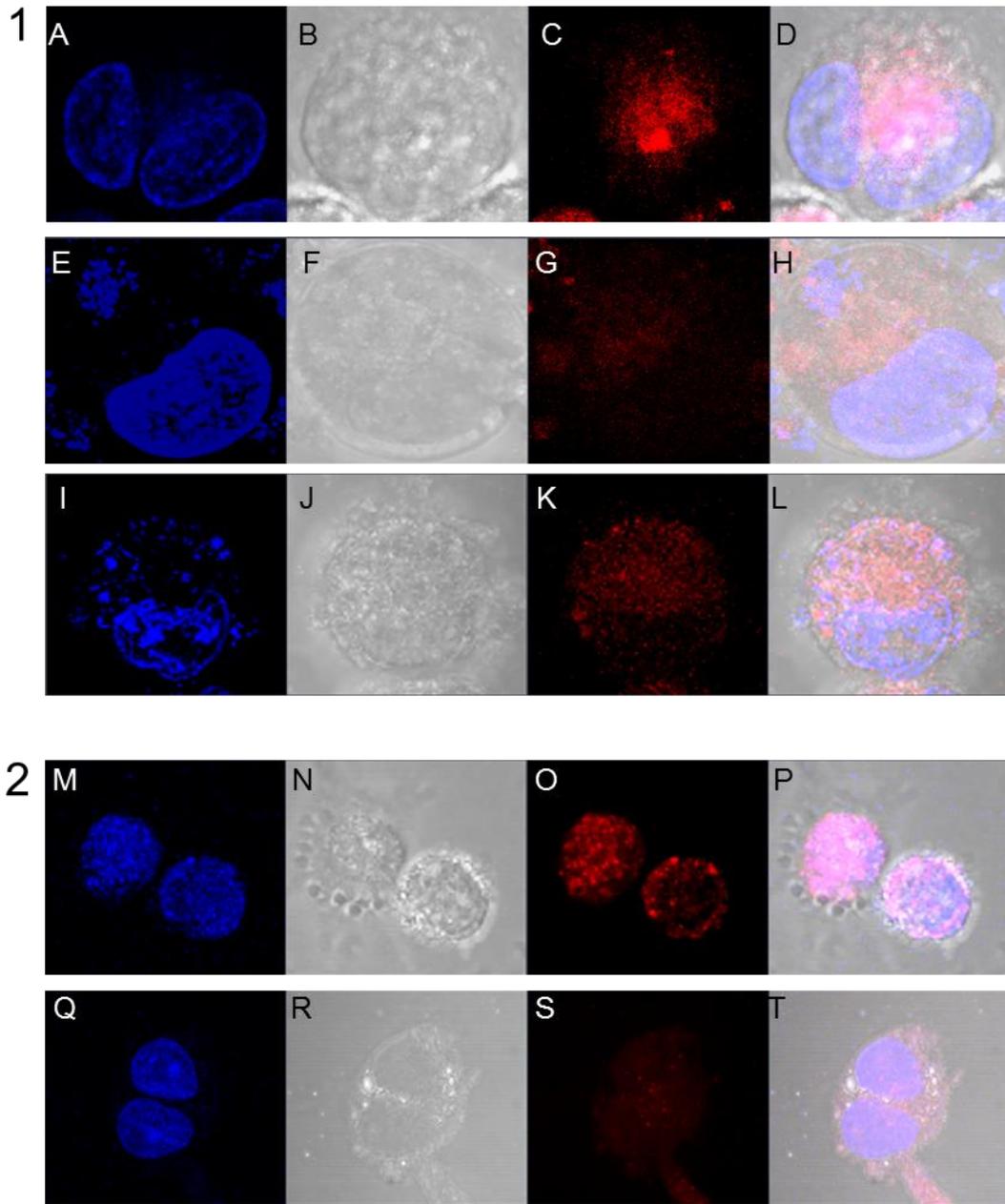


Figura 16. Determinación del efecto de los compuestos inhibidores sobre la endocitosis de transferrina y la acidificación de vesículas en células U937-DC-SIGN. Se trataron células U937-DC-SIGN con una concentración de 90 μM de dansilcadaverina (E-H), 80 μM de Dynasore® (I-L) y 100 nM de bafilomicina A1 (Panel inferior: Q-Y); durante 2 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Posteriormente, se incubaron con 20 μM de transferrina acoplada a Alexa-555 (rojo; Panel 1: A-L) o Lyso Tracker® 20nm (rojo; Panel 2: M-T) durante 1 h a 37°C con 5% de CO_2 . Las laminillas fueron montadas para microscopia confocal usando DAPI en la tinción de los núcleos celulares (azul).

Como se observa en las Figuras 15 y 16, las concentraciones de los compuestos inhibidores señaladas como óptimas por la medición de la viabilidad celular, muestran un marcado efecto en la endocitosis mediada por clatrina, el cual se ve reflejado en la disminución en la endocitosis de transferrina (Paneles 1; E-H para dansilcadaverina, e I-L para dynasore[®]) y en la disminución de la acidificación de organelos celulares, lo cual se distingue por una disminución en la señal de Lyso Tracker[®] (Paneles 2; Q-T para las células tratadas con bafilomicina A1). Este efecto se observa para ambos tipos celulares. Sin embargo, cabe señalar que para lograr dicho efecto, fue necesario usar concentraciones más altas de los compuestos inhibidores en las células U937-DC-SIGN, que en las U937.

Como se mencionó anteriormente, se ha observado que el DENV usa la endocitosis mediada por clatrina para entrar a la célula (Acosta *et al.* 2008, Alhoot *et al.* 2012, Mosso *et al.* 2008, van der Schaar *et al.* 2008); además, requiere de un pH ácido para, mediante la fusión de las membranas endosomal y viral, liberar su genoma en el citoplasma (Ang *et al.* 2010, Perera *et al.* 2008). Puesto que ya se habían determinado las concentraciones adecuadas de dansilcadaverina, dynasore[®] y bafilomicina A1, así como el efecto de éstos compuestos en los componentes celulares que putativamente median la entrada del virus a las células; se realizó la medición del efecto de estos compuestos inhibidores sobre la infección por DENV en ambas líneas celulares, U937 y U937-DC-SIGN.

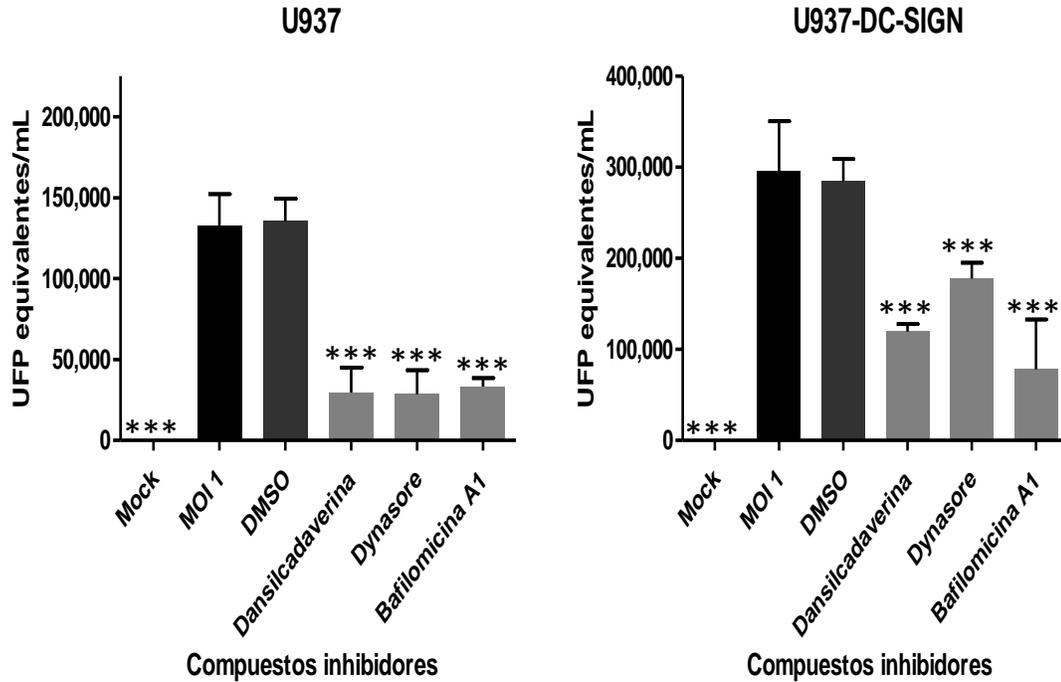


Figura 17. Medición del efecto de los compuestos inhibidores de la entrada viral en la infección por DENV en células U937 y U937-DC-SIGN. A 2×10^5 células U937 diferenciadas a macrófagos, se les trató con una concentración de $75 \mu\text{M}$ de dansilcadaverina, $80 \mu\text{M}$ de Dynasore® y 50 nM de bafilomicina A1. A células U937-DC-SIGN, se le trató con una concentración de $90 \mu\text{M}$ de dansilcadaverina, $80 \mu\text{M}$ de dynasore® y 100 nM de bafilomicina A1. Para ambos tipos celulares, se trataron durante 2 horas. Posteriormente, se infectaron con una MOI de 1 de DENV4 por 1 h a 37°C con 5% de CO_2 . Se colectaron los sobrenadantes a las 24 h.p.i., se extrajo el RNA viral y se detectó la progenie viral por un ensayo de RT-PCR en tiempo real. Se graficaron los valores de UFP equivalentes/mL para cada condición. $n = 8$. ANOVA de una vía con prueba Dunnett, $p < 0.05$, las barras de error son +DS.

