



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR

**“Evaluación de la participación de AMPK y PP2A en la
infección por DENV”**

T E S I S

Que presenta

MANUEL ALEJANDRO MOSSO PANI

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTOMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR

Directora de tesis:

Dra. Rosa María Del Ángel

CREDITOS AL PROYECTO Y LAS INSTITUCIONES.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada para la realización de este proyecto, el cual fue realizado en el laboratorio de Virología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de la Dra. Rosa María Del Ángel y la asesoría de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y el Dr. Juan Ernesto Ludert; todos ellos profesores investigadores del mismo departamento.

AGRADECIMIENTOS

A Dios que es el que me permite existir e ilumina mi camino.

A mis padres que son el motor de mi vida.

A mi jefa la Dra. Rosa por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A mis asesores por toda la paciencia que han tenido para este trabajo y por sus excelentes aportaciones.

A la familia Suárez García porque una vez más sin su ayuda no estaría culminando esta meta.

A toda mi familia por apoyarme en todo.

INDICE	PAGINA
LISTA DE LAS ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
RESUMEN	7
<i>ABSTRACT</i>	8
INTRODUCCION	9
JUSTIFICACION	17
HIPOTESIS	17
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y METODOS	18
RESULTADOS	21
DISCUSION	40
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS	44
BIBLIOGRAFIA	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	Proteína cinasa dependiente de AMP
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
AMP	Adenosin monofosfato
DENV	Virus dengue
DS	Dengue severo
HMG CoA reductasa	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
ORF	Marco de lectura abierto
UTR	Regiones que no se traducen
ssRNA	RNA de cadena sencilla
DF	Fiebre por dengue
DHF	Fiebre hemorrágica por dengue
ADE	Amplificación mediada por anticuerpos
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
NDGA	Ácido nordihidroguayarático
ACC	Acetil CoA carboxilasa
ATP	Adenosin trifosfato
PFA	Paraformaldehído
PFU	Unidades formadoras de placa

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Organización genómica del DENV.
- Figura 2 Ciclo replicativo del DENV
- Figura 3 Modulación de la actividad de la HMGCoAR
- Figura 4 Porcentaje de células HUH-7 infectadas con DENV2 por 24 y 48.
- Figura 5 Efecto de la metformina, compuesto C y del ácido okadaico sobre la viabilidad de células HUH-7 a las 48 horas post-tratamiento.
- Figura 6 La activación de AMPK reduce el porcentaje de células infectadas con DENV2 a las 24 y 48 horas post-tratamiento.
- Figura 7 La activación de AMPK reduce la replicación del genoma de DENV.
- Figura 8 La activación de AMPK disminuye los niveles de expresión de la proteína viral NS1 a las 24 y 48 horas post-tratamiento.
- Figura 9 La activación de AMPK disminuye la progenie viral a las 24 y 48 horas post-tratamiento en células HUH-7.
- Figura 10 La disminución en la actividad de AMPK no modifica el porcentaje de células infectadas con DENV2 a las 24 y 48 horas post-tratamiento.
- Figura 11 La disminución de la actividad de AMPK incrementa la replicación del genoma de DENV.
- Figura 12 La inactivación de AMPK incrementa los niveles de expresión de la proteína viral NS1 a las 24 y 48 horas post-tratamiento.
- Figura 13 La inactivación de AMPK incrementa la progenie viral a las 24 y 48 horas post-tratamiento en células Huh-7.
- Figura 14 La inactivación de PP2A reduce el porcentaje de células infectadas con DENV2 a las 48 horas post-tratamiento con ácido okadaico.
- Figura 15 El ácido okadaico reduce la replicación del genoma de DENV.
- Figura 16 La inactivación de PP2A disminuye los niveles de expresión de la proteína viral NS1 a las 48 horas post-tratamiento.
- Figura 17 La inactivación de PP2A disminuye la progenie viral a las 48 horas post-tratamiento en células Huh-7.

RESUMEN

La infección por virus dengue (DENV) puede ser asintomática o manifestarse en dos formas clínicamente diferenciadas: Dengue y dengue severo (DS). Durante la infección de células hepáticas con DENV suceden una serie de eventos fisiopatológicos y celulares los cuales están muy relacionados con el metabolismo de lípidos y colesterol. Resultados recientes de nuestro laboratorio, indican que durante la infección con DENV se presenta un incremento en la cantidad de colesterol y lípidos, lo que los convierte en posibles blancos terapéuticos para contrarrestar la infección. Uno de los mecanismos a través de los cuales se aumenta la cantidad de colesterol de las células infectadas con DENV es el incremento en la actividad de la HMG CoA reductasa (enzima limitante en la síntesis de colesterol) debida a su defosforilación. La AMPK y la PP2A son dos de las enzimas celulares capaces de regular la actividad de la HMGC oA reductasa mediante su fosforilación o defosforilación respectivamente. A la fecha, no existen estudios que relacionen la actividad de estas enzimas con el desarrollo del ciclo replicativo de DENV. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de AMPK y PP2A en la infección por DENV en células Huh-7. El efecto de la modulación de ambas enzimas en la infección por DENV se analizó usando activadores o inhibidores de la AMPK como metformina y compuesto C respectivamente, y el ácido okadaico como inhibidor de la enzima PP2A. Nuestros resultados indican que durante la infección con DENV, la actividad de AMPK se reduce lo que garantiza entre otras cosas, una eficiente síntesis de colesterol, necesaria durante la infección viral. Por otra parte, durante la infección, la actividad de PP2A no se modifica; sin embargo al inhibir su función reduce de manera significativa la replicación viral.

ABSTRACT

Dengue viruses cause the most important human viral disease transmitted by mosquitoes. The infection with any of the 4 dengue virus serotypes (DENV) can either be asymptomatic or manifest in two clinical forms, the mild dengue fever or the more severe dengue hemorrhagic fever that may progress into dengue shock syndrome. During DENV infection of hepatic cells several physiopathologic and cellular events occur, such as changes in lipid and cholesterol metabolism. Current results in our laboratory show that during DENV replicative cycle host lipid metabolism is altered; specifically, DENV infection modulates cholesterol and fatty acid synthesis, generating a cholesterol-enriched cellular environment necessary for viral replication. One of the mechanisms altered during infection is an increase in cholesterol levels related with an increase in the activity of HMGCoA reductase (limiting enzyme in cholesterol synthesis) because of its dephosphorylation. AMPK and PP2A are the two cellular enzymes able to regulate the activity of the HMGCoA reductase through its phosphorylation and dephosphorylation process, respectively. To the day, there aren't studies about the activity of this enzymes and their association with DENV replicating cycle. Thus, the aim of this work was to evaluate the role of AMPK and PP2A in DENV infection of HUH-7 cells. To modulate the activity of AMPK and PP2A, we used the AMPK inhibitor (compound C) and activator (metformin), and the PP2A inhibitor (okadaic acid). Our results suggest that AMPK is inactivated during DENV infection and this event is required for an efficient cholesterol synthesis, necessary for viral replication. Moreover, during infection, the activity of PP2A is not modified; however when PP2A is inhibited the viral replication is reduced significantly.

INTRODUCCION

Generalidades del virus del dengue.

El virus dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*, es un virus envuelto, de cápside icosaédrica, cuyo genoma está compuesto por una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva que tiene un tamaño aproximado de 11kb, el cual codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales ¹⁻³.

Organización genómica del virus del Dengue

El genoma de DENV contiene un sólo marco de lectura abierta (ORF), el cual codifica para una poliproteína de aproximadamente 3,000 aminoácidos que es procesada inmediatamente después de la traducción por proteasas virales y celulares. Esta poliproteína genera 10 proteínas, que incluyen a la proteína de la nucleocápside (C), el precursor de la proteína asociada a la membrana (PrM/M) y la proteína de la envoltura (E), y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) encargadas de la replicación viral y de diversas funciones celulares. El marco de lectura abierto está flanqueado por las regiones 5' y 3' no traducidas (5'UTR/3'UTR) (Figura 1). Tras la activación de la vía de señalización del interferón en respuesta a la infección viral, las proteínas NS2a, NS4a y NS4b bloquean la cascada de interferón para evadir la respuesta inmune. Por otra parte, NS4b inhibe la cascada del interferón mediante el bloqueo de la fosforilación de STAT-1 ^{1,4}.

Ciclo replicativo del virus Dengue.

Se han realizado diversas investigaciones *in vitro* para entender el ciclo replicativo de DENV, especialmente en lo relacionado al procesamiento de las

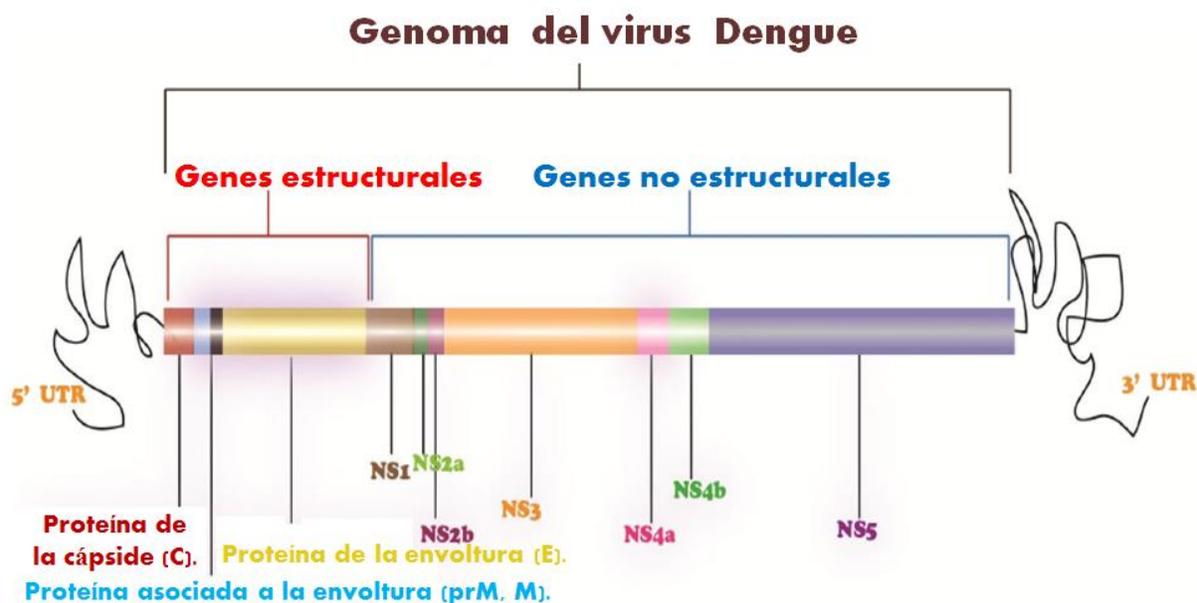


Figura 1. Organización genómica del DENV. Se muestra el genoma de RNA de polaridad positiva del DENV, así como la posición de cada uno de los genes que codifican para las proteínas estructurales (E, M y C) y las no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5). Tomada y modificada ⁶.

proteínas virales y a la transcripción del genoma viral. El ciclo replicativo de los 4 serotipos de DENV (DENV 1-4) se inicia cuando la partícula viral se une a su receptor mediante la proteína E que se encuentra en su envoltura. En células de mamíferos, se han descrito diferentes receptores como: el heparan sulfato, nLc4Cer, DC-SIGN/L-SIGN, Hsp90 y Hsp70, el receptor de laminina, GRP78 y el receptor de manosa entre otros, aunque pueden tener otros receptores putativos según el serotipo y la célula blanco que infectan ⁵. Después del reconocimiento inicial entre el virus y su receptor específico en la superficie de la célula huésped, la partícula viral se internaliza a través de endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina. Posteriormente, la partícula viral se desencapsida y el ssRNA es liberado en el citoplasma celular. Este se dirige al retículo endoplásmico en donde se traduce directamente para generar las proteínas virales maduras. Después de la síntesis de las proteínas virales, la polimerasa viral (NS5) y el resto

de las proteínas no estructurales sintetizan una copia del RNA de polaridad negativa que servirá como molde para la síntesis de nuevas cadenas de polaridad positivas. En pocas horas después de la infección, se producen miles de copias virales a partir de una cadena molde, que se encapsidará para generar nuevos virus que serán capaces de infectar las células vecinas. (Figura 2) ^{1,6,7}.