Como se observa en la Figura 17, tanto dansilcadaverina (~29,500 UFP equivalentes/mL), dynasore® (~28,500 UFP equivalentes/mL) y bafilomicina A1 (~33,000 UFP equivalentes/mL), afectan significativamente la producción de progenie viral en sobrenadantes de células U937 y, en todos los casos, esta reducción es cercana al 75 % con respecto a la progenie viral proveniente de células infectadas directamente (~133,000 UFP equivalentes/mL). De igual modo, en las células U937-DC-SIGN (~295,500 UFP equivalentes/mL) las concentraciones de dansilcadaverina y bafilomicina A1 utilizadas inducen una disminución en la infección cercana al 60 y 75% (~120,000 y ~78,000 UFP equivalentes/mL), respectivamente. Sin embargo, la concentración utilizada de dynasore® mostró un efecto en la

reducción de la progenie viral de solo el 40% (~178,000 UFP equivalentes/mL). Es posible que el menor efecto de los compuestos utilizados observado con células U937-DC-SIGN se deba a la mayor susceptibilidad a la infección por DENV de las células U937-DC-SIGN en relación a las células U937. Estos resultados sugieren que el DENV-4 utiliza la endocitosis mediada por clatrina y dinamina y requiere de un pH ácido en los endosomas para infectar a macrófagos obtenidos de células U937 y U937-DC-SIGN. Además, las células U937-DC-SIGN requieren concentraciones más elevadas de los compuestos inhibidores para mostrar un grado de inhibición de la infección similar a las células U937, posiblemente por su mayor susceptibilidad a la infección. Los valores de UFP equivalentes/mL se resumen en la Tabla 4 del Anexo 1.

Para asegurarse de que los cambios en la producción de progenie viral no eran debidos a diferencias en la cantidad de células presentes en cada pozo, se tomaron micrografías de las células 24 h.p.i. para determinar si se contaba con una cantidad equivalente de células en cada condición.

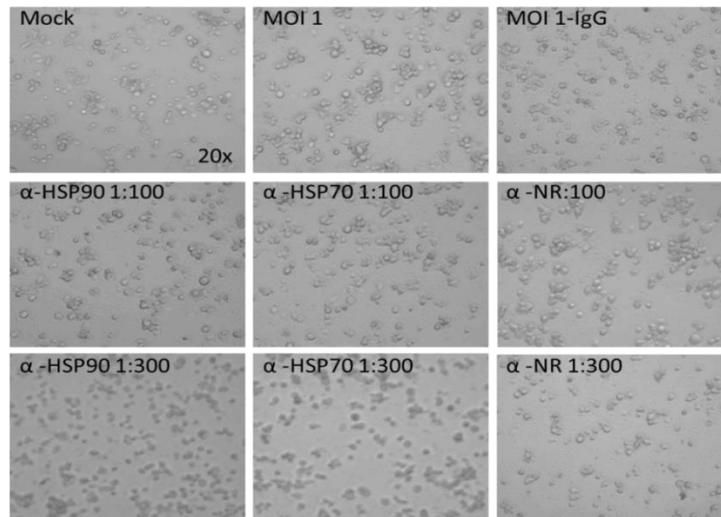


Figura 18. Células U937-DC-SIGN tratadas con anticuerpos contra HSP70 y HSP90 e infectadas con DENV4. A células, 2×10^5 , U937-DC-SIGN diferenciadas a macrófagos, se les incubó con gamma globulina y, posteriormente, con anticuerpos contra HSP70, HSP90 o un anticuerpo no relacionado (α -HSP70, α -HSP90 o α -NR) a diferentes diluciones (1:100 y 1:300) antes de ser infectadas con DENV4. Se tomaron micrografías con un aumento de 20X a las 24 h.p.i. Mock = células tratadas con mock. MOI 1 = células infectadas a una MOI de 1 sin tratarse previamente con anticuerpos. MOI 1-IgG = células tratadas con gammaglobulina antes de ser infectadas. α -HSP90, 70 o NR = anticuerpos usados contra las proteínas HSP90, HSP70, y un anticuerpo no relacionado.

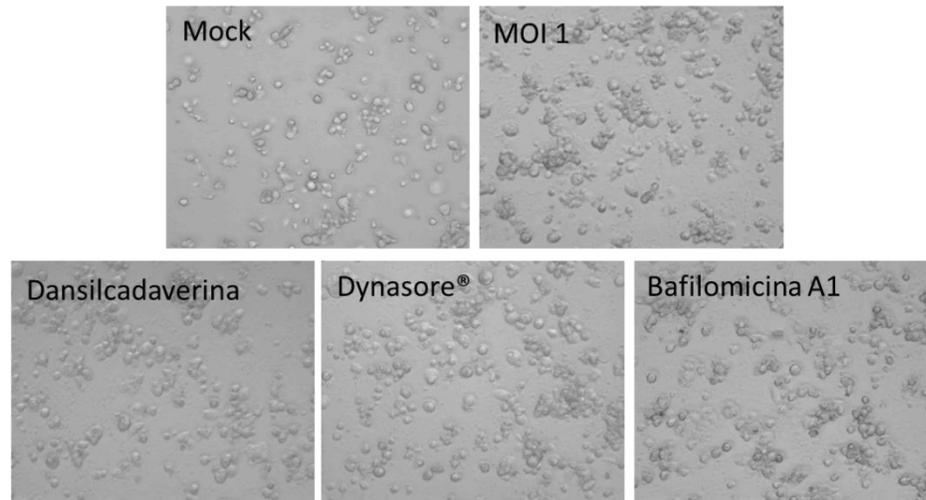


Figura 19. Células U937-DC-SIGN tratadas con compuestos inhibidores de la entrada viral e infectadas con DENV4. A 2×10^5 células U937-DC-SIGN, se les trató con una concentración de $90 \mu\text{M}$ de dansilcadaverina, $80 \mu\text{M}$ de dynasore® y 100 nM de bafilomicina A1, durante 2 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Posteriormente, se infectaron con una MOI de 1 de DENV4. Se tomaron micrografías con un aumento de 20X a las 24 h.p.i. Mock = células tratadas con mock. MOI 1 = células infectadas a una MOI de 1 sin tratarse previamente con compuestos inhibidores.

Como se observa en las Figuras 18 y 19, la cantidad de células U937-DC-SIGN al final del tratamiento es similar a la cantidad de células que no recibieron tratamiento (mock) y las células que fueron infectadas directamente con una MOI1 del DENV. Estos resultados sugieren que la disminución en la progenie viral observada es un efecto producido por los tratamientos a las que fueron sometidas y no a la disminución de la población celular por pozo.

En el laboratorio, se ha observado que la presencia del antígeno viral NS1 soluble es congruente con la cantidad de progenie viral presente en sobrenadantes de cultivos de células infectados con DENV (Ludert *et al.* 2008). Por lo anterior se decidió verificar el efecto de los compuestos inhibidores sobre la entrada de DENV4 en células U937-DC-SIGN por detección de NS1 y confirmar, así los resultados obtenidos a través de la medición por qRT-PCR.

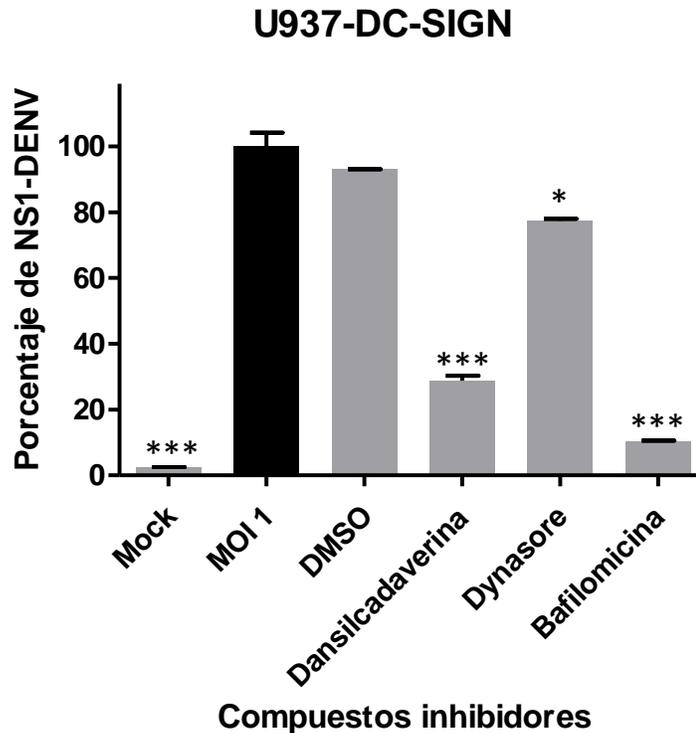


Figura 20. Presencia del antígeno NS1 en sobrenadantes de células U937-DC-SIGN tratadas con compuestos inhibidores de la entrada viral. 2×10^5 células U937-DC-SIGN se trataron con una concentración de $90 \mu\text{M}$ de dansilcadaverina, $80 \mu\text{M}$ de dynasore® y 100 nM de bafilomicina A1, durante 2 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Posteriormente, se infectaron con una MOI de 1 de DENV4. 24 h.p.i. se colectaron $50 \mu\text{L}$ del medio condicionado y se analizaron por ELISA. $n = 6$. ANOVA de una vía con prueba Dunnett, $p < 0.05$, las barras de error son +DS.

Como se observa en la Figura 20, hay una notable disminución en la presencia de la proteína NS1 en los sobrenadantes de células tratadas con los compuestos inhibidores, mostrando una tendencia similar a la exhibida en el estudio de la presencia de progenie viral por qRT-PCR bajo el mismo tratamiento. Estos resultados confirman el efecto de los compuestos inhibidores en la entrada del DENV4 en células U937-DC-SIGN.

La determinación de NS1 en los sobrenadantes de células U937 no fue posible. Aunque las causas para ello se desconocen, es muy posible que debido al bajo número de células infectadas, los niveles de NS1 en el sobrenadante de dichas células estén por debajo del límite de detección del estuche utilizado.

7.4. El virus dengue es transportado a través de endosomas tempranos a tardíos en células U937-DC-SIGN.

El virus unido e internalizado, por ejemplo a través de la endocitosis mediada por clatrina; es dirigido a través de endosomas tempranos, los cuales son identificados por la presencia de la GTPasa Rab5 (Krishnan *et al.* 2007), hacia endosomas tardíos, identificados por presentar Rab7 en su membrana (van der Schaar *et al.* 2007); en donde el virus logra fusionar su membrana con las de los endosomas y evadir así la degradación en lisosomas (Perera *et al.* 2008). Con el objetivo de probar si esta ruta de tránsito es utilizada por el DENV4 en macrófagos, nosotros realizamos ensayos de co-localización entre la glicoproteína E del virus y las proteínas Rab5 y Rab7. Para ello se permitió la unión del virus sobre la superficie celular a 4°C para, posteriormente, permitir su entrada y tráfico dentro de células U937-DC-SIGN.

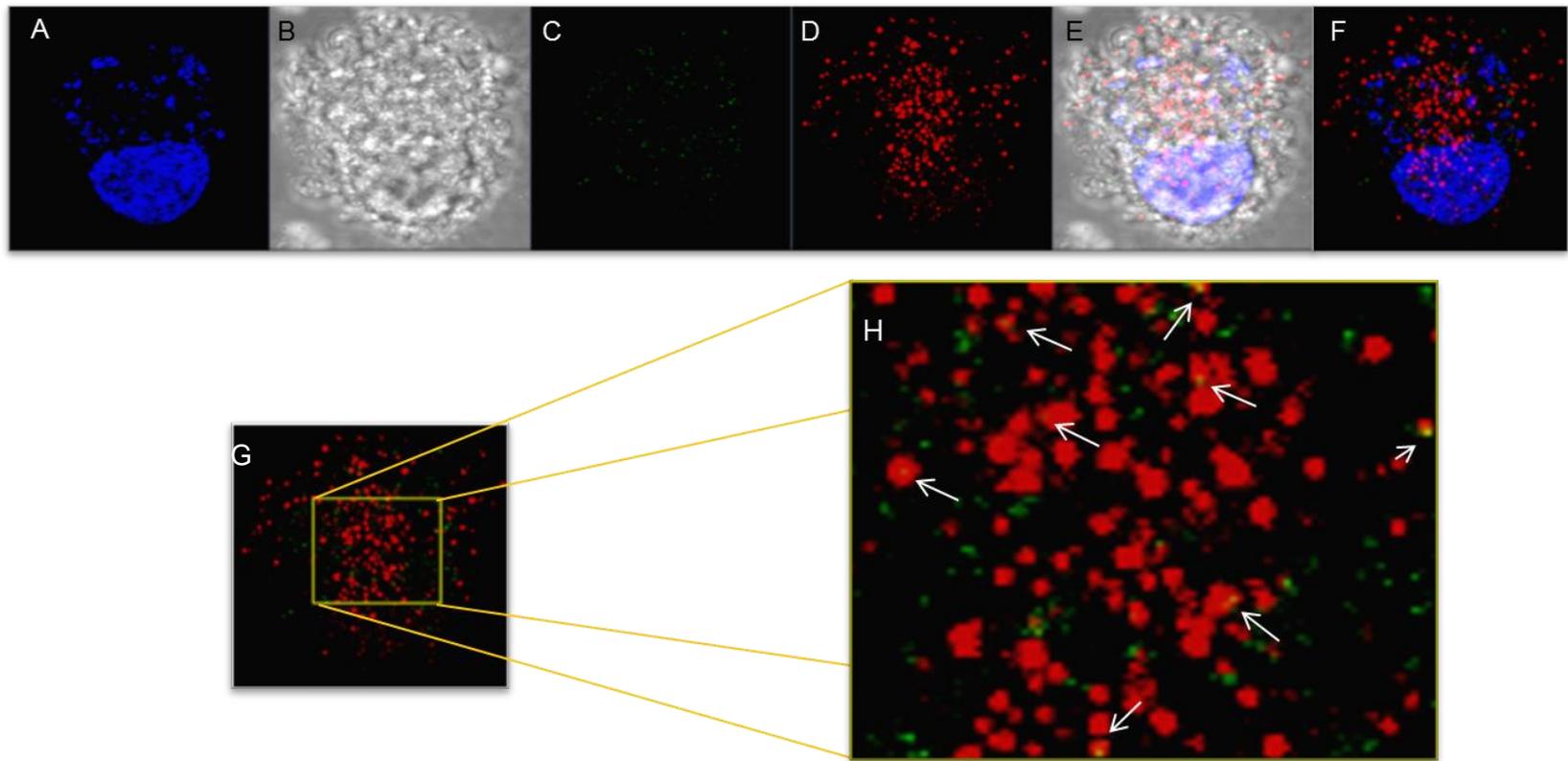


Figura 21. Co-localización de la proteína E del virus dengue con Rab5 en la línea celular U937-DC-SIGN. A 2×10^5 células U937-DC-SIGN diferenciadas a macrófagos, se incubaron con DENV4 a una $MOI=10$ durante 2 h a 4°C . Se transfirieron a 37°C por 12 min. Posteriormente, fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas un anticuerpo contra Rab5 y E de DENV. Se marcaron con un anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa-594 y un anticuerpo anti-ratón acoplado a ficoeritrina. Finalmente, se montaron para su análisis por microscopía confocal utilizando como tinción de contraste DAPI (azul). A. Núcleo celular. B. Superficie celular. C. DENV. D. Endosomas con Rab5. E. Fusión de A-D. F. Fusión de A, C-D. G. Fusión de Rab5 y DENV. H. Acercamiento de la región señalada en amarillo en la imagen G. Las flechas blancas señalan puntos de co-localización entre el DENV y Rab5.

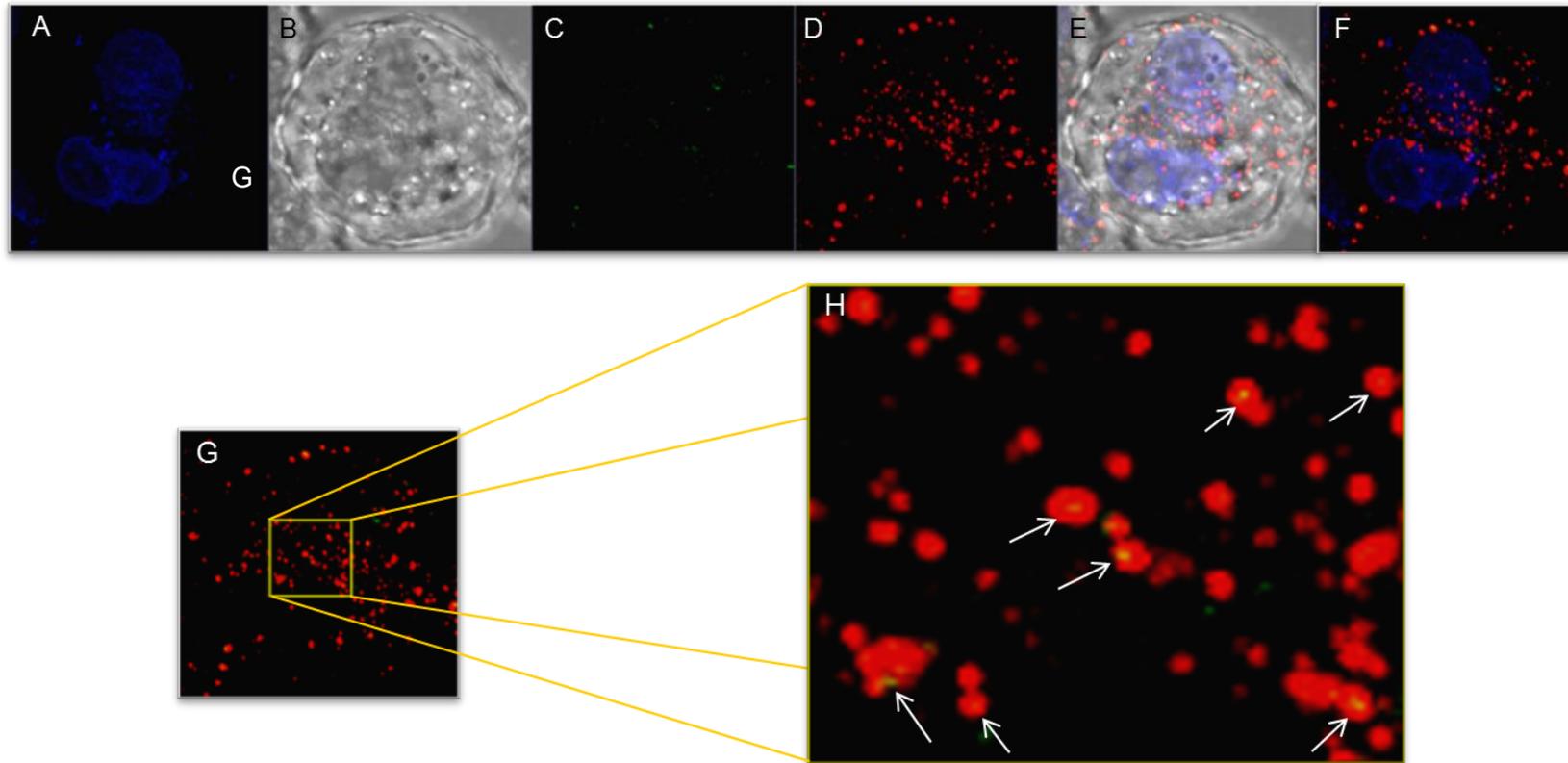


Figura 22. Co-localización de la proteína E del virus dengue con Rab7 en la línea celular U937-DC-SIGN. A 2×10^5 células U937-DC-SIGN diferenciadas a macrófagos, se incubaron con DENV4 a una MOI=5 durante 2 h a 4°C . Se transfirieron a 37°C por 20 min. Posteriormente, fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas un anticuerpo contra Rab7 y E de DENV. Se marcaron con un anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa-594 y un anticuerpo anti-ratón acoplado a ficoeritrina. Finalmente, se montaron para su análisis por microscopía confocal utilizando como tinción de contraste DAPI (azul). A. Núcleo celular. B. Superficie celular. C.DENV. D. Endosomas con Rab5. E. Fusión de A-D. F. Fusión de A, C-D. G. Fusión de Rab5 y DENV. H. Acercamiento de la región señalada en amarillo en la imagen G. Las flechas blancas señalan puntos de co-localización entre el DENV y Rab7.