Clasificación de la enfermedad producida por el virus dengue.

Aunque la mayoría de las infecciones por DENV son asintomáticas, en los pacientes sintomáticos se presenta una amplia variedad de manifestaciones

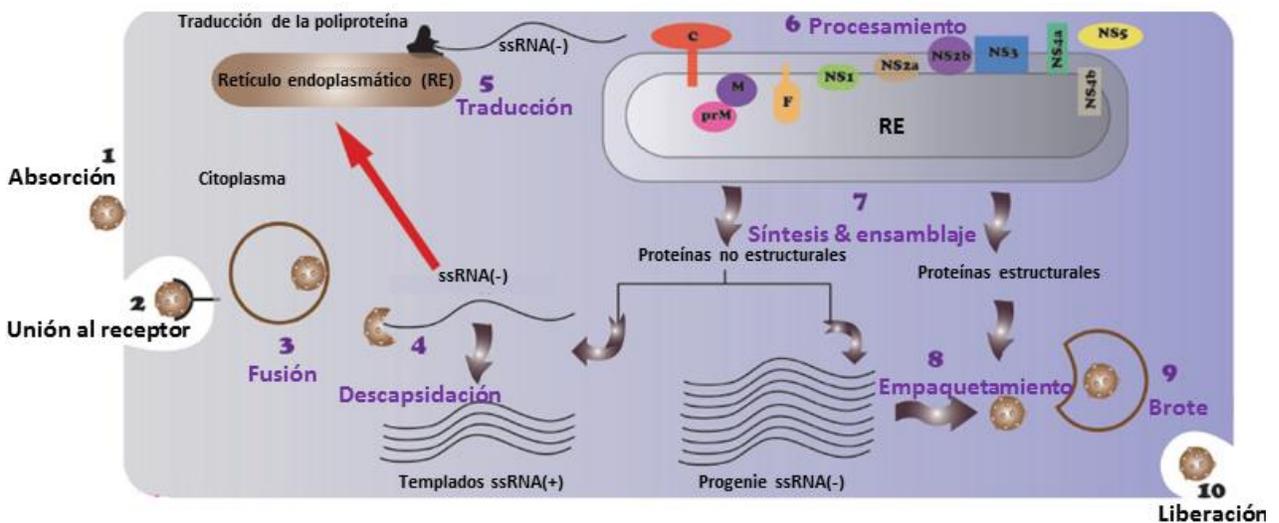


Figura 2. Ciclo replicativo del DENV. Pasos mediante los cuales el DENV realiza su replicación en la célula huésped. Una vez que el virus encuentra su receptor en la membrana celular (1) inicia su internalización (2) y se produce su fusión con lisosomas celulares (3) y su posterior desencapsidación a nivel de citoplasma (4), su genoma al ser de polaridad positiva pasa directamente a los ribosomas donde se transcriben las proteínas virales esenciales (5) para su procesamiento (6), síntesis, ensamblaje (7) y empaquetamiento (8), para después brotar (9) y ser liberado del interior de la célula (10). *Tomada y modificada* ⁶.

clínicas que van desde una enfermedad febril leve a una patología grave que puede ser mortal. El diagnóstico diferencial es amplio y varía según la evolución de la enfermedad.

La enfermedad se clasificaba anteriormente en fiebre por dengue (DF) y fiebre hemorrágica por dengue (DHF), esta última clasificada como de grado 1, 2, 3, o 4. Durante muchos años, hubo una creciente preocupación acerca de la complejidad y la utilidad de este sistema de clasificación. En particular, en cuanto a la

exigencia de que los cuatro criterios específicos (fiebre con duración de 2 a 7 días, tendencia a la hemorragia evidenciada por una prueba del torniquete positiva o sangrado espontáneo, un recuento de plaquetas menor de 100×10^9 por litro, y la demostración de una extravasación del plasma determinada por cambios en el hematocrito y efusión pleural. Sin embargo, ya que se debían cumplir todos los criterios para apoyar el diagnóstico de dengue hemorrágico, algunos pacientes con enfermedad clínicamente severa fueron categorizados inadecuadamente ^{3,8}.

Con la reciente revisión del esquema de clasificación del dengue, los pacientes son ahora clasificados con dengue o dengue severo. Los pacientes que se recuperan sin complicaciones mayores se clasifican con dengue, mientras que los que tienen alguna de las siguientes condiciones se les designa con dengue severo: extravasación del plasma resultante en un estado de shock, la acumulación de líquido seroso suficiente para causar dificultad respiratoria, o ambas; sangrado grave; y el deterioro grave de órganos ^{2,9}.

Patogénesis del dengue.

La investigación de la patogénesis del dengue severo se ve obstaculizada por la falta de un modelo animal que recree con precisión el síndrome de permeabilidad vascular transitoria, acompañado por una disminución en la carga viral observada en los pacientes. El aumento del riesgo de dengue severo tras una infección secundaria se cree que está relacionado con una amplificación de la infección viral mediada por anticuerpos en las células que presentan el receptor Fc γ *in vivo*, lo que da como resultado niveles elevados de proteínas de respuesta de fase aguda, citocinas y quimiocinas; la generación de un complejo inmune; la activación del complemento y la liberación de productos de degradación. A consecuencia, se promueve la permeabilidad vascular; sin embargo, esta hipótesis se basa en asociaciones temporales entre los marcadores inmunológicos y eventos clínicos, sin evidencia de una relación directa ^{3,10-13}.

Por otra parte, se ha identificado una vía no específica que se ha vinculado a eventos inmunopatogénicos conocidos con efectos definitivos sobre la permeabilidad microvascular, mecanismos tromboregulatorios, o ambos. Datos

preliminares sugieren que se produce la interrupción transitoria de la función de la capa endotelial glicocálix. Esta capa funciona como un tamiz molecular, restringiendo selectivamente moléculas dentro del plasma de acuerdo a su tamaño, carga y forma. Tanto el virus como la proteína NS1 del dengue se adhieren al heparán sulfato, al llevarse a cabo esta interacción, permite la liberación del heparán sulfato a la circulación ocasionando un cambio pequeño pero importante en las características de filtración del glicocálix, produciendo pérdida de proteínas esenciales para la coagulación que probablemente jueguen el papel principal en el desarrollo de la coagulopatía típica, la cual usualmente se manifiesta en un incremento en el tiempo parcial de tromboplastina acompañada por niveles bajos de fibrinógeno y baja evidencia de activación procoagulante ^{3,14}.

Por lo que, se necesita una comprensión más profunda de las interacciones moleculares de las proteínas del DENV con factores celulares durante la infección, para desarrollar nuevas estrategias para prevenir y tratar la infección por DENV ¹⁵. Resultados recientes, reportados en nuestro laboratorio, sugieren que el metabolismo de lípidos es de suma importancia para el desarrollo de la infección, perfilándose las enzimas implicadas en distintas rutas de síntesis de lípidos y colesterol como posibles blancos terapéuticos para contrarrestar la infección ^{16,17}.

Participación de los lípidos y el colesterol en el ciclo replicativo del virus Dengue.

En los últimos años, nuestro grupo de trabajo ha identificado y caracterizado componentes o proteínas celulares implicadas en la entrada y replicación de DENV. Esto, con el fin de diseñar estrategias para bloquear o reducir la eficiencia de infección. Entre las moléculas que hemos estudiado, está el colesterol, que es un lípido esteroide componente de las membranas celulares y parte esencial de secciones de membranas llamadas balsas lipídicas. Estas regiones rígidas de la membrana, ricas en colesterol y esfingolípidos, desempeñan funciones de plataformas para concentrar moléculas de señalización y de endocitosis ²³. La mayor parte de las moléculas descritas como receptores para DENV, en distintas líneas celulares, se encuentran en balsas lipídicas o se relocalizan a ellas después de la interacción con el virus ²⁴⁻²⁶. Por esto, la entrada de DENV a macrófagos,

células nerviosas, endoteliales y hepáticas es dependiente de colesterol en la membrana ²⁶⁻²⁸ Más aún, la señalización inducida por la infección, también es dependiente de colesterol. Además de la entrada mediada por su receptor específico, está bien descrito que DENV es capaz de entrar a macrófagos a través del receptor Fc ²⁹. Esta vía opera durante infecciones secundarias, en donde el virus se une a anticuerpos heterotípicos generados durante la primo-infección y el complejo virus-anticuerpo es internalizado a células como monocitos y células dendríticas a través del receptor Fcγ. Este proceso, que lleva a una infección más eficiente y que se conoce como aumento de la infección mediada por anticuerpos o ADE por sus siglas en inglés (antibody dependent enhancement), es dependiente de la relocalización del receptor Fc a balsas lipídicas ³⁰⁻³². Por tanto, nuestro grupo ha demostrado que la ausencia de colesterol en los macrófagos impide tanto la entrada mediada por el receptor viral natural como por el receptor Fc ^{26,29}. Por otro lado, varios grupos, incluido el nuestro han demostrado que el colesterol también es necesario para la replicación viral y que los lípidos en general juegan un papel central en la infección por DENV ^{27,28,33}. Acorde a lo anterior, recientemente describimos que dado que DENV requiere colesterol en su ciclo replicativo, éste induce un aumento en la cantidad de colesterol celular a tiempos tempranos post-infección (de 1 a 6 horas). Este incremento se debe a un aumento en la captación de colesterol, debida a un aumento en la cantidad del receptor LDL en la superficie celular y un aumento en la actividad de la enzima HMGCoA reductasa, debida a su defosforilación ²⁸. Todo lo anterior hace entendible el porqué, compuestos que inhiben la síntesis de colesterol, inhibiendo la actividad de la HMGCoA reductasa, como lo hacen las estatinas (lovastatina y pravastatina entre otras), inhiben la entrada y replicación viral ^{27,28,33}. En concordancia, también hemos encontrado que compuestos como el ácido nordihidroguayarético (NDGA), de la planta *Larrea tridentata*, que inhibe la actividad de la enzima lipooxigenasa y que es capaz de inhibir la síntesis de esteroides y particularmente de colesterol inhibe la infección por DENV en células hepáticas a nivel de entrada, replicación y ensamblaje ³⁴. En resumen, la dependencia de colesterol que tiene DENV hace evidente que éste componente celular pudiera ser un blanco para inhibir la infección. Como se mencionó

anteriormente, uno de los mecanismos que se dispara en las células infectadas con DENV es el incremento de la actividad de la HMGCAR debido a su desfosforilación. Este proceso de desfosforilación puede ser consecuencia de un aumento en la actividad de fosfatasa implicada en la desfosforilación de la enzima o una reducción de la actividad de quinasa que la fosforila (Figura 3).

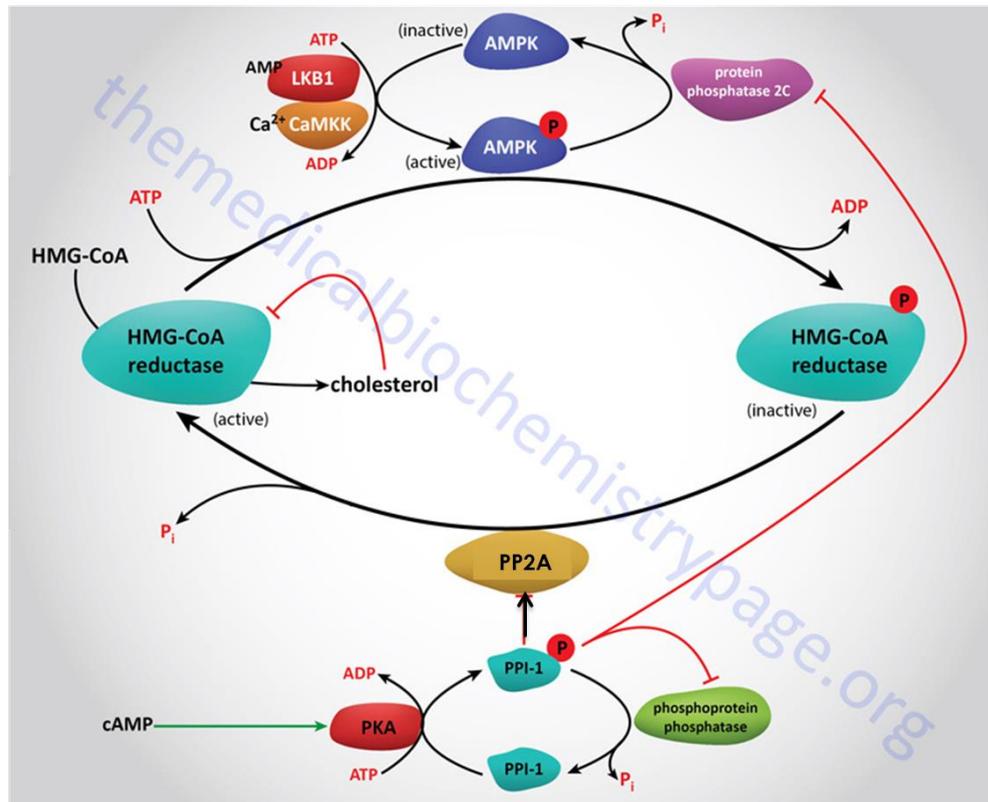


Figura 3. Modulación de la actividad de la HMGCAR. La HMGCAR es la enzima limitante en la síntesis de colesterol y es modulada de manera positiva por la fosfatasa PP2A, mientras que es modulada de manera negativa por la cinasa AMPK. Todo lo anterior, mediante procesos de fosforilación y desfosforilación.

Proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK).

La proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) fue descubierta como una enzima que inhibía preparaciones de acetil CoA carboxilasa (ACC) y 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa, HMGR) y que era inducida por AMP. Esta enzima induce una cascada de eventos en las células en respuesta a los constantes cambios de energía. El papel de la AMPK en la regulación de la

carga de energía de la célula coloca a esta enzima en un punto central de control para mantener la homeostasis de energía. Evidencia reciente demuestra que la actividad de la AMPK puede también ser regulada por estímulos fisiológicos, independientemente de la carga de energía de la célula, incluyendo hormonas y nutrientes. Una vez activada, la fosforilación mediada por la AMPK cambia a la célula de consumir ATP en forma activa (biosíntesis de ácidos grasos y colesterol) a la producción activa de ATP (oxidación de ácidos grasos y glucosa). Estos eventos son iniciados rápidamente y se los refiere como procesos de regulación en el corto plazo. La activación de la AMPK también tiene efectos a largo plazo a nivel de expresión de genes y síntesis de proteínas ^{17,18}.

Como se describió en los antecedentes, la célula infectada con DENV requiere sintetizar membranas de retículo endoplásmico para la creación de los complejos de replicación viral además de aumentar la cantidad de ATP celular necesario para la síntesis de partículas virales. Sumado a lo anterior, sabemos que la actividad de HMG CoA reductasa se aumenta a consecuencia de su defosforilación. Esta defosforilación puede ser consecuencia de la reducción de la actividad de la AMPK.

Proteína fosfatasa 2A

Una vía alterna a la falta de fosforilación de la HMG CoA reductasa sería el incremento de la actividad de la PP2A. La protein-fosfatasa 2A (PP2A) es la principal serin/treonina fosfatasa en las células, ampliamente conservada en los organismos eucariontes. La PP2A es una holoenzima que está constituida por tres subunidades individuales y específicas; una subunidad catalítica (C) de 36 kDa, una subunidad estructural (A) de 65 kDa, y una subunidad de tipo B regulatoria/variable. PP2A tiene un papel crítico en la regulación de la homeostasis, donde la función predominante es defosforilar las principales vías de señalización en la célula, incluyendo aquellas que regulan el ciclo celular, el metabolismo, la supervivencia y la migración.

Cambios en el ensamblaje, actividad y especificidad de sustrato en esta holoenzima tiene un rol directo en el desarrollo de patologías como lo es el cáncer.

Investigaciones recientes ponen en realce como la modulación de la función de PP2A por proteínas virales puede intervenir en su correcta función. Por ejemplo, algunas proteínas virales reemplazan a la subunidad B, se unen al resto del complejo de esta holoenzima actuando como subunidad B por sí mismas. Esto se refleja en la alteración de la actividad y de su localización, dando lugar a la desregulación de las vías de señalización donde PP2A generalmente actúa. Sin embargo, se requiere más investigación al respecto¹⁹⁻²¹.

JUSTIFICACION

Durante la infección de células hepáticas con DENV suceden una serie de eventos fisiopatológicos y celulares los cuales están muy relacionados con el metabolismo de lípidos y colesterol, perfilándose como futuros blancos terapéuticos que puedan ser activados o inactivados y así disminuir la infección viral. La AMPK y la PP2A son dos de las enzimas celulares capaces de regular la actividad de la HMGCoAR (enzima limitante en la síntesis de colesterol). A la fecha, no existen estudios que relacionen la actividad de estas enzimas con el desarrollo del ciclo replicativo de DENV. Por lo tanto, la medición de la actividad de AMPK y PP2A en respuesta a la infección con DENV, permitirá conocer algunas de las vías de señalización activadas tempranamente en la infección por DENV y que por tanto podrán ser usadas como posible blanco terapéutico para controlar la infección en su etapa temprana.

HIPOTESIS

Los cambios producidos durante la infección por DENV modulan la actividad de las enzimas AMPK y PP2A.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de compuestos moduladores de la actividad de AMPK y PP2A en la infección por DENV de células Huh-7

Objetivos particulares:

- ✓ Determinar el efecto del activador y del inhibidor de AMPK en la infección de células Huh-7 con DENV2.
- ✓ Evaluar el efecto del inhibidor de PP2A en la infección de células Huh-7 con DENV2.

MATERIALES Y METODOS

Cultivos celulares y cepas virales.

Células Huh-7 se crecieron en un medio DMEM suplementado con glutamina 2 mM, penicilina (5×10^4 U/mL)-estreptomicina (50 µg/mL), suero fetal bovino al 5%, 1 mL/L de anfotericina B a 37°C y en una atmosfera de CO₂ al 5%.

La propagación de la cepa de DENV2 de Nueva Guinea se llevó a cabo en cerebros de ratones CD1 lactantes y el título viral se determinó por ensayos de plaqueo en células BHK-21 como se ha descrito previamente ²⁰. Se utilizarán como controles los cerebros de ratones CD1 lactantes con una infección simulada.

Infección con DENV y tratamiento farmacológico.

Para el tratamiento farmacológico se utilizaron los siguientes fármacos: la metformina (AB120847) que es un activador de AMPK, el compuesto C (CALBIOCHEM, 171261) que es un inhibidor de AMPK, y el ácido okadaico (*Cell Signaling*, 5934) que es un inhibidor de PP2A. El protocolo de infección y tratamiento se desarrolló en la misma manera para todos los experimentos. En general, las células se lavaron tres veces con solución de *Hanks* (CaCl₂, KCl, KH₂PO₄, MgCl₂, MgSO₄, NaCl, NaHCO₃, Na₂HPO₄, glucosa y rojo de fenol), y se infectaron con DENV2 a MOI de 3 en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con 1% de suero fetal bovino. La infección se llevó a cabo por 2 horas a 37°C; posteriormente, se inactivaron las partículas de virus no internalizadas usando glicina ácida (H₂NCH₂COOH + HCl.), se lavaron 3 veces con PBS y se cultivaron con los diferentes fármacos en medio DMEM suplementado con suero por 24 y 48 horas a 37°C. Para el tratamiento con metformina se usaron las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mM en medio completo a partir de un *stock* de 100 g/ml diluido en agua milli Q. Para el tratamiento con ácido okadaico se usaron las concentraciones de 10 y 50 nM en medio completo a partir de un *stock* de 1 mM diluido en SDS. Para los tratamientos con compuesto C, se usaron las concentraciones de 1, 10 y 25 µM, en medio completo a partir de un *stock* de 1 mM.

Inhibición farmacológica de la infección por DENV determinada por ensayo de citometría.

Las células Huh-7 crecidas en placas de 12 pozos para el ensayo de FACS, fueron infectadas y tratadas como se describe anteriormente. A las 24 y 48 horas de infección, se recolectaron y se fijaron en paraformaldehído al 1% (PFA), se incubaron por 20 min con solución permeabilizadora (PBS 1X, saponina 0.1% y FBS 1%). A continuación se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal anti-E y se usó como segundo anticuerpo un anticuerpo de burro anti-ratón-Alexa 488 o un anticuerpo de cabra anti-conejo-Alexa 555. El análisis se realizó en el equipo BD LSR Fortessa contándose 20,000 eventos por muestra y los resultados se expresaron en porcentaje de células infectadas normalizados con las células con la infección simulada, analizados con el *software FlowJo 7.6.5*. La viabilidad celular de los cultivos de células Huh-7 se monitoreó a diferentes concentraciones de los fármacos y se evaluó por la reducción del MTS de acuerdo al protocolo del fabricante (*cell titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Promega*).

Análisis de los niveles de la proteína NS1 de DENV por Western blot.

Para evaluar los niveles de expresión de la proteína NS1 en células infectadas de manera simulada (Mock) o infectadas con DENV2 y tratadas con los diferentes fármacos; las células se trataron como se explica anteriormente. . Posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X frío, y las células se lisaron con 20 μ L de *buffer* de lisis (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, glicerol 10% y tritón X-100 al 1%) que contenía inhibidor de proteasas *COMPLETE* (*Santa Cruz Biotechnology*). El lisado se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm y los niveles de proteína total se cuantificaron con el *kit Pierce BCA protein assay* (*Life technologies*). A partir de 30 mg de proteína se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato de sodio (*SDS-PAGE*) y el inmunomarcaje usando el anticuerpo monoclonal de conejo dirigido a la proteína NS1 de DENV (ABCAM) diluido 1:5000. La reacción se reveló por quimioluminiscencia usando el *kit Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (*Pierce*). Como control de carga se utilizó a la proteína β -actina. El

análisis densitométrico de las bandas correspondientes a la NS1 se realizó con el *software Image J (National Institutes of Health)* el cual genera un histograma con base en la intensidad de la banda. En este histograma se mide el área bajo la curva, la cual permite calcular el porcentaje de expresión de la proteína con respecto al control de carga.

Carga viral de DENV determinada por PCR en tiempo real.

Para determinar la cantidad de genoma viral, se obtuvo el RNA total por el método de Trizol (*Invitrogen*) y se desarrolló una qRT-PCR usando un ensayo del sistema de sondas TaqMan CFX96 (*Bio-Rad Laboratories*). La cantidad de los transcritos de RNA se calculó mediante la generación de una curva estándar de 10 diluciones seriadas de RNA aislado de células BHK-21 infectadas con DENV2 y se expresó como unidades formadoras de placa unidades equivalentes por mililitro (PFU eq/mL).

Análisis Estadístico.

Las diferencias entre los distintos tratamientos y los grupos control se evaluaron usando el programa estadístico *Sigma-Plot 11*. En todos los casos, la normalización de los datos se hizo usando el *test Shapiro-Wilk*, las evaluaciones paramétricas y no paramétricas también se llevaron a cabo. Para todos los análisis un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

RESULTADOS

Dada la importancia del colesterol en el ciclo replicativo de DENV y otros flavivirus, se investigó la posibilidad de que DENV incrementara la cantidad de colesterol total por medio del aumento de la actividad de la HMGCoA reductasa, todo esto, a través de la modulación de la actividad de las enzimas AMPK y PP2A.

Infección de células HUH-7 con DENV2.

El primer paso para evaluar la participación de AMPK y PP2A en la infección por DENV fue obtener un *stock* con alto título viral. Así, el virus DENV2 propagado en cerebro de ratones neonatos CD1, se tituló mediante el ensayo de titulación en placa lítica en células BHK-21. El título viral obtenido fue de 7.5×10^7 UFP/mL. Para comprobar la infectividad viral en células Huh-7, se evaluó el porcentaje de infección por la técnica de citometría de flujo a las 24 y 48 horas a una MOI de 3 (Figura 4). Como primer anticuerpo se usó el anticuerpo 4G2 y el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Como se observa, se obtuvo un porcentaje de células infectadas del 76.6% a las 24 horas y de un 96.1% a las 48 horas. Dado que a una MOI de 3 se observó una cantidad importante de células infectadas, se utilizaron estas condiciones para realizar los ensayos posteriores.