En la Figura 21 se pueden observar puntos o manchas amarillas las cuales indican co-localización del virus dengue con Rab5 a los 15 minutos después de la unión del DENV a la superficie celular. A tiempos menores no se observó co-localización (8 y 12 min.). De igual manera, se puede apreciar co-localización entre el DENV con Rab7, pero, como cabría esperar, esta co-localización se observa a tiempos más tardíos (20 minutos) (Figura 22). Estos resultados sugieren que el virus dengue transita primero por endosomas tempranos y posteriormente en endosomas tardíos en macrófagos obtenidos de células U937-DC-SIGN.

8. DISCUSIÓN

El dengue es una enfermedad que ha tenido un alto impacto en la salud de la población mundial debido a diversos factores. Primero, existe una alta densidad de población habitando en las zonas de riesgo de transmisión del agente etiológico de esta enfermedad (Ng 2011, WHO 2009). Segundo, la infección por el DENV es impredecible puesto que puede ser asintomática o llevar a síntomas como la hemorragia, derrame pleural y falla orgánica múltiple, los cuales pueden dirigir a choque y a la muerte (Simmons *et al.* 2012). En tercer lugar, no existe un tratamiento antiviral específico para reducir la infección por el DENV (Burnett 2013). Cuarto, las vacunas desarrolladas hasta el momento son ineficientes para producir protección contra los cuatro serotipos del virus (Sabchareon *et al.* 2012, Falzarano *et al.* 2013). Y, finalmente, el control del mosquito vector no ha sido logrado (Hemme *et al.* 2010). Por lo anterior, se requiere el desarrollo de estrategias que dirijan a mejor manejo clínico de la enfermedad. En este sentido, el diseño de fármacos antivirales se presenta como una de las estrategias más socorridas y prometedoras, y la cual podría dirigirse hacia el control de los pasos iniciales de la infección.

La entrada del virus dengue ha sido señalada como un paso crítico en el establecimiento de la infección. Anteriormente, se ha estudiado la entrada del DENV en células epiteliales, hepatocitos y fibroblastos, entre otras tanto de mamífero como de mosquito; sin embargo, aún no se entiende por completo este proceso en macrófagos, los cuales han sido descritos como un blanco principal de la infección por DENV *in vivo* (Alhoot *et al.* 2012). Además, los macrófagos tiene un papel dual en pro- y contra de la infección, ya que estas células participan en patogénesis de la enfermedad y, aunque su función es internalizar y destruir al virus y a las células infectadas, también son altamente permisivas a la infección por el virus y producen factores, como son las citocinas, que inducen algunos de los síntomas más perjudiciales de la enfermedad (Chaturvedi *et al.* 2006).

En el estudio de la infección por el DENV en tipos celulares con baja expresión de receptores para el virus, como son los macrófagos, técnicas muy sensibles como la PCR presentan una eficiente detección de la infección aún a tiempos tempranos. La RT-PCR en tiempo real provee un adecuado método de diagnóstico para el DENV. El método es rápido, sensible, simple y reproducible si está propiamente controlado. Éste puede usarse para detectar RNA viral en muestras clínicas humanas, en tejidos post mortem, en cultivos celulares y en mosquitos (Guzmán *et al.* 2004, Jitmittraphap *et al.* 2006, Lanciotti *et al.* 1992, Liotta *et al.* 2005). Además, en los últimos años se han desarrollado métodos que implican iniciadores y sondas dirigidos a diferentes localizaciones en el genoma y diferentes enfoques para detectar los productos de RT-PCR (Chien *et al.* 2006, Jitmittraphap *et al.* 2006, Johnson *et al.* 2005, Lanciotti *et al.* 1992). Por lo anterior, decidimos utilizar la técnica de qRT-PCR para la detección de la infección por el DENV en macrófagos.

Anteriormente, se ha sugerido que las células U937 podrían no ser un modelo apropiado para el estudio de la infección por DENV, debido a que se ha observado que el DENV2 se une a diferentes proteínas en la superficie de monocitos/macrófagos primarios y en células U937 (Moreno-Altamirano *et al.* 2002). Sin embargo, esta línea celular ha sido utilizada ampliamente en el estudio del comportamiento de los macrófagos, en el proceso de proliferación (Tabolacci *et al.* 2011), apoptosis (Matsunaga *et al.* 2012, Perez-Cruz *et al.* 2003), diferenciación (Kim *et al.* 1998, Tabolacci *et al.* 2011), síntesis y liberación de citocinas (Arif *et al.* 2011, Sun *et al.* 2013, Vongsakul *et al.* 2011), actividad fagocítica, citotoxicidad (Bernal *et al.* 1982), expresión de moléculas de adhesión (Shelley *et al.* 2002) y receptores a IFN-gamma (Brown *et al.* 2006, Finbloom 1991), y vías de señalización (Kang *et al.* 2011). En el estudio de la infección por DENV en macrófagos provenientes de células U937, la principal limitante es la poca permisibilidad de estas células a la infección, la cual se ha observado que es menor al 5% de las células expuestas al virus (Puerta *et al.* 2010). Sin embargo, cuando éstas

son transfectadas para la expresión de DC-SIGN, una lectina expresada en células dendríticas que participa en la unión del virus DENV a estas células, aumentan su capacidad de infectarse por el virus más de diez veces. Por todo lo antes mencionado, la línea celular U937 modificada para la expresión de DC-SIGN y diferenciada a través del uso de PMA, pudiera constituirse como un modelo eficiente para el estudio de la infección por el DENV en macrófagos.

Un paso inicial y crítico en la infección por DENV es su entrada. En este sentido, tanto la entrada como el tropismo del DENV está definido por la unión a su receptor (Thepparit 2004). Esta unión no solo permite al virus adherirse, sino también puede inducir la señalización necesaria para su internalización en la célula blanco. Para el DENV, se ha observado que la internalización sucede por diferentes vías de entrada como la macropinocitosis, pinocitosis, endocitosis y fagocitosis mediadas por receptor (Acosta *et al.* 2008). Por ejemplo, en células que expresan el receptor de manosa y DC-SIGN, se ha observado que el primero participa induciendo la internalización del DENV vía endocitosis mediada por clatrina, macropinocitosis, pinocitosis y fagocitosis. En el caso de DC-SIGN, se ha sugerido que es requerida para el anclaje del DENV, pero que no participa en la internalización (Miller *et al.* 2008). Contrariamente a lo que sucede con la infección por VIH1, en donde DC-SIGN promueve la internalización del virus vía endocitosis mediada por clatrina (Cambi *et al.* 2009, Tacken *et al.* 2011).

Reyes del Valle y col. (2005) describieron a las proteínas HSP70 y HSP90 como parte de un complejo receptor para el virus dengue en macrófagos. Debido a la pobre infección de estas células por el DENV, estas han sido modificadas para la expresión de DC-SIGN, un reconocido receptor del virus en células dendríticas. Con base en lo anterior, la participación de DC-SIGN en el aumento de la infección podría deberse a su papel como factor de anclaje o, como sucede para VIH, como un receptor que induce la internalización del virus mediada por clatrina (Cambi *et al.* 2009). El uso de

anticuerpos contra las proteínas que putativamente actúan como receptores del DENV en células U937, es una estrategia útil para estudiar su participación como tales. Esta estrategia se ha utilizado ampliamente en el estudio de la interacción de DC-SIGN con la glicoproteína E (Navarro *et al.* 2003), de la participación de GRP 78 en la facilitación de la entrada del virus a las células hepáticas (Jindadamrongwech *et al.* 2004), en la participación del receptor de laminina (Theparit *et al.* 2004), el receptor de manosa (Miller *et al.* 2008) y otras proteínas (Moreno-Altamirano *et al.* 2002) en la entrada del virus dengue. Aunque existe otras técnicas para determinar la participación de una molécula como receptor (Salas-Benito *et del Ángel* 1997), nosotros decidimos utilizar anticuerpos para bloquear la unión del virus a sus receptores por haber probado anteriormente ser útiles en la definición de la participación de las proteínas HSP70 y HSP90 en la unión del DENV a la superficie de células U937 diferenciadas a macrófagos.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se estudió la participación de HSP70 y HSP90 en la entrada del virus dengue en células U937-DC-SIGN. Para ello se utilizaron anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. Los resultados muestran una disminución en la producción de progenie viral cercana al 60 % con respecto a las células infectadas directamente (Figura 11). Esto sugiere que los receptores HSP70 y HSP90 son necesarios en la entrada de DENV a células U938-DC-SIGN. Al parecer las células DC-SIGN podría estar participando solamente como un factor de anclaje cuya presencia no altera el uso de receptores en las células U937. Sin embargo, la reducción en la infección no es total. Esta reducción parcial podría deberse a una incompleta unión o bloqueo de las proteínas HSP70 y HSP90 por los anticuerpos utilizados o a la presencia de otros receptores descritos en macrófagos, como es el caso del receptor de manosa y la molécula asociada a CD14. Para corroborar que el efecto en la disminución de la infección no era un efecto secundario al uso de anticuerpos, se usó un anticuerpo no relacionado, el cual no afectó significativamente la infección.

Para confirmar el comportamiento observado en las células U937-DC-SIGN, se llevó a cabo la reproducción de los experimentos en células U937, que anteriormente habían sido estudiadas en el laboratorio por Reyes-Del Valle en el 2005. Como era de esperarse, el uso de anticuerpos para bloquear a los receptores HSP70 y HSP90 en células U937 provocó una disminución en la infección (Figura 12); y, aunque la técnica de medición de la infección difiere a la utilizada por Reyes del Valle, los resultados obtenidos concuerdan, aumentando la confiabilidad de los resultados obtenidos para U937-DC-SIGN.

Los resultados obtenidos también muestran que macrófagos U937 expresando ectópicamente DC-SIGN se infectan más eficientemente que los macrófagos U937, ya que al ser medida la progenie viral producida a través de qRT-PCR aumenta en más del doble su valor; 295,500 versus 148,000 UFP equivalentes/mL, respectivamente. Es necesario señalar que la expresión de DC-SIGN en U937 fue confirmada por citometría en el laboratorio (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con lo observado en células THP expresando DC-SIGN y células modificadas para sobre-expresar un receptor específico para el DENV como es el caso del receptor de manosa (Miller *et al.* 2008); en donde la internalización del virus y sus niveles de replicación aumenta significativamente.

Una vez unido a su receptor en la célula blanco, el DENV es internalizado. Mediante el silenciamiento de componentes de la entrada del virus en monocitos, se determinó que éste es internalizado a través de la endocitosis mediada por clatrina (Alhoot *et al.* 2011), vía de entrada también descrita para el receptor de manosa en macrófagos (Jindadamrongwech *et al.* 2004), que además, usa como receptor a una molécula asociada a CD-14 (Alhoot *et al.* 2011). Estos resultados sugieren la entrada mediada por clatrina, la disminución de la progenie viral observada es limitada, lo cual permite pensar que existen otros receptores, así como otras vías de entrada utilizadas por el virus.

La endocitosis mediada por clatrina es el proceso por el cual se forma una vesícula intracelular por la invaginación de la membrana en una poza pre-existente de clatrina. Esta invaginación requiere ser cortada a partir de la membrana a través del reclutamiento y estrangulación por dinamina (Schmid *et Frolov* 2011). Para definir si la endocitosis mediada por clatrina es la vía de internalización usada por el DENV4 en células U937 y U937-DC-SIGN, en este trabajo utilizamos un enfoque farmacológico con el fin de inhibir componentes de esta vía de entrada. El uso de dansilcadaverina -un inhibidor frecuentemente usado en el estudio de la endocitosis mediada por clatrina, tanto en células U937 como en células U937-DC-SIGN, provocó una disminución en la producción de la progenie viral de 75 y 60 %, respectivamente (Figura 17). Estos resultados fueron comprobados mediante la medición del antígeno viral NS1 en células U937-DC-SIGN, en cuyo caso la reducción en el porcentaje de NS1 detectada fue cercana al 70% (Figura 20). En línea con el estudio de la ruta de endocitosis mediada por clatrina, se utilizó dynasore[®], un compuesto inhibidor de dinamina (Lee *et al.* 2013, Varkevisser *et al.* 2013). Éste se usó en la misma concentración (80 µM) en ambas líneas celulares, ya que en mayores concentraciones dirigía a una reducción de la viabilidad celular. En la línea celular U937 este compuesto provocó una reducción en la progenie viral cercana al 70%; sin embargo, al usarse en la línea celular U937-DC-SIGN, la reducción fue de tan solo 40% (Figura 17). Como se puede observar, se usó una concentración mayor de dansilcadaverina en la línea celular U937-DC-SIGN para lograr un efecto de inhibición similar al obtenido en las células U937, este requerimiento posiblemente se deba a que la entrada del virus está favorecida por la lectina y, por lo tanto, requiere una mayor regulación; esto es soportado por el comportamiento mostrado por dynasore[®], que al ser utilizado en una concentración igual en ambas líneas celulares, mostró un menor efecto en la línea celular con mayor infección viral, U937-DC-SIGN. Estos resultados tomados en conjunto, sugieren que la endocitosis del DENV4 está mediada por clatrina en ambos tipos celulares. El hecho de que la reducción en la

progenie viral no alcanza el 100%, puede deberse a 1) se requiere usar concentraciones mayores de los compuestos inhibidores, lo cual es difícil debido a la toxicidad, ó 2) hay entradas alternas como podría ser el caso de la entrada mediada por caveolina.

Dentro de la célula, el virus es transportado a través de endosomas tempranos a endosomas tardíos, en donde la acidificación del pH permite al virus fusionar su membrana con la membrana endosomal y escapar hacia el citoplasma (van der Schaar *et al.* 2008). En este trabajo se analizó la presencia de DENV en endosomas tempranos y tardío a través del uso de anticuerpos específicos contra sus marcadores reconocidos, Rab5 y Rab7, respectivamente; y contra la proteína E del DENV. La co-localización de la proteína E del virus con Rab 5 (Figura 21) y con Rab7 (Figura 22) sugiere que el DENV es transportado a través de estos endosomas después de internalización. Así mismo, se sabe que una ATPasa vacuolar está encargada de la disminución del pH en estos organelos, de manera que el uso de bafilomicina A1, un compuesto inhibidor de la ATPasa vacuolar, detiene esta acidificación y por lo tanto, la fusión de la membrana viral y endosomal y su posterior replicación (Daigneault *et al.* 2010, Fang *et al.* 2013). En este trabajo se utilizó bafilomicina A1 en células U937 y U937-DC-SIGN (Figura 17). Este compuesto tuvo un efecto inhibidor en la producción de progenie viral, en aproximadamente 70%, mientras que en la línea celular U937-DC-SIGN indujo una reducción de 75%. Aunque estas cifras son similares; fue necesario usar una concentración mayor del compuesto (100 nM) en U937-DC-SIGN para lograr un efecto comparable. En el caso de U937-DC-SIGN, la presencia de NS1 en sobrenadantes se redujo aproximadamente un 80%, corroborando el efecto de bafilomicina A1 en la producción de la infección viral (Figura 20). Estos resultados indican la necesidad de acidificación de compartimentos celulares para el establecimiento de la infección por DENV4.

En este trabajo se estudiaron la vía de entrada y la necesidad de bajo pH endosomal utilizando solo un compuesto inhibidor para cada

componente. Es por ello que se hace necesario repetir estos experimentos utilizando otros compuestos inhibidores como el tratamiento con sacarosa para inhibir la entrada mediada por clatrina o cloruro de amonio para aumentar el pH lisosomal. Mejor aún sería repetir estos experimentos utilizando mutantes dominantes negativas para EPS15 o silenciando proteínas claves, como clatrina o EPS15, para las rutas involucradas. Además, todos los experimentos se hicieron utilizando un solo serotipo de DENV, y, en vista de los resultados reportados por Acosta *et al.* (2012), valdría la pena repetir estos experimentos utilizando al menos un serotipo adicional de DENV, y así validar o no el uso general de estas vías para todos los serotipos de DENV.

En resumen, podemos decir que la presencia de DC-SIGN en células U937 diferenciadas a macrófagos induce un aumento en la infección de esta línea celular de por lo menos 10 veces. Además, nuestros resultados sugieren que el virus dengue utiliza a las proteínas HSP70 y HSP90 participan en la entrada de DENV a células U937-DC-SIGN diferenciadas a macrófagos tal y como se había observado para células U937, y que la presencia de DC-SIGN no altera el uso de receptores para el DENV en estas células. Sin embargo, la presencia de otras moléculas de superficie que pueden estar participando de la unión del virus, no puede ser descartada. Así mismo, podemos concluir que el DENV4 utiliza la endocitosis mediada por clatrina y a dinamina, y requiere un pH bajo para su entrada en células en ambos tipos celulares.

Por último, nuestros resultados sugieren que las células U937 expresando ectópicamente DC-SIGN presentan eventos tempranos de la infección similares al de las células parentales, U937, y que por lo tanto debido a su aumento considerable en la infección por DENV, representan un modelo más ventajoso para el estudio de la infección por DENV.

9. CONCLUSIONES

Las proteínas HSP70 y HSP90 forman parte del complejo receptor de DENV en células U937-DC-SIGN.

El DENV4 utiliza una vía de entrada susceptible a dansilcadaverina y dynasore y requiere de un pH ácido para su internalización en células U937 y U937-DC-SIGN, lo cual sugiere entrada mediada por clatrina y el paso por endosomas.

Por su mayor eficiencia de infección, las células U937-DC-SIGN podrían reemplazar a las células U937 en el estudio de eventos tempranos de la infección por DENV, debido a que el virus utiliza al menos la vía de endocitosis mediada por clatrina para la entrada en ambos tipos celulares.

10. PERSPECTIVAS

Usar otros compuestos inhibidores específicos de la entrada de clatrina para respaldar los resultados obtenidos con el uso de dansilcadaverina y dynasore®.

Utilizar mutantes dominantes negativas de componentes de la vía de entrada del DENV.

Investigar otras posibles rutas de entrada del DENV en células U937 y U937-DC-SIGN.

Determinar la ruta de entrada de los serotipos 1, 2 y 3 del DENV en macrófagos obtenidos de células U937 y U937-DC-SIGN.

Estudiar la ruta de tránsito del DENV dentro de las líneas celulares U937 y U937-DC-SIGN.

Analizar si la ruta de entrada del DENV es la misma en macrófagos obtenidos a partir de monocitos primarios.

Investigar la ruta de entrada del DENV a macrófagos bajo condiciones de ADE.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abubakar S, Azila A, Suzana M, Chang LY. 2002. Antigenic cell associated dengue 2 virus proteins detected in vitro using dengue fever patients sera. *Malays J Pathol.* 24(1):29-36.
- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. 2008. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol.* 89(Pt 2):474-84.
- 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.
- de Alwis R, Beltramello M, Messer WB, Sukupolvi-Petty S, Wahala WM, Kraus A, Olivarez NP, Pham Q, Brien JD, Tsai WY, Wang WK, Halstead S, Kliks S, Diamond MS, Baric R, Lanzavecchia A, Sallusto F, de Silva AM. 2011. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(6):e1188.
- 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.
- 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. *Virology.* 407(1):7-24.
- Arif A, Jia J, Moodt RA, DiCorleto PE, Fox PL. 2011. Phosphorylation of glutamyl-prolyl tRNA synthetase by cyclin-dependent kinase 5 dictates transcript-selective translational control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(4):1415-20.
- Artpradit C, Robinson LN, Gavrillov BK, Rurak TT, Ruchirawat M, Sasisekharan R. 2013. Recognition of heparan sulfate by clinical strains of dengue virus serotype 1 using recombinant subviral particles. *Virus Res.* 2013 May 22.
- Beasley D., Barret A. 2008. The Infectious Agent. En: Halstead S. *Dengue.* Imperial College Press. pp. 29-74.
- Bergman MP, Engering A, Smits HH, van Vliet SJ, van Bodegraven AA, Wirth HP, Kapsenberg ML, Vandenbroucke-Grauls CM, van Kooyk Y, Appelmelk BJ. 2004. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp Med.* 200(8):979-90.
- Bernal SD, Chen LB. 1982. Induction of cytoskeleton-associated proteins during differentiation of human myeloid leukemic cell lines. *Cancer Res.* 42(12):5106-16.

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.