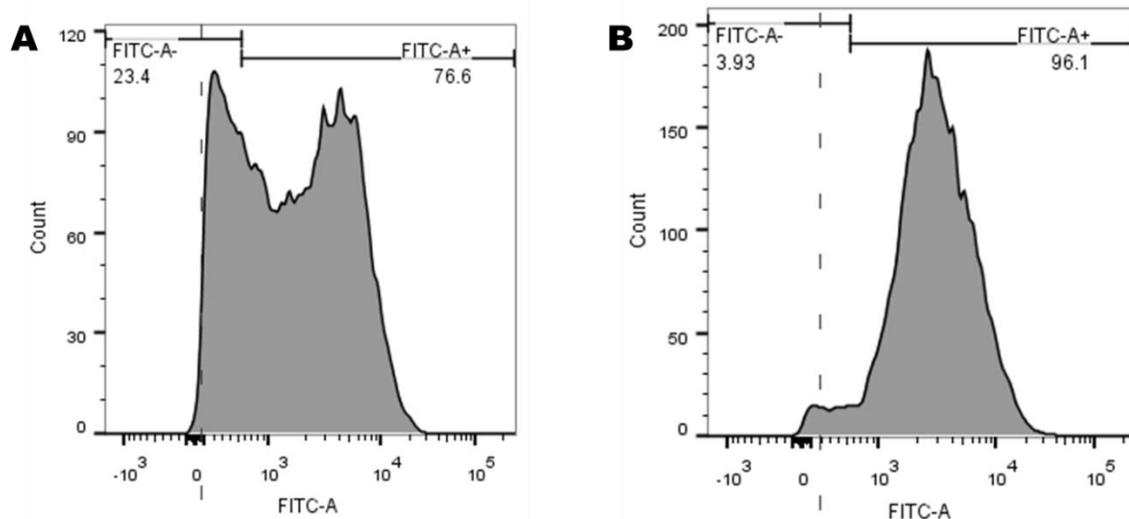


Figura 4. Porcentaje de células HUH-7 infectadas con DENV2 por 24 y 48. Las células HUH-7 fueron infectadas con DENV2 por 24 (A) y 48 horas (B) a una MOI de 3. La cantidad de células infectadas se determinó mediante la técnica de citometría de flujo usando un anticuerpo anti-E 4G2 hecho en ratón y como anticuerpo secundario un anticuerpo Alexa 488 anti-ratón. Los histogramas muestran los resultados de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Evaluación de la viabilidad celular en células tratadas con los modulares de AMPK y PP2A.

Debido que se pretendía evaluar el efecto de fármacos moduladores de la actividad de AMPK y de PP2A, el primer paso fue realizar un ensayo de viabilidad celular de los cultivos de células Huh-7 a diferentes concentraciones de los diferentes fármacos por un periodo de 48 horas. De metformina se utilizaron concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mM; de compuesto C concentraciones de 1.0, 10 y 25 μ M; y de ácido okadaico concentraciones de 10, 50 y 100 nM (Figura 5).

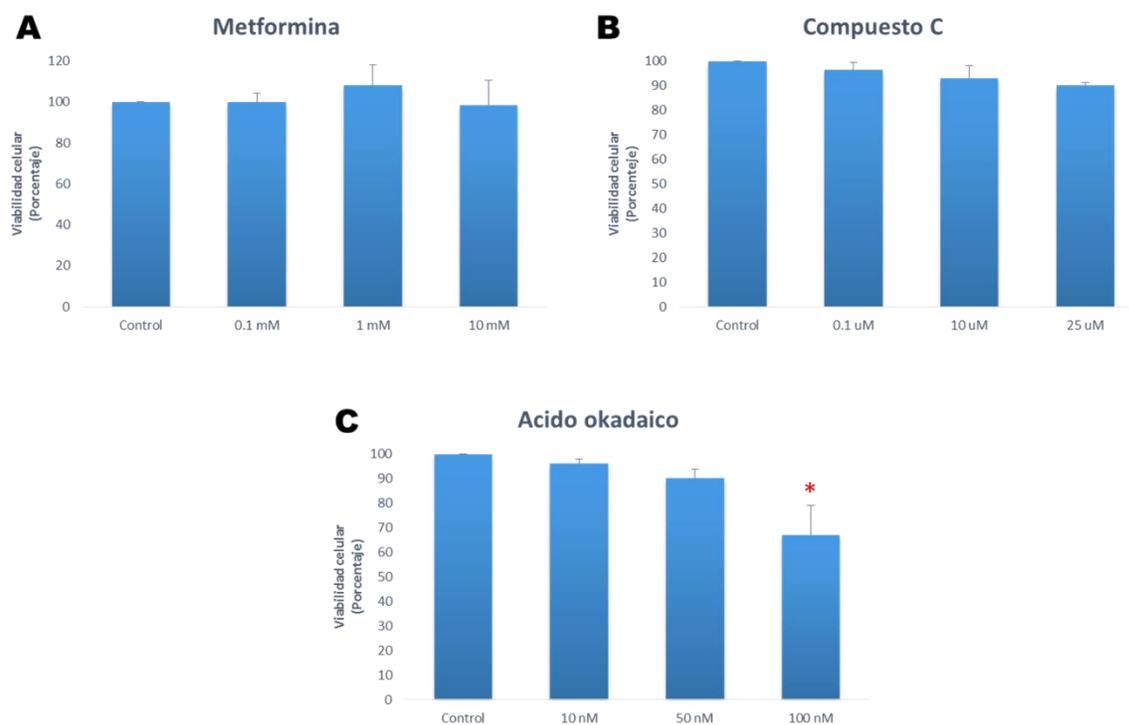


Figura 5. Efecto de la metformina, compuesto C y del ácido okadaico sobre la viabilidad de células HUH-7 a las 48 horas post-tratamiento. Las células HUH-7 fueron tratadas con metformina a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mM (A); con compuesto C a concentraciones de 1.0, 10 y 25 μ M (B) y con ácido okadaico a las concentraciones 10, 50 y 100 nM (C) por 48 horas, posteriormente se realizó el ensayo de viabilidad con MTS. La grafica de barras representa el porcentaje de células vivas en comparación al control. Únicamente se observó diferencia significativa en el tratamiento con ácido okadaico a una concentración de 100 nM ($p=0.01$).

Se observa que a ninguna de las concentraciones utilizadas de metformina y compuesto C presenta efecto significativo sobre la viabilidad celular, por lo que se procedió a utilizar todas las concentraciones para los siguientes experimentos. Sin embargo, a la concentración de 100 nM de ácido okadaico se observó un

descenso significativo de la viabilidad celular, por lo que se descartó esta concentración para los experimentos posteriores, y se utilizaron las concentraciones de 10 y 50 nM.

Evaluación de la modulación de AMPK y PP2A en la infección por DENV.

La modulación de la actividad de AMPK consistió en utilizar un fármaco que activa su función enzimática y otro que la inhibe, estos fueron la metformina y el compuesto C, respectivamente.

La metformina activa indirectamente la actividad de AMPK, debido a que se une a la ATP sintasa mitocondrial inhibiendo su función e incrementando el AMP citoplasmático, este a su vez se une a la AMPK activándola. Por otra parte, el compuesto C es un inhibidor competitivo de AMPK, debido a que presenta una estructura química similar al AMP por lo que ocupa el sitio de este en la enzima y no permite el cambio conformacional que la enzima requiere para que pueda ser fosforilada en su tirosina 172 y así activarse. En el caso del inhibidor de PP2A, que es el ácido okadaico en un compuesto químico que interacciona de manera directa en el sitio catalítico de la enzima inhibiendo así su función.

Efecto de la modulación positiva de AMPK en la infección por DENV

Tomando como base lo anterior, se procedió a evaluar la participación de la AMPK en la infección por DENV, modulando su actividad.

Primeramente se sembraron células Huh-7 en una multiplaca de 12 pozos y se infectaron con DENV2 a una MOI de 3 por dos horas, posteriormente, se retiró el inoculo y se añadió el activador de la AMPK (metformina) a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mM durante 24 y 48 horas. Así se observó que a las 24 horas post-tratamiento hay una reducción significativa del porcentaje de células infectadas a las concentraciones de 1.0 ($p=0.001$) y 10 mM ($p=0.001$). De manera similar, se observó una reducción significativa del porcentaje de células infectadas a las 48 horas post-tratamiento a una concentración de 10 mM ($p=0.01$) (Figura 6). Estos resultados sugieren que al activar a la AMPK se desencadenan procesos que reprimen la infección por DENV.

Para conocer más acerca de cómo AMPK reprime la infección viral, se quiso conocer si la activación de AMPK afecta los procesos de replicación y traducción del genoma viral; sin embargo, debido a que, estos dos procesos no pueden ser evaluados por separado, no podemos afirmar que los cambios observados en los niveles de RNA y proteínas virales se deba a cambios en uno u otro proceso específicamente.

Dicho lo anterior, se evaluó inicialmente el efecto de la metformina sobre los niveles de expresión del genoma viral. Mediante los procedimientos de infección y

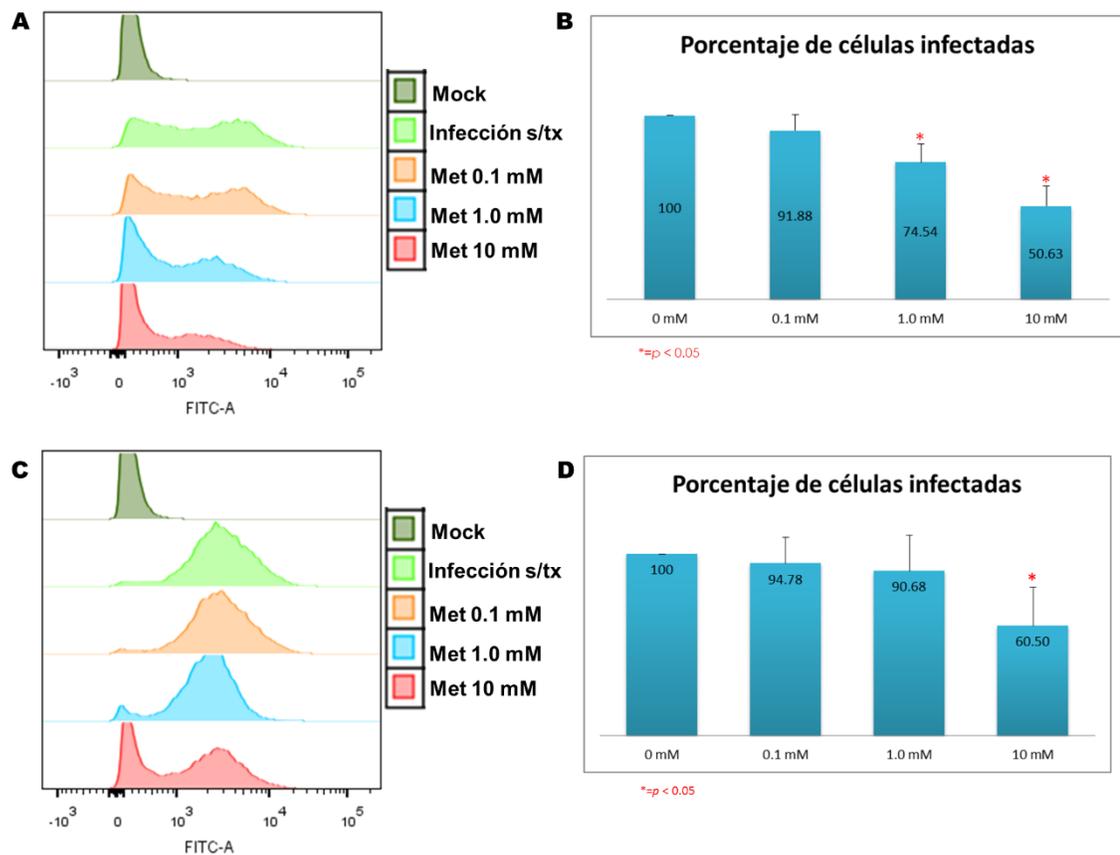


Figura 6. La activación de AMPK reduce el porcentaje de células infectadas con DENV2 a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Las células Huh-7 fueron infectadas con DENV2 por dos horas, posteriormente se trataron con metformina a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mM durante 24 (A y B) y 48 horas (C y D). Para determinar el porcentaje de células infectadas las células fueron preparadas para su análisis mediante citometría de flujo. A y C representan histogramas representativos obtenidos de este análisis. B y D muestran los porcentajes de células infectadas graficados y obtenidos de 3 experimento independientes realizados por duplicado. A las 24 horas (B) se observa diferencia significativa a las concentraciones de 1.0 (p=0.01) y 10 mM (0.01); mientras que a las 48 horas (D) la diferencia significativa se observa únicamente a la concentración de 1.0 mM (p=0.01).

tratamiento mencionados con anterioridad, se procedió a extraer el RNA total, el cual mediante una reacción de RT-PCR se produjo cDNA, el cual fue utilizado posteriormente para determinar la cantidad de genoma viral por medio de la técnica de PCR en tiempo real. En los resultados obtenidos se observa que la metformina reduce la cantidad de genoma viral a las concentraciones de 1.0 y 10 mM a las 24 (A) y 48 horas (B) (Figura 7).

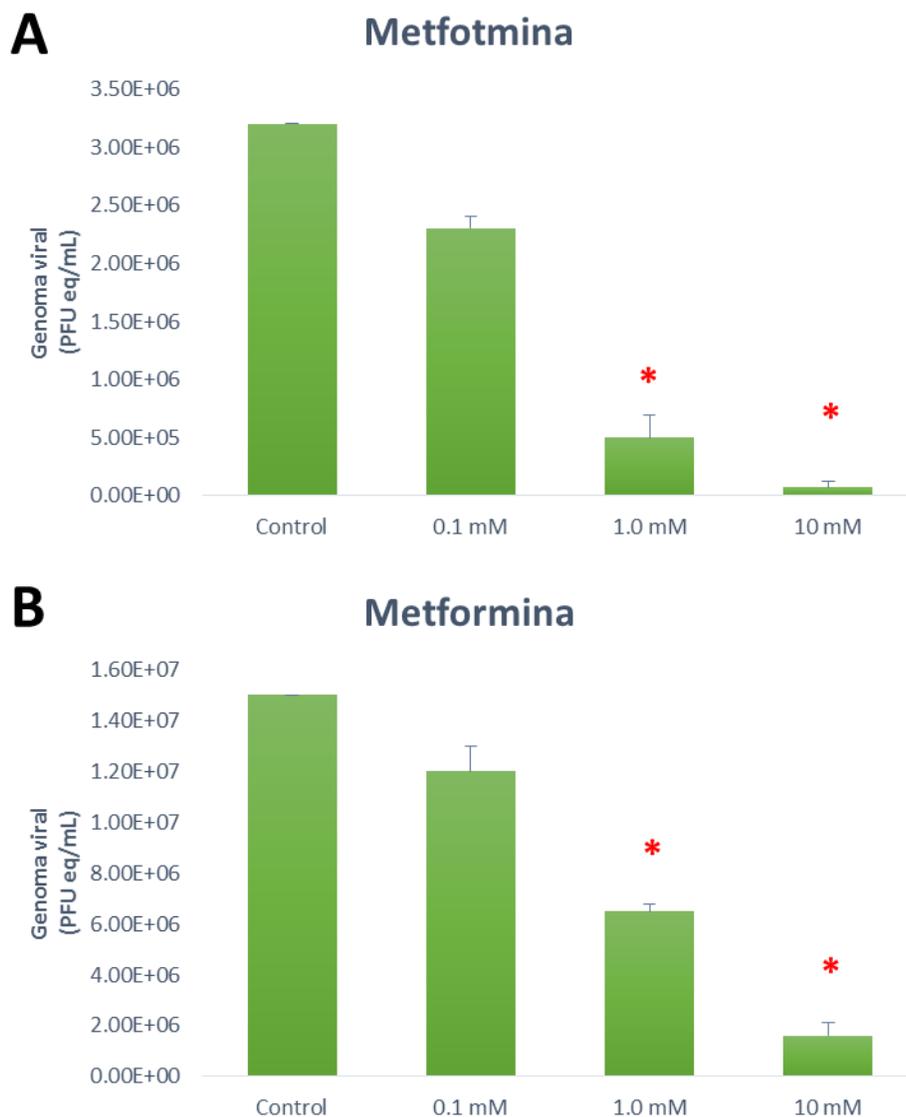


Figura 7. La activación de AMPK reduce la replicación del genoma de DENV. El RNA total de células Huh-7 tratadas con metformina a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mM por 24 y 48 horas se analizó por RT-qPCR para determinar la cantidad de genoma viral. La cantidad de genoma viral es expresada como la media +/- SEM de PFU eq/mL de tres experimentos independientes. *diferencia significativa (P=0.01).

Por otra parte, también se evaluó el efecto de la metformina sobre los niveles de expresión de la proteína NS1 por ensayo de *western blot*. Para tal propósito se infectaron células Huh-7 con DENV2 y se trató con las concentraciones y tiempos arriba mencionados de metformina, a continuación, se lisaron las células con *buffer* de lisis y se procedió a recolectar las proteínas totales. Se realizó un corrido electroforético de las proteínas totales y un inmunomarcaje en el cual se utilizó un anticuerpo anti-NS1, se reveló por quimioluminiscencia y se procedió a realizar un análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los resultados obtenidos muestran que a las concentraciones de 1.0 (0.01) y 10 mM (0.01) existe reducción significativa de los niveles de expresión de la proteína NS1 a las 24 y 48 horas post-tratamiento (Figura 8). Estos resultados en conjunto nos sugieren que la activación de la AMPK inhibe la replicación del genoma viral, así como la síntesis de proteínas virales.

Estudios recientes describen la participación de las *lipid droplets*, sobre la morfogénesis del DENV (referencia). Las *lipids droplets* son compartimientos intracelulares de reserva de lípidos, en los cuales se ha descrito que el colesterol es un componente importante. Para investigar si la modulación positiva de AMPK puede relacionarse también con cambios en la producción de partículas virales. Se procedió a determinar el título viral de los sobrenadantes recolectados de los tratamientos a las diferentes concentraciones de metformina. En los resultados obtenidos con este ensayo podemos observar que a la concentración de 1.0 ($p=0.001$) y 10 mM ($p=0.01$) existe una reducción significativa de la producción de partículas virales en comparación al control a las 24 y 48 horas (Figura 9). Estos resultados sugieren que la metformina repercute no solo en los procesos de replicación y traducción del genoma viral, y por lo tanto en la producción de partículas virales. Todo lo anterior soporta la idea de que la activación de la AMPK por metformina induce la inactivación de la HMGCoAR y esto conlleva a una baja síntesis de colesterol, necesario para una eficiente infección viral.

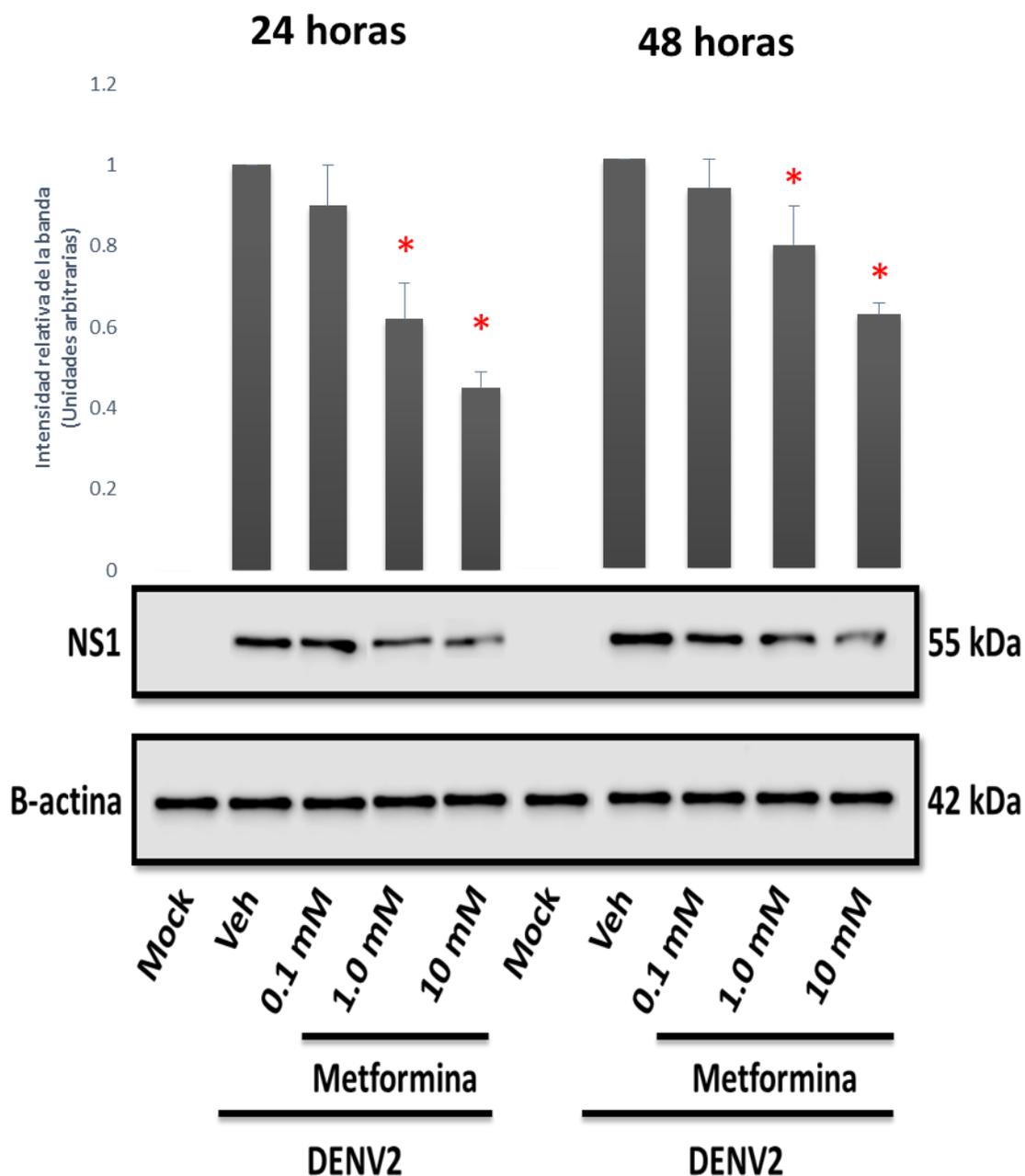


Figura 8. La activación de AMPK disminuye los niveles de expresión de la proteína viral NS1 a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Extractos totales de células Huh-7 tratadas con metformina a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mM por 24 y 48 horas se analizaron por *Western blot* para determinar los niveles de expresión de la proteína viral NS1 utilizando un anticuerpo anti-NS1. Como control de carga se utilizaron anticuerpos anti-B-actina. Análisis densitométrico de tres experimentos independientes se muestra en las gráficas de barras. *diferencia significativa ($P=0.01$).

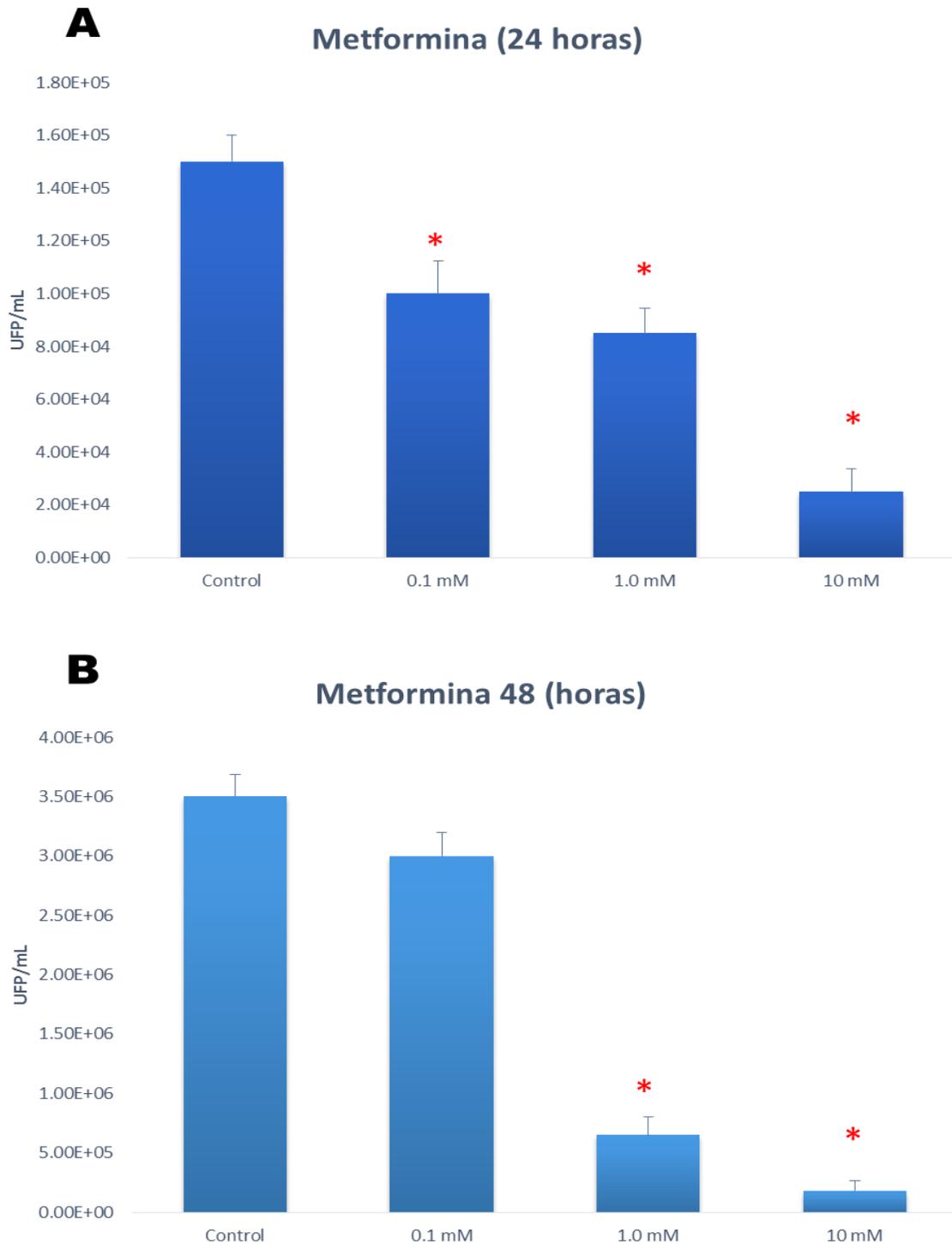


Figura 9. La activación de AMPK disminuye la progenie viral a las 24 y 48 horas post-tratamiento en células HUH-7. Titulación del sobrenadante de células HUH-7 infectadas con DENV2 no tratadas (control) o tratadas con metformina a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mM por 24 (A) y 48 (B) horas. Se observa diferencia significativa de los tratamientos a las 24 horas a las 3 concentraciones utilizadas ($P=0.01$) y a las 48 horas se observa únicamente en dos concentraciones ($P=0.01$).

Efecto de la modulación negativa de AMPK en la infección por DENV.

Continuando con el estudio de la participación de AMPK en la infección por DENV, se decidió inhibir su actividad enzimática utilizando el compuesto C y se procedió a evaluar el efecto resultante por diversos métodos. Se procedió inicialmente a infectar a las células Huh-7 con DENV2 y a tratarse con concentraciones de compuesto C de 1.0, 10 y 25 μM durante 24 y 48 horas. Se

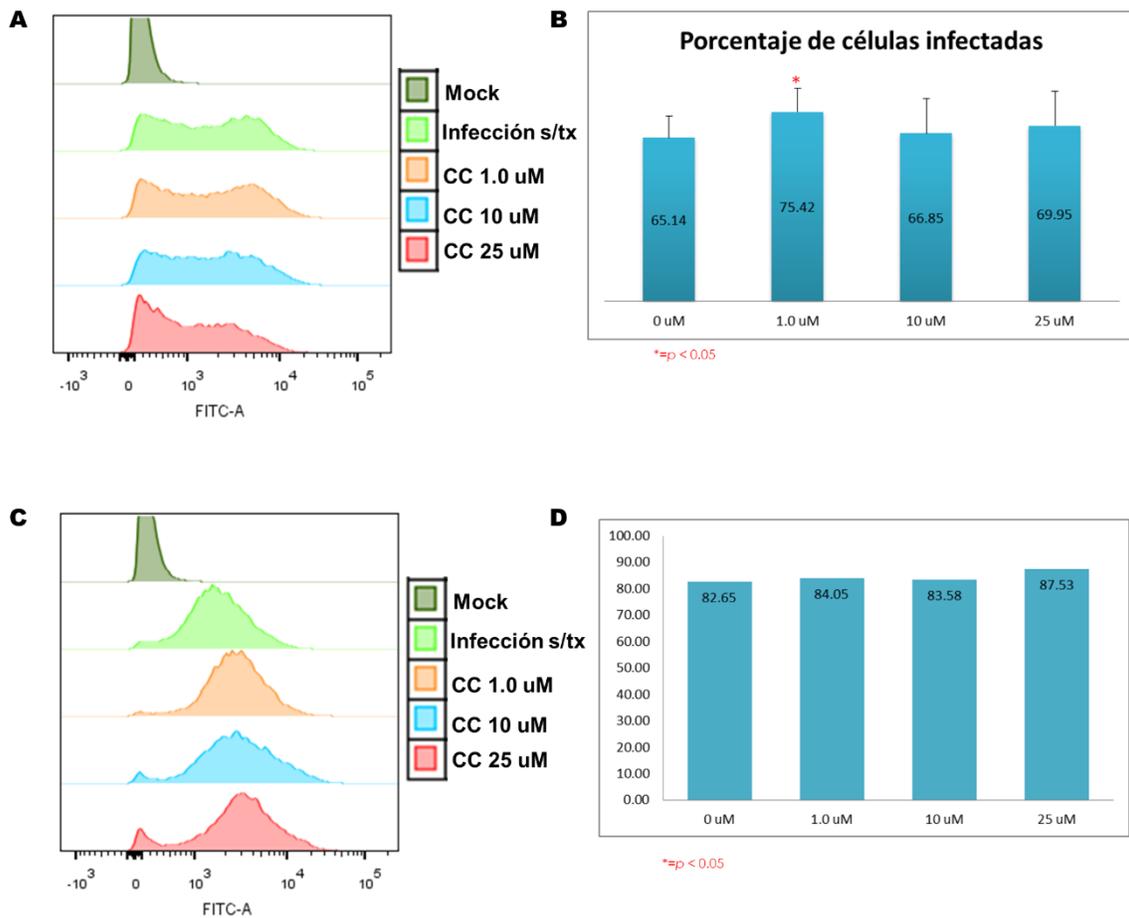


Figura 10. La disminución en la actividad de AMPK no modifica el porcentaje de células infectadas con DENV2 a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Las células Huh-7 fueron infectadas con DENV2 por dos horas, posteriormente se trataron con compuesto C a las concentraciones de 1.0, 10 y 25 μM durante 24 (A y B) y 48 horas (C y D). Para determinar el porcentaje de células infectadas las células fueron preparadas para su análisis mediante citometría de flujo. A y C representan histogramas representativos obtenidos de este análisis. B y D muestran los porcentajes de células infectadas graficados y obtenidos de 3 experimento independientes realizados por duplicado. A las 24 horas (B) se observa diferencia significativa a las concentraciones de 1.0 ($p=0.01$) y 10 μM ($p=0.01$); mientras que a las 48 horas (D) la diferencia significativa se observa únicamente a la concentración de 1.0 μM ($p=0.01$).

procedió a evaluar el porcentaje de células infectadas por la técnica de citometría de flujo, como ya ha sido descrita anteriormente; en la cual se observó que a las 24 horas post-tratamiento hay un incremento significativo del porcentaje de células infectadas al utilizar la concentración de 1.0 μM ($p=0.004$). Sin embargo, no se observó cambio significativo con las demás concentraciones a las 24 horas ni a las 48 horas (Figura 10). Estos resultados sugieren que la inhibición de la AMPK no afecta la infección por DENV.

Aunque no se observó cambio significativo en el porcentaje de células infectadas, se quiso conocer si existía cambio en los niveles de expresión del genoma y las proteínas virales, así como en la producción de partículas virales. Por lo que los parametros anteriores se evaluaron por PCR en tiempo real, *western blot* y ensayos de plaqueo.

Los resultados de la PCR en tiempo real indican que al utilizar las concentraciones de 10 y 25 μM se observa un incremento significativo en la cantidad de genoma viral a las 24 (A) y 48 (B) horas (Figura 11).

Por otra parte, también se evaluó el efecto del compuesto C sobre los niveles de expresión de la proteína NS1 por ensayo de *Western blot*. Para tal propósito, se infectaron células Huh-7 con DENV2 y se trataron con las concentraciones y tiempos arriba mencionados de compuesto C. A continuación, se lisaron las células y se procedió a recolectar las proteínas totales. Se realizó un corrido electroforético y un inmunomarcaje en el cual se utilizó un anticuerpo anti-NS1, se reveló y se procedió a realizar un análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los resultados obtenidos muestran que a las concentraciones de 25 μM (0.01) existe aumento significativo de los niveles de expresión de la proteína NS1 a las 24 y a las concentraciones de 10 (0.01) y 25 (0.01) μM a las 48 horas post-tratamiento (figura 12). Estos resultados en conjunto nos sugieren que la inactivación de AMPK incrementa la replicación viral, así como la producción de la proteína viral NS1.

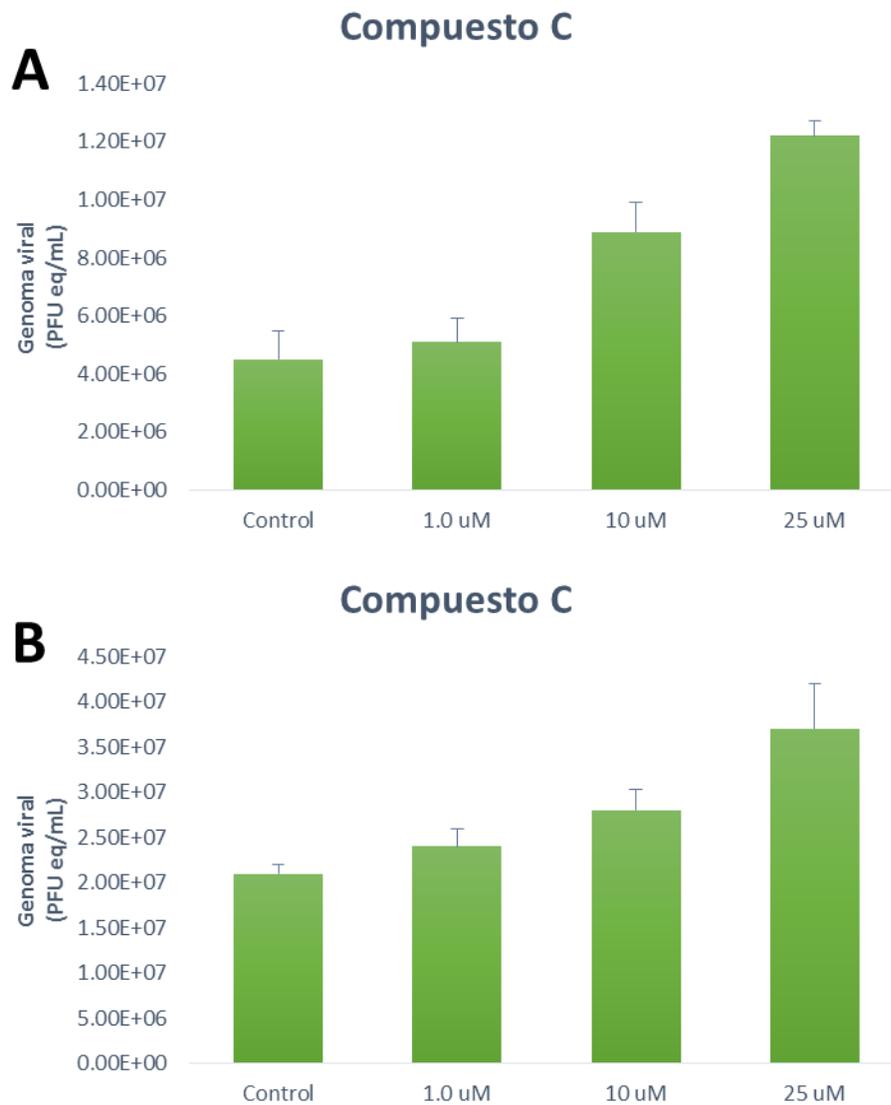


Figura 11. La disminución de la actividad de AMPK incrementa la replicación del genoma de DENV. El RNA total de células Huh-7 tratadas con compuesto C a las concentraciones de 1.0, 10 y 25 µM por 24 y 48 horas se analizó por RT-qPCR para determinar la cantidad de genoma viral. La cantidad de genoma viral es expresada como la media +/- SEM de PFU eq/mL de tres experimentos independientes. *diferencia significativa (P=0.01).

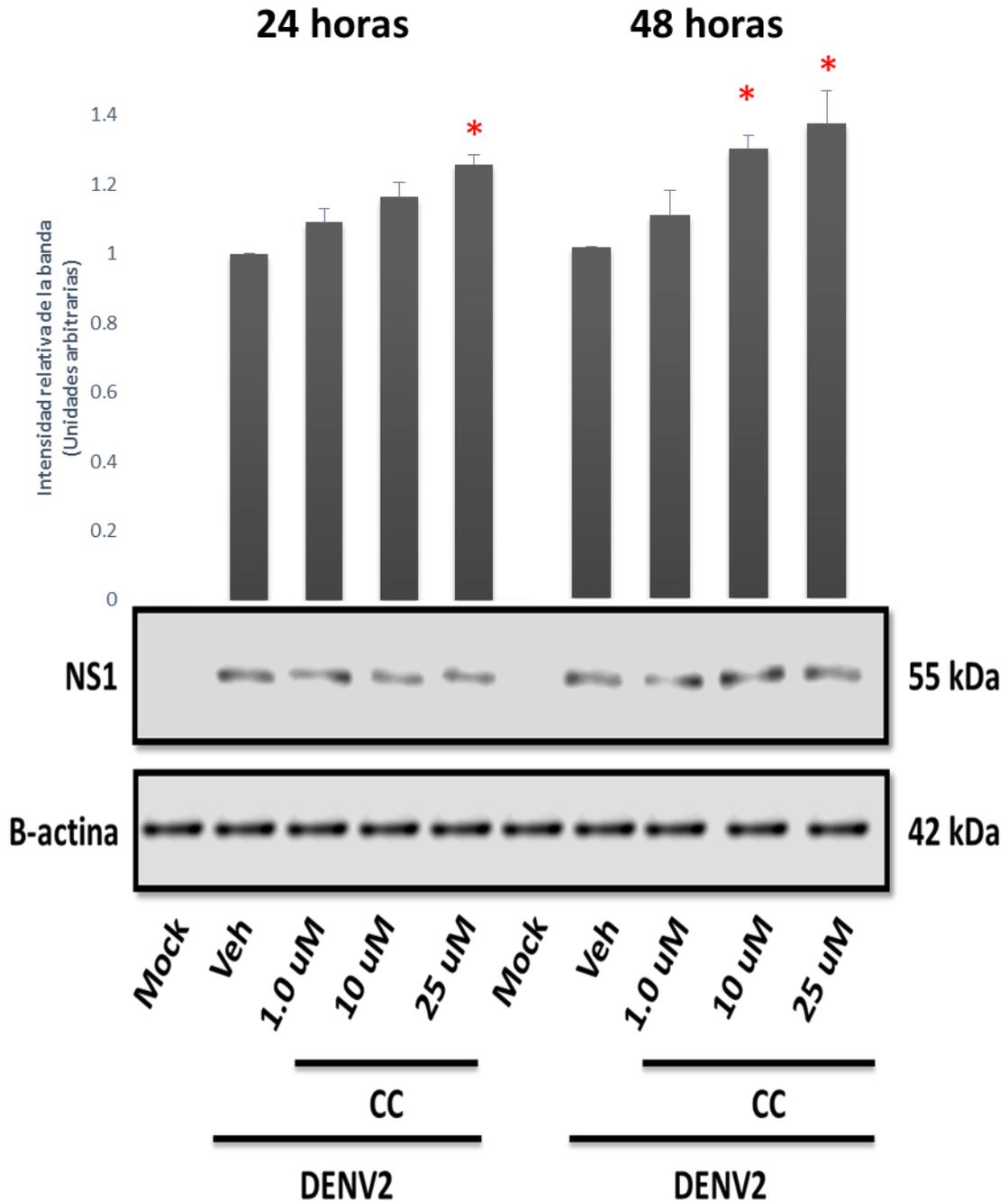


Figura 12. La inactivación de AMPK incrementa los niveles de expresión de la proteína viral NS1 a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Extractos totales de células Huh-7 tratadas con compuesto C a las concentraciones de 1.0, 10 y 25 uM por 24 y 48 horas se analizaron por *Western blot* para determinar los niveles de expresión de la proteína viral NS1 utilizando un anticuerpo anti-NS1. Como control de carga se utilizaron anticuerpos anti-B-actina. Análisis densitométrico de tres experimentos independientes se muestra en las gráficas de barras. *Diferencia significativa (P=0.01).

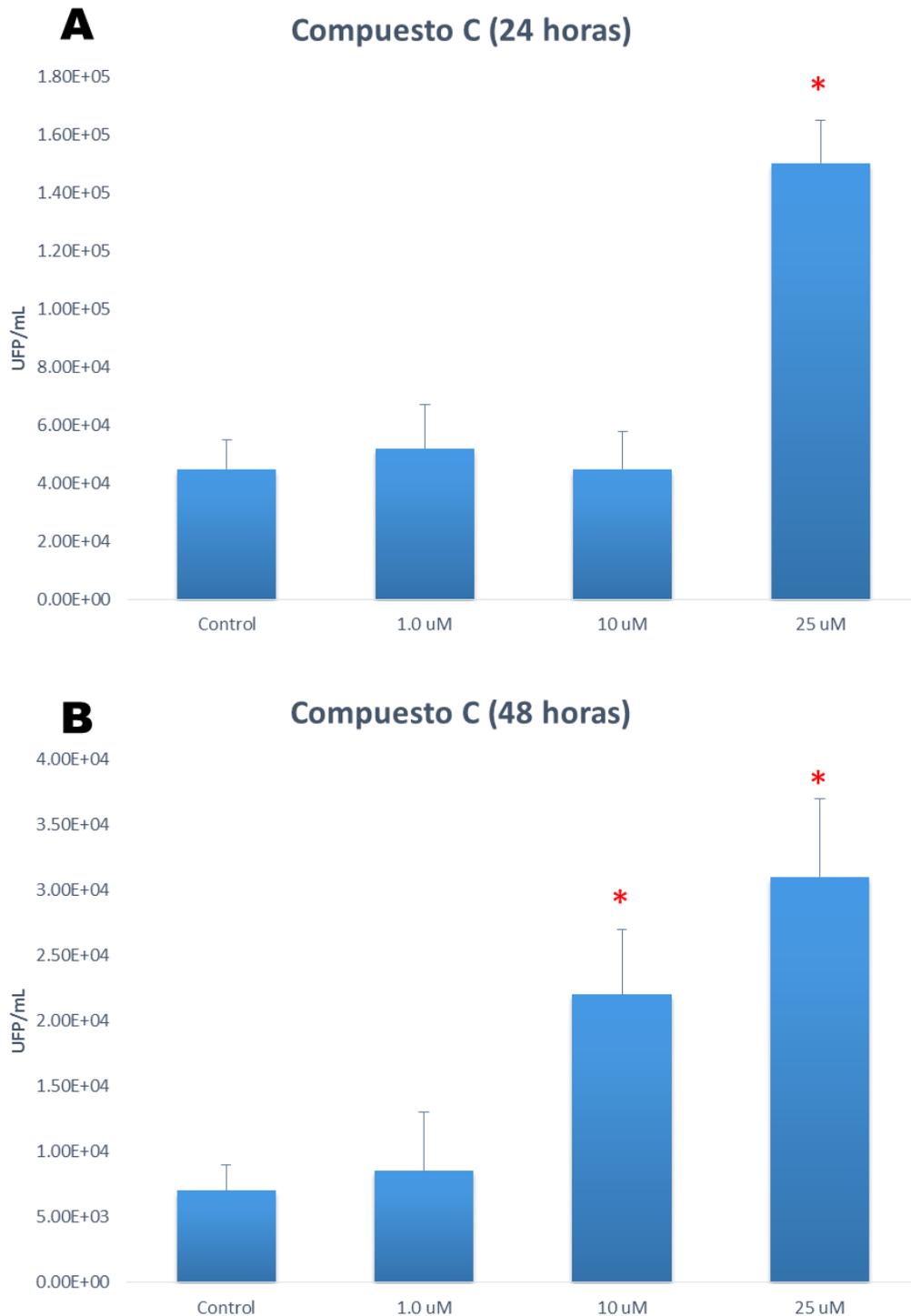


Figura 13. La inactivación de AMPK incrementa la progenie viral a las 24 y 48 horas post-tratamiento en células Huh-7. Las células Huh-7 fueron infectadas a MOI de 3 y tratadas con compuesto C a las 24 y 48 horas, a las concentraciones de 1.0, 10 y 25 μ M por 24 (A) y 48 (B) horas. Se recolectó el sobrenadante para la cuantificación de partículas virales por ensayo de plaqueo. Se observa diferencia significativa de los tratamientos a las 24 horas a la concentración de 25 μ M ($P=0.01$) y a las 48 horas se observa únicamente en dos concentraciones ($P=0.01$).

Para investigar si la modulación negativa de AMPK puede relacionarse también con cambios en la producción de partículas virales. Se procedió a determinar el título viral de los sobrenadantes recolectados de los tratamientos a las diferentes concentraciones de compuesto C. En los resultados obtenidos con este ensayo podemos observar que a la concentración de 25 μM ($p=0.01$) existe un aumento significativo de la producción de partículas virales en comparación al control a las 24 horas (Figura 13A). Por su parte, a las 48 horas se observa aumento significativo a las concentraciones de 10 (0.01) y 25 μM (0.01) (Figura 13B). Estos resultados sugieren que el compuesto C permite un mejor desarrollo del ciclo replicativo de DENV.

Efecto de la modulación negativa de PP2A en la infección por DENV.

Con el antecedente de que la HMGC α es modulada de manera positiva por la PP2A, se decidió inactivar a esta fosfatasa y evaluar el efecto en la infección por DENV.

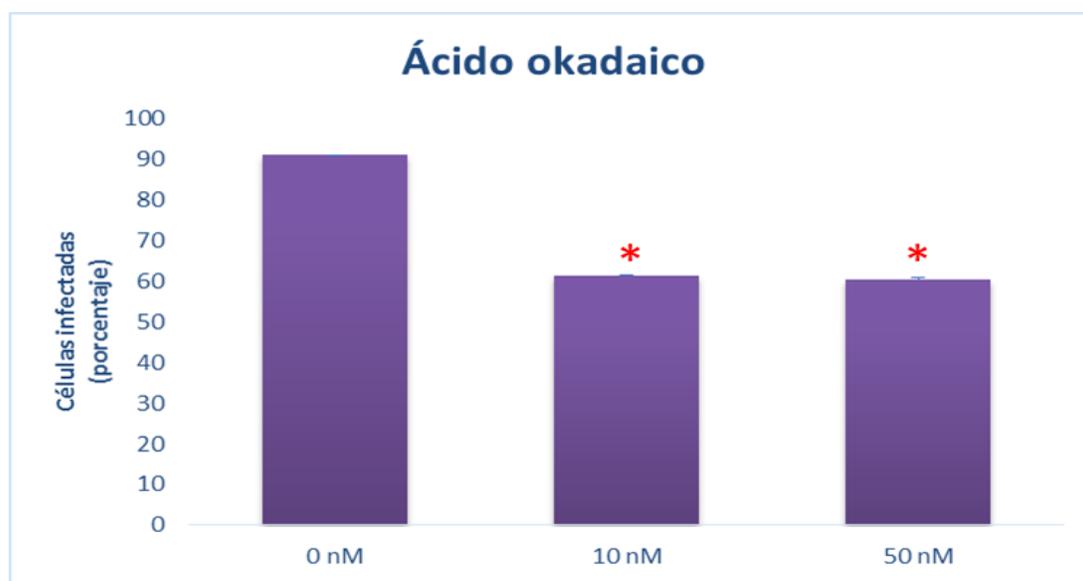


Figura 14. La inactivación de PP2A reduce el porcentaje de células infectadas con DENV2 a las 48 horas post-tratamiento con ácido okadaico. Las células Huh-7 fueron infectadas con DENV2 por dos horas, posteriormente se trataron con ácido okadaico a las concentraciones de 10 y 50 nM durante 48. Para determinar el porcentaje de células infectadas las células fueron preparadas para su análisis mediante citometría de flujo. Se observa diferencia significativa a ambas concentraciones ($p=0.01$).

Las concentraciones utilizadas de ácido okadaico para estos experimentos fueron 10 y 50 nM. Se procedió a realizar la infección y los tratamientos como se ha venido manejando, pero solo a las 48 horas post-tratamiento. Al evaluar el porcentaje de células infectadas por citometría de flujo, se observa una reducción significativa a ambas concentraciones ($p=0.01$), y se observa que esta disminución no es concentración dependiente (Figura 14).

Posteriormente, se quiso determinar la cantidad de genoma viral de DENV utilizando las condiciones de ácido okadaico arriba mencionadas, por lo que se procedió a realizar qRT-PCR de los RNA totales extraídos de cada condición. Los resultados indican que a ambas concentraciones la cantidad de genoma total disminuye significativamente ($p=0.01$) (Figura 15).

Por otra parte, también se evaluó el efecto del ácido okadaico sobre los niveles de expresión de la proteína NS1 por ensayo de *Western blot*. Para tal propósito se infectaron células Huh-7 con DENV2 y se trató con las concentraciones y tiempos arriba mencionados de ácido okadaico. A continuación, se lisaron las células y se procedió a recolectar las proteínas totales. Se realizó un corrido electroforético y un inmunomarcaje en el cual se utilizó un anticuerpo anti-NS1, se reveló y se procedió a realizar un análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los resultados obtenidos muestran que a ambas concentraciones (0.01) existe reducción significativa de los niveles de expresión de la proteína NS1 (Figura 16). Estos resultados en conjunto nos sugieren que la inactivación de PP2A reduce la cantidad de genoma viral, así como la producción de la proteína viral NS1.

Para investigar si la modulación negativa de PP2A puede relacionarse también con cambios en la producción de partículas virales, se procedió a determinar el título viral de los sobrenadantes recolectados de los tratamientos a las diferentes concentraciones de ácido okadaico. En los resultados obtenidos con este ensayo podemos observar que a las concentraciones utilizadas existe una reducción significativa ($p=0.01$) de la producción de partículas virales en comparación al control (Figura 17). Estos resultados sugieren que el ácido okadaico inhibe el desarrollo del ciclo replicativo de DENV.

Resultados recientes en nuestro laboratorio indican que el ácido okadaico no afecta la actividad de la HMGC_oAR (Soto-Acosta, *publicación en proceso*). Nuestros resultados obtenidos en conjunto sugieren que la inactivación de la PP2A repercute en los procesos de replicación, traducción del genoma, y en la producción de partículas virales, pero por una vía independiente a la defosforilación de la HMGC_oAR.



Figura 15. El ácido okadaico reduce la replicación del genoma de DENV. El RNA total de células Huh-7 tratadas con ácido okadaico a las concentraciones de 10 y 50 nM por 48 horas se analizó por RT-qPCR para determinar la cantidad de genoma viral. La cantidad de genoma viral es expresada como la media +/- SEM de PFU eq/mL de tres experimentos independientes. *diferencia significativa (P=0.01).

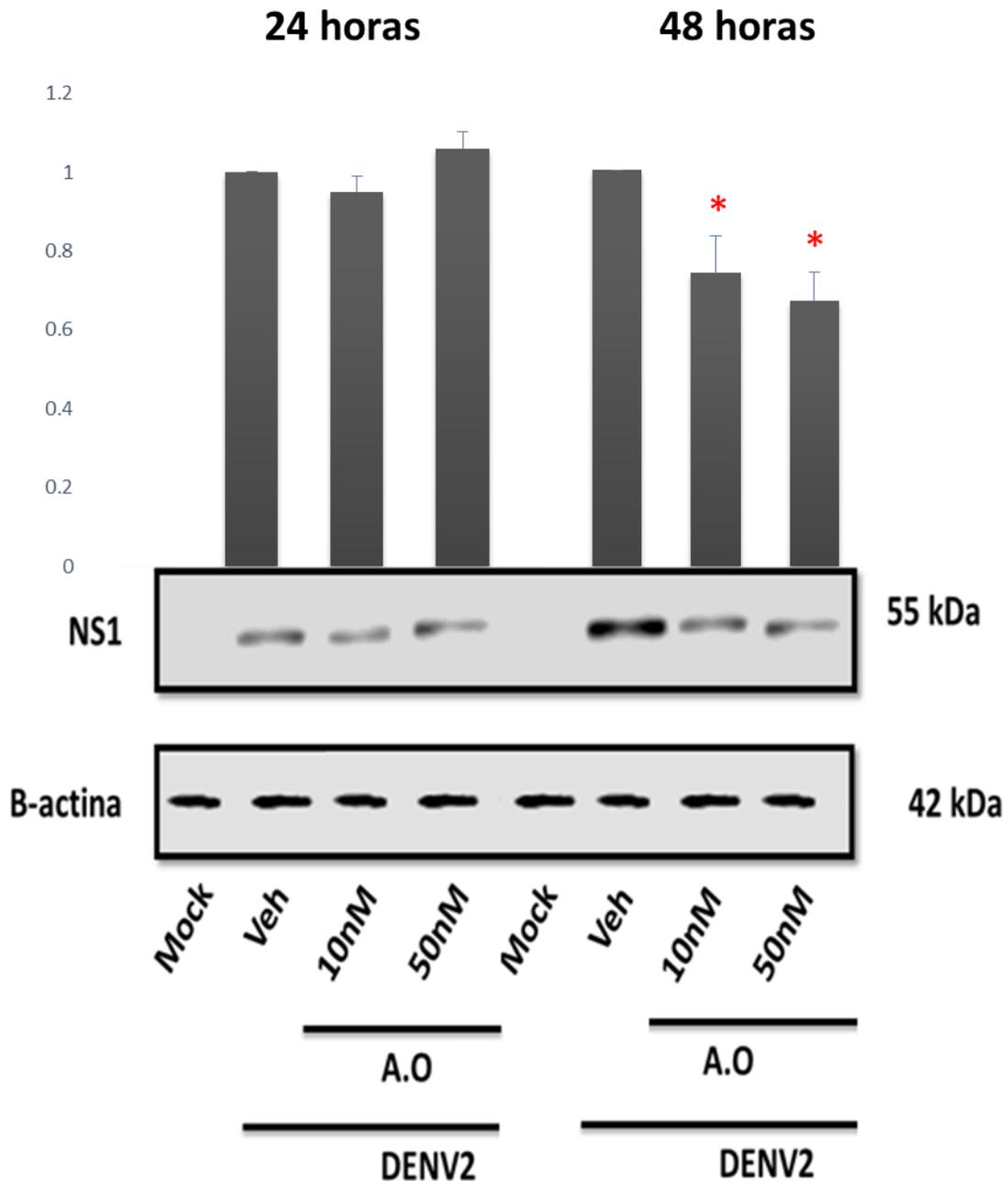


Figura 16. La inactivación de PP2A disminuye los niveles de expresión de la proteína viral NS1 a las 48 horas post-tratamiento. Las células Huh-7 fueron tratadas con ácido okadaico a las concentraciones de 10 y 50 nM por 48 horas. Los extractos totales se prepararon para su análisis por *western blot* para determinar los niveles de expresión de la proteína viral NS1 utilizando un anticuerpo anti-NS1. Como control de carga se utilizaron anticuerpos anti-B-actina. Se desarrolló un análisis densitométrico de tres experimentos independientes el cual se muestra en las gráficas de barras, las cuales representan el porcentaje de intensidad de la banda en comparación al control. Se observó diferencia significativa de los tratamientos en comparación con el control ($p=0.01$).

Acido okadaico

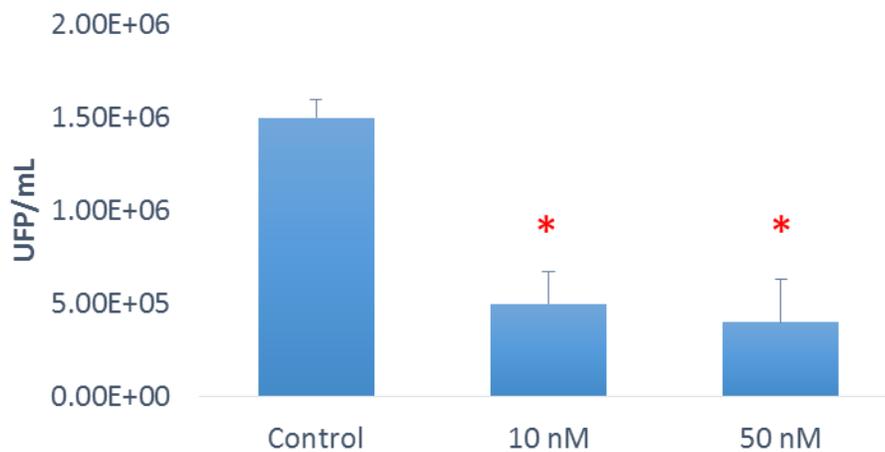


Figura 17. La inactivación de PP2A disminuye la progenie viral a las 48 horas post-tratamiento en células Huh-7. Las células Huh-7 fueron tratadas con ácido okadaico a las concentraciones de 10 y 50 nM por 48 horas. Se recolectó el sobrenadante para la cuantificación de partículas virales por ensayo de plaqueo. Se observa diferencia significativa de los tratamientos a ambas concentraciones utilizadas (P=0.01).

DISCUSION

En la actualidad las drogas antivirales son incluidas directamente en diversos regímenes para aumentar la eficacia de las terapias, por lo que la búsqueda de estas, es de suma importancia para desarrollar nuevos métodos que sean efectivos y de bajo costo para el tratamiento del dengue. La diversidad genética que presentan los serotipos de DENV, dificulta la elaboración de una vacuna que proteja de manera significativa a la población. Es por ello que el mayor reto es desarrollar fármacos que eviten el desarrollo del ciclo replicativo del virus. Para tal fin, es esencial un mejor entendimiento de la patogénesis que causa la infección por DENV, además de la identificación de componentes celulares que participan en su ciclo replicativo. Uno de estos componentes celulares, indispensable durante infección por DENV es el colesterol. Aunque se ha descrito que el colesterol es esencial para la entrada y eventos posteriores en algunas líneas celulares; se reporta también, que no es un componente necesario para que se lleve a cabo el ciclo replicativo en otros tipos celulares, como los de insecto. Por lo tanto, la replicación de DENV dependiente de colesterol aparentemente es específica de acuerdo al tipo celular.

La HMGCoAR es la enzima limitante en la síntesis de colesterol. Su actividad puede ser modulada mediante procesos de fosforilación y desfosforilación, por la AMPK y PP2A, respectivamente. Resultados recientes en nuestro laboratorio han demostrado que la activación de AMPK (p-AMPK) se encuentra disminuida durante la infección de DENV en células Huh-7, mientras que la actividad de la HMGCoAR se incrementa. Por su parte, la actividad de la PP2A no se modifica de manera significativa (Soto-Acosta en preparación).

A fin de evaluar si la cinasa dependiente de AMP (AMPK) y la fosfatasa PP2A participan llevando a cabo esta función durante la infección por DENV en células Huh-7, se utilizaron tres fármacos moduladores de estas proteínas: metformina (activador de AMPK), compuesto C (inhibidor de AMPK) y ácido