Blaising J, Lévy PL, Gondeau C, Phelip C, Varbanov M, Teissier E, Ruggiero F, Polyak SJ, Oberlies NH, Ivanovic T, Boulant S, Pécheur EI. 2013. Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking. *Cell Microbiol*. 2013 May 24.

Boonnak K, Slike BM, Burgess TH, Mason RM, Wu SJ, Sun P, Porter K, Rudiman IF, Yuwono D, Puthavathana P, Marovich MA. 2008. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol*. 82(8):3939-51.

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.

Brown MG, Huang YY, Marshall JS, King CA, Hoskin DW, Anderson R. 2009. Dramatic caspase-dependent apoptosis in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells. *J Leukoc Biol*. 85(1):71-80.

Brown MG, King CA, Sherren C, Marshall JS, Anderson R. 2006. A dominant role for FcγRIII in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells and associated CCL5 release. *J Leukoc Biol*. 80(6):1242-50.

Burnett M. 2013. Dengue infections. *J Spec Oper Med*. 13(2):64-8.

Cabrera-Hernandez A, Thepparit C, Suksanpaisan L, Smith DR. 2007. Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. *J Med Virol*. 79(4):386-92.

Cambi A, Beeren I, Joosten B, Franssen JA, Figdor CG. 2009. The C-type lectin DC-SIGN internalizes soluble antigens and HIV-1 virions via a clathrin-dependent mechanism. *Eur J Immunol*. 39(7):1923-8.

Caparrós E, Serrano D, Puig-Kröger A, Riols L, Lasala F, Martínez I, Vidal-Vanaclocha F, Delgado R, Rodríguez-Fernández JL, Rivas L, Corbí AL, Colmenares M. 2005. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in Leishmania interaction with host phagocytes. *Immunobiology*. 210(2-4):185-93.

CDC. Dengue. USA [en línea] 2013 [fecha de acceso 22 de Junio de 3013] URL disponible en <http://www.cdc.gov/dengue/>.

Cecílio AB, ES Campanelli, KPR Souza, LB Figueirido, and McResende, 2009. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* a dengue vector in Brazil. *Braz.J. Biol* 69(1):123-127.

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.

Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, Pacsa AS, Younis OI, Azizieh F. 1999. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol.* 59(3):335-40.

Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. 2006. Macrophage and dengue virus: friend or foe? *Indian J Med Res.* 124(1):23-40.

Chávez-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.

Chawla T, Chan KR, Zhang SL, Tan HC, Lim AP, Hanson BJ, Ooi EE. 2013. Dengue virus neutralization in cells expressing fc gamma receptors. *PLoS One.* 8(5):e65231.

Chen MC, Lin CF, Lei HY, Lin SC, Liu HS, Yeh TM, Anderson R, Lin YS. 2009. Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol.* 183(3):1797-803.

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

Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 3(8):866-71.

Chen Y, Maguire T, Marks RM. 1996. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol.* 70(12):8765-72.

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(4):2650-7.

Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. 2006. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* 44(4):1295-304.

Chiu WW, Kinney RM, Dreher TW. 2005. Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *J Virol.* 79(13):8303-15.

Chu JJ, Ng ML. 2004. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol.* 78(19):10543-55.

Chuang YC, Wang SY, Lin YS, Chen HR, Yeh TM. 2013. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *J Biomed Sci.* 20(1):42.

Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J. 2006. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol.* 87(Pt 5):1075-84.

Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC, Gardner JP, Dragic T. 2004. L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (39):14067-72.

Current Dengue Situation - PAHO/WHO. 2013. Consultado el 25 de junio de 2013. URL disponible en http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8820%3A21-june-2013-dengue&catid=2103%3A--hsd0104d-most-recent-ea&lang=es.

Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 5(1):e8668.

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.

Davies PJ, Davies DR, Levitzki A, Maxfield FR, Milhaud P, Willingham MC, Pastan IH. 1980. Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones. *Nature.* 283(5743):162-7.

de la Cruz-Hernández SI, Flores-Aguilar H, González-Mateos S, López-Martínez I, Alpuche-Aranda C, Ludert JE, del Angel RM. 2013. Determination of viremia and concentration of circulating nonstructural protein 1 in patients infected with dengue virus in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 88(3):446-54.

Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasana-wathana S, Limpitikul W, Puttikhunt C, Edwards C, Duangchinda T, Supasa S, Chawansuntati K, Malasit P, Mongkolsapaya J, Screaton G. 2010. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science.* 328(5979):745-8.

Domingo-Carrasco C, Gascón-Bustrenga J. 2005. Dengue and other hemorrhagic viral fevers. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 23(10):615-26.

Endy TP, Yoon IK, Mammen MP. 2010. Prospective cohort studies of dengue viral transmission and severity of disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 338:1-13.

Falzarano D, Feldmann H. 2013. Vaccines for viral hemorrhagic fevers-progress and shortcomings. *Curr Opin Virol.* 3(3):343-51.

Fang K, Li HF, Hsieh CH, Li DY, Song DC, Cheng WT, Guo ZX. 2013. Differential autophagic cell death under stress with ectopic cytoplasmic and mitochondrial-specific PPP2R2B in human neuroblastoma cells. *Apoptosis.* 18(5):627-38.

Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. 2001. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science.* 294(5549):2163-6.

Fibriansah G, Ng TS, Kostyuchenko VA, Lee J, Lee S, Wang J, Lok SM. 2013. Structural Changes in Dengue Virus When Exposed to a Temperature of 37{degrees}C. *J Virol.* 87(13):7585-92.

Finbloom DS. 1991. Regulation of cell-surface receptors for human interferon-gamma on the human histiocytic lymphoma cell line U937. *Biochem J.* 274 (Pt 3):775-80.

Flipse J, Wilschut J, Smit JM. 2013. Molecular mechanisms involved in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in humans. *Traffic.* 14(1):25-35.

Foster W., Walker E. 2009. Mosquitoes (Culicidae). En: *Medical and Veterinary Entomology*. Eds. Mullen G., Mullen G. R., Durden L. Elsevier. pp. 207.254.

Garcia G, Vaughn DW, Del Angel RM. 1997. Recognition of synthetic oligopeptides from nonstructural proteins NS1 and NS3 of dengue-4 virus by sera from dengue virus-infected children. *Am J Trop Med Hyg.* 56(4):466-70.

Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 100(5):587-97.

Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E. 2002. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology.* 292(1):162-8.

Gibbons RV, Kalanarooj S, Jarman RG, Nisalak A, Vaughn DW, Endy TP, Mammen MP Jr, Srikiatkachorn A. 2007. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 77(5):910-3.

Goddard J. 2000. *Infectious diseases and arthropods*. Humana Press. USA. New Jersey. pp 3-62.

Gordon S, Taylor PR. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5(12):953-64.

Gubler D. 1988. Dengue. En: Monath T. (ed.). *Epidemiology of arthropod-borne diseases*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 223-260.

Gubler DJ. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 10(2):100-3.

Gubler DJ. 2011. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health.* 39(4 Suppl):3-11.

Gubler DJ. 2012. The economic burden of dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 86(5):743-4.

Günther PS, Mikeler E, Hamprecht K, Schneider-Schaulies J, Jahn G, Dennehy KM. 2011. CD209/DC-SIGN mediates efficient infection of monocyte-derived dendritic cells by clinical adenovirus 2C isolates in the presence of bovine lactoferrin. *J Gen Virol.* 92(Pt 8):1754-9.

Guzmán MG, Kourí G. 2004. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis.* 8(2):69-80.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 8(12 Suppl):S7-16.

Haigler HT, Maxfield FR, Willingham MC, Pastan I. 1980. Dansylcadaverine inhibits internalization of 125I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells. *J Biol Chem.* 255(4):1239-41.

Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houlès C, Fieschi F, Arenzana-Seisdedos F, Moreau JF, Déchanet-Merville J. 2002. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity.* 17(5):653-64.

Halstead S. 2004. Fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue. En: Behrman R., Kliegman R., Jenson H. *Tratado de pediatría.* 17a edición. Elsevier, 1092-1095.

Halstead SB, O'Rourke EJ. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 146(1):201-17.

Halstead SB. 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 239(4839):476-81.

Halstead SB. 1989. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis.* 11 Suppl 4:S830-9.

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

Hanley KA, Monath TP, Weaver SC, Rossi SL, Richman RL, Vasilakis N. 2013. Fever versus fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infect Genet Evol.* S1567-1348(13)00080-4.

Hemme RR, Thomas CL, Chadee DD, Severson DW. 2010. Influence of urban landscapes on population dynamics in a short-distance migrant mosquito: evidence for the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(3):e634.

Henchal EA, Putnak JR. 1990. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev.* 3(4):376-96.

Holmes EC, Twiddy SS. 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 3(1):19-28.

Huberman E, Callaham MF. 1979. Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(3):1293-7.

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.

Jin Z, Deval J, Johnson KA, Swinney DC. 2011. Characterization of the elongation complex of dengue virus RNA polymerase: assembly, kinetics of nucleotide incorporation, and fidelity. *J Biol Chem.* 286(3):2067-77.

Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. 2004. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol.* 149(5):915-27.

Jittmittraphap A, Thammapalo S, Ratanasetyuth N, Wongba N, Mammen MP, Jampangern W. 2006. Rapid detection of dengue viral RNA in mosquitoes by nucleic acid-sequence based amplification (NASBA). *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 37(6):1117-24.

Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. 2005. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 43(10):4977-83.

Kang K, Jung H, Nam S, Lim JS. 2011. NDRG2 Promotes GATA-1 Expression through Regulation of the JAK2/STAT Pathway in PMA-stimulated U937 Cells. *Immune Netw.* 11(6):348-57.

Kim SJ, Bang OS, Lee YS, Kang SS. 1998. Production of inducible nitric oxide is required for monocytic differentiation of U937 cells induced by vitamin E-succinate. *J Cell Sci.* 111 (Pt 4):435-41.

Kim YM, Gayen S, Kang C, Joy J, Huang Q, Chen AS, Wee JL, Ang MJ, Lim HA, Hung AW, Li R, Noble CG, Lee le T, Yip A, Wang QY, Chia CS, Hill J, Shi PY, Keller TH. 2013. NMR analysis of a novel enzymatically active unlinked dengue NS2B-NS3 protease complex. *J Biol Chem.* 288(18):12891-900.

Koraka P, Murgue B, Deparis X, Setiati TE, Suharti C, van Gorp EC, Hack CE, Osterhaus AD, Groen J. 2003. Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. *J Med Virol.* 70(1):91-8.

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.* 2008 Jan;80(1):134-46.

Kou Z, Lim JY, Beltramello M, Quinn M, Chen H, Liu S, Martinez-Sobrido L, Diamond MS, Schlesinger JJ, de Silva A, Sallusto F, Jin X. 2011. Human antibodies against dengue enhance dengue viral infectivity without suppressing type I interferon secretion in primary human monocytes. *Virology.* 410(1):240-7.

Kourí JJ. 1986. Hospital and health care security: a survey of current trends. *J Healthc Prot Manage.* 2(2):97-101.

Kraus AA, Messer W, Haymore LB, de Silva AM. 2007. Comparison of plaque- and flow cytometry-based methods for measuring dengue virus neutralization. *J Clin Microbiol.* 45(11):3777-80.

Krishnan MN, Sukumaran B, Pal U, Agaisse H, Murray JL, Hodge TW, Fikrig E. 2007. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *J Virol.* 81(9):4881-5.

Kyle JL, Harris E. 2008. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol.* 62:71-92.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 30(3):545-51.

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.

Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 73(6):4738-47.

Levitzki A, Willingham M, Pastan I. 1980. Evidence for participation of transglutaminase in receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(5):2706-10.

Liotta D, Cabanne G, Campos R, Tonon S. 2005. Molecular detection of dengue viruses in fields caught *Aedes aegypti* mosquitoes from northeastern Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología,* 47(3-4): 82-87.

Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A. 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem.* 280(25):23698-708.

Ludert JE, Mosso C, Ceballos-Olvera I, del Angel RM. 2008. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Virol J.* 5:51.

Mabalirajan U, Kadhiravan T, Sharma SK, Banga A, Ghosh B. 2005. Th(2) immune response in patients with dengue during defervescence: preliminary evidence. *Am J Trop Med Hyg.* 72(6):783-5.

Mandell G., Bennett J., Dolin R. 2006. *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica.* Segunda edición. Elsevier. pp. 1926-1949.

Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, De Simone SG, Dutra RF, Guedes MI. 2012. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One.* 7(7):e41386.

Marzi A, Gramberg T, Simmons G, Möller P, Rennekamp AJ, Krumbiegel M, Geier M, Eisemann J, Turza N, Saunier B, Steinkasserer A, Becker S, Bates P, Hofmann H, Pöhlmann S. 2004. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* 78(21):12090-5.

Matsunaga T, Hosogai M, Arakaki M, Endo S, El-Kabbani O, Hara A. 2012. 9,10-phenanthrenequinone induces monocytic differentiation of U937 cells through regulating expression of aldo-keto reductase 1C3. *Biol Pharm Bull.* 35(9):1598-602.

McMahon HT, Boucrot E. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(8):517-33.

Midgley CM, Flanagan A, Tran HB, Dejnirattisai W, Chawansuntati K, Jumnainsong A, Wongwiwat W, Duangchinda T, Mongkolsapaya J, Grimes JM, Screaton GR. 2012. Structural analysis of a dengue cross-reactive antibody complexed with envelope domain III reveals the molecular basis of cross-reactivity. *J Immunol.* 188(10):4971-9.

Míguez-Burbano MJ, Jaramillo CA, Palmer CJ, Shor-Posner G, Velásquez LS, Lai H, Baum MK. 1999. Total immunoglobulin E levels and dengue infection on San Andrés Island, Colombia. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6(4):624-6.

Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. 2008. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog.* 4(2):e17.

Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K. 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem.* 276(31):28939-45.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. 2005. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol.* 79(2):1223-31.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* 427:313-319.

Mohd Zim MA, Sam IC, Omar SF, Chan YF, AbuBakar S, Kamarulzaman A. 2013. Chikungunya infection in Malaysia: comparison with dengue infection in adults and predictors of persistent arthralgia. *J Clin Virol.* 56(2):141-5.

Monath TP. 1994. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(7):2395-400.

Mondotte JA, Lozach PY, Amara A, Gamarnik AV. 2007. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J Virol.* 81(13):7136-48.

Moreno-Altamirano MM, Sánchez-García FJ, Muñoz ML. 2002. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J Gen Virol.* 83(Pt 5):1123-30.

Morrison J, Aguirre S, Fernandez-Sesma A. 2012. Innate immunity evasion by Dengue virus. *Viruses.* 4(3):397-413.

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):193-9.

Muller DA, Young PR. 2013. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 98(2):192-208.

Muñoz ML, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R, Ortega A. 1998. Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol Lett.* 168(2):251-8.

- Navarro-García F, Canizalez-Roman A, Vidal JE, Salazar MI. 2007. Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. *Microbiology*. 153(Pt 9):2828-38.
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Desprès P. 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(7):723-8.
- Neff JM, Morris L, Gonzalez-Alcover R, Coleman PH, Lyss SB, Negron H. 1967. Dengue fever in a Puerto Rican community. *Am J Epidemiol*. 86(1):162-84.
- Nemésio H, Palomares-Jerez F, Villalaín J. 2011. The membrane-active regions of the dengue virus proteins C and E. *Biochim Biophys Acta*. 1808(10):2390-402.
- Nemésio H, Palomares-Jerez F, Villalaín J. 2012. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: membranotropic regions. *Biochim Biophys Acta*. 1818(11):2818-30.
- Nemésio H, Palomares-Jerez MF, Villalaín J. 2013. Hydrophobic segment of dengue virus C protein. Interaction with model membranes. *Mol Membr Biol*. 30(4):273-87.
- Ng LC. 2011. Challenges in dengue surveillance and control. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*. 2(2):1-3.
- Nonaka M, Ma BY, Imaeda H, Kawabe K, Kawasaki N, Hodohara K, Kawasaki N, Andoh A, Fujiyama Y, Kawasaki T. 2011. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) recognizes a novel ligand, Mac-2-binding protein, characteristically expressed on human colorectal carcinomas. *J Biol Chem*. 286(25):22403-13.
- Ooi EE, Goh KT, Gubler DJ. 2006. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerg Infect Dis*. 12(6):887-93.
- OPS 1995. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. OPS-OMS.
- Padmanabha H, Durham D, Correa F, Diuk-Wasser M, Galvani A. 2012. The Interactive Roles of *Aedes aegypti* Super-Production and Human Density in Dengue Transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(8): e1799.
- Paranjape S, Harris E. 2010. Control of dengue virus translation and replication. En: Rothman AL. *Dengue virus*. pp.15-34.
- Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. 2008. Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res*. 2008. 80(1): 11–22.
- Perez-Cruz I, Carcamo JM, Golde DW. 2003. Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood*. 102(1):336-43.
- Pierson TC, Kielian M. 2013. Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin Virol*. 3(1):3-12.

- Pinheiro FP, Travassos da Rosa AP, Travassos da Rosa JF, Ishak R, Freitas RB, Gomes ML, LeDuc JW, Oliva OF. 1981. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. *Am J Trop Med Hyg.* 30(1):149-60.
- 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(Pt 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.
- Pull L, Brichtler S, Bouchaud O, Siriez JY. 2012. Differential diagnosis of dengue fever: beware of measles! *J Travel Med.* 19(4):268-71.
- Raharimalala FN, Ravaomanarivo LH, Ravelonandro P, Rafaraso LS, Zouache K, Tran-Van V, Mousson L, Failloux AB, Hellard E, Moro CV, Ralisoa BO, Mavingui P. 2012. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasit Vectors.* 20;5:56.
- Ramanan V, Agrawal NJ, Liu J, Engles S, Toy R, Radhakrishnan R. 2011. Systems biology and physical biology of clathrin-mediated endocytosis. *Integr Biol (Camb).* 3(8):803-15.
- Ramos-Castañeda J, Imbert JL, Barrón BL, Ramos C. 1997. A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *J Neurovirol.* 3(6):435-40.
- Reddy PB, Pattnaik P, Tripathi NK, Srivastava A, Rao PV. 2012. Expression, purification and evaluation of diagnostic potential and immunogenicity of dengue virus type 3 domain III protein. *Protein Pept Lett.* 19(5):509-19.
- Reiter P. 2001. Climate change and mosquito-borne disease. Dengue Branch, Division of Vector-Borne Infectious Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services, San Juan, Puerto Rico. *Environmental Health Perspectives.* 109(1):141–161.
- Reyes-Del Valle J, Chávez-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(8):4557-67.
- Rezza G. 2007. Prevention and control of emerging infections: a challenge for the 3rd millennium. *New Microbiol.* 30(3):358-61.
- Rice C. 2007. Flaviviridae: The viruses and their replication. En: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). *Fields Virology.* 3rd ed. Lippincott-Raven. pp. 931-959.

Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei HY, Wilschut J, Smit JM. 2010. Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS Pathog.* 6(1):e1000718.

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 FcγRI (CD64) or FcγRIIa (CD32). *J Virol.* 80(20):10128-38.

Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckennooghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J. 2012. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet.* 380(9853):1559-67.

Sakoonwatanyoo P, Boonsanay V, Smith DR. 2006. Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein. *Intervirology.* 49(3):161-72.

Salas-Benito JS, del Angel RM. 1997. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J Virol.* 71(10):7246-52.

Schmid SL, Frolov VA. 2011. Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:79-105.

Scott RM, Nisalak A, Cheamudon U, Seridhoranakul S, Nimmannitya S. 1980. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 141(1):1-6.

Secretaría de Salud. 2003. Dengue y Dengue Hemorrágico. Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades. Coordinación de Vigilancia Epidemiológica.

Seijo A. 2001. El Dengue como problema de Salud Pública. *Archivos Argentinos de Pediatría.* 99(6): 510-521.

Shelley CS, Teodoridis JM, Park H, Farokhzad OC, Böttinger EP, Arnaout MA. 2002. During differentiation of the monocytic cell line U937, Pur α mediates induction of the CD11c beta 2 integrin gene promoter. *J Immunol.* 168(8):3887-93.

Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen vV, Wills B. 2012. Dengue. *N Engl J Med.* 366(15):1423-32.
da Silva Voorham JM, Rodenhuis-Zybert IA, Ayala Nuñez NV, Colpitts TM, van der Ende-Metselaar H, Fikrig E, Diamond MS, Wilschut J, Smit JM. 2012. Antibodies against the envelope glycoprotein promote infectivity of immature dengue virus serotype 2. *PLoS One.* 7(3):e29957.

SINAVE-INDRE-CENAPRECE. 2013. Consultado el 16 de Junio de 2013. Información epidemiológica. URL en

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/panodengue/intd_dengue.html

Sintiprungrat K, Singhto N, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. 2010. Alterations in cellular proteome and secretome upon differentiation from monocyte to macrophage by treatment with phorbol myristate acetate: insights into biological processes. *J Proteomics*. 73(3):602-18.

Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. 2011. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*. 3(2):160-71.

Smith DR. 2012. An update on mosquito cell expressed dengue virus receptor proteins. *Insect Mol Biol*. 21(1):1-7.

Somsel Rodman J, Wandinger-Ness A. 2000. Rab GTPases coordinate endocytosis *J Cell Sci*. 113 Pt 2:183-92

Soumahoro MK, Fontenille D, Turbelin C, Pelat C, Boyd A, Flahault A, Hanslik T. 2010. Imported chikungunya virus infection. *Emerg Infect Dis*. 16(1):162-3.

Stephen S. Whitehead, Joseph E. Blaney, Anna P. Durbin, Brian R. Murphy. 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology*. 5: 518 – 528.

Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. 2012. Arthritogenic alphaviruses--an overview. *Nat Rev Rheumatol*. 8(7):420-9.

Sukupolvi-Petty S, Brien JD, Austin SK, Shrestha B, Swayne S, Kahle K, Doranz BJ, Johnson S, Pierson TC, Fremont DH, Diamond MS. 2013. Functional analysis of antibodies against Dengue virus type 4 reveals strain-dependent epitope exposure that impacts neutralization and protection. *J Virol*. 87(16):8826-42.

Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, Yu CC, Chang HH. 2007. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost*. 5(11):2291-9.

Sun K, Li Y, Lu Z, Zhang L, Gao Z, Jin Q. 2013. Suppression of titanium particle-induced TNF-alpha expression and apoptosis in human U937 macrophages by siRNA silencing. *Int J Artif Organs*. 2013 May 10.

Svajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N. 2010. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal*. 22(10):1397-405.

Tabolacci C, Oliverio S, Lentini A, Rossi S, Galbiati A, Montesano C, Mattioli P, Provenzano B, Facchiano F, Beninati S. 2011. Aloe-emodin as antiproliferative and differentiating agent on human U937 monocytic leukemia cells. *Life Sci*. 89(21-22):812-20.

Tacke PJ, Ginter W, Berod L, Cruz LJ, Joosten B, Sparwasser T, Figdor CG, Cambi A. 2011. Targeting DC-SIGN via its neck region leads to prolonged antigen residence in early endosomes, delayed lysosomal degradation, and cross-presentation. *Blood*. 118(15):4111-9.

Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, Legres L, Dreher D, Nicod LP, Gluckman JC, Lagrange PH, Gicquel B, Neyrolles O. 2003. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med*. 197(1):121-7.

Tang KF, Ooi EE. 2012. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 10(8):895-907.

Taraphdar D, Sarkar A, Mukhopadhyay BB, Chatterjee S. 2012. A comparative study of clinical features between monotypic and dual infection cases with Chikungunya virus and dengue virus in West Bengal, India. *Am J Trop Med Hyg.* 86(4):720-3.

Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 197(7):823-9.

Tauber AI. 2003. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(11):897-901.

Thepparit C, Smith DR. 2004. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol.* 78(22):12647-56.

Thiel H, Collet M, Gould E, Heinz F, Houghton M, Meyers G, Purcell R, Rice C. 2005. Flaviviridae. En: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. *Virus taxonomy* (eds.). Elsevier Academic Press. pp. 980-998.

Torres JR, Castro J. 2007. The health and economic impact of dengue in Latin America. *Cad Saude Publica.* 23 Suppl 1:S23-31.

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.

Varkevisser R, Houtman MJ, Waasdorp M, Man JC, Heukers R, Takanari H, Tieland RG, van Bergen En Henegouwen PM, Vos MA, van der Heyden MA. 2013. Inhibiting the clathrin-mediated endocytosis pathway rescues K(IR)2.1 downregulation by pentamidine. *Pflugers Arch.* 465(2):247-59.

Villegas-Trejo A, Manrique-Saide P, Che-Mendoza A, Cruz-Canto W, Fernandez MG, González-Acosta C, Dzul-Manzanilla F, Huerta H, Arredondo-Jiménez JI. 2010. First report of *Aedes albopictus* and other mosquito species in Morelos, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc.* 26(3):321-3.

Villordo SM, Gamarnik AV. 2013. Differential RNA Sequence Requirement for Dengue Virus Replication in Mosquito and Mammalian Cells. *J Virol.* 87(16):9365-72.

Viral Bioinformatics Resource Center. Genomes [en línea] 2013 [fecha de acceso 17 de Junio de 2013] URL disponible en <http://www.denguedb.org/viruses.asp?bhcp=1>.

Vongsakul M, Kasisith J, Noisumdaeng P, Puthavathana P. 2011. The difference in IL-1beta, MIP-1alpha, IL-8 and IL-18 production between the infection of PMA activated U937 cells with recombinant vaccinia viruses inserted 2004 H5N1 influenza HA genes and NS genes. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 29(4):349-56.

Wang J, Liu XJ. 2003. A G protein-coupled receptor kinase induces *Xenopus* oocyte maturation. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):15809-14.

Wang JH, Janas AM, Olson WJ, KewalRamani VN, Wu L. 2007. CD4 coexpression regulates DC-SIGN-mediated transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 81(5):2497-507.

Wati S, Li P, Burrell CJ, Carr JM. 2007. Dengue virus (DV) replication in monocyte-derived macrophages is not affected by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), and DV infection induces altered responsiveness to TNF-alpha stimulation. *J Virol.* 81(18):10161-71.

Were F. 2012. The dengue situation in Africa. *Paediatr Int Child Health.* 32 Suppl 1:18-21.

Westaway E., Blok J. 1997. Taxonomy and evolutionary relationship of flaviviruses. pp. 147-173. En: D. J. Gubler and G. Kuno (ed.). *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* CAB International. London, United Kingdom.

Wong SS, Haqshenas G, Gowans EJ, Mackenzie J. 2012. The dengue virus M protein localises to the endoplasmic reticulum and forms oligomers. *FEBS Lett.* 586(7):1032-7.

World Health Organization. 2009. *Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.* World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Wu RS, Chan KR, Tan HC, Chow A, Allen JC Jr, Ooi EE. 2012. Neutralization of dengue virus in the presence of Fc receptor-mediated phagocytosis distinguishes serotype-specific from cross-neutralizing antibodies. *Antiviral Res.* 96(3):340-3.

Xie X, Gayen S, Kang C, Yuan Z, Shi PY. 2013. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *J Virol.* 87(8):4609-22.

Yap TL, Xu T, Chen YL, Malet H, Egloff MP, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J. 2007. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J Virol.* 81(9):4753-65.

Ying W, Cheruku PS, Bazer FW, Safe SH, Zhou B. 2013. Investigation of Macrophage Polarization Using Bone Marrow Derived Macrophages. *J Vis Exp.* (76).

Yu IM, Holdaway HA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. 2009. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *J Virol.* 83(23):12101-7.

Yu L, Nomaguchi M, Padmanabhan R, Markoff L. 2008. Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology.* 374(1):170-85.

Zaitseva E, Chernomordik L. 2012. Fusion stage of dengue virus entry: mechanisms and assays. *Microsc Microanal.* 18 (Suppl 2):52-3.

Zaitseva E, Yang ST, Melikov K, Pourmal S, Chernomordik LV. 2010. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathog.* 6(10):e1001131.

Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. 2003. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *10(11):907-12.*

Zhang X, Sheng J, Plevka P, Kuhn RJ, Diamond MS, Rossmann MG. 2013. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A. 110(17):6795-9.*

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.*

12. Anexos

12.1. Anexo 1. Tablas de valores de UFP equivalentes/mL.

Tabla 3. Número de UFP equivalentes/mL correspondientes a cada condición de los ensayos de inhibición de la infección por DENV empleando anticuerpos dirigidos contra las proteínas HSP70 y HSP90 para células U937 y U937-DC-SIGN.

Condición	U937	U937-DC-SIGN	U937	U937-DC-SIGN
	UFPe1/mL	UFPe1/mL	%	%
Mock	0	0	0	0
MOI 1	148000	290000	100	100
IgG	133000	241000	90	83
a-HSP90 1:100	43000	61000	29	21
a-HSP70 1:100	73000	80000	49	28
a-NR 1:100	131000	260000	89	90
a-HSP90 1:300	58000	90000	39	31
a-HSP70 1:300	77000	86000	52	30
a-NR 1:300	144000	277000	97	96

Se muestra el promedio de los valores observados de UFPeq/mL para cada condición. El porcentaje presentado fue calculado con respecto a la infección directa por el DENV (MOI 1).

Tabla 4. Número de UFP equivalentes/mL correspondientes a cada condición de los ensayos de inhibición de la infección por DENV por el efecto de compuestos inhibidores de la entrada viral.

Condición	U937	U937-DC-SIGN	U937	U937-DC-SIGN
	UFPeq/mL	UFPeq/mL	%	%
Mock	0	0	0	0
MOI 1	133000	295000	100	100
DMSO	135000	285000	102	97
Dansilcadaverina	30000	120000	23	41
Dynasore	29000	178000	22	60
Bafilomicina A1	33000	78000	25	26

Se muestra el promedio de los valores observados de UFPeq/mL para cada condición. El porcentaje presentado fue calculado con respecto a la infección directa por el DENV (MOI 1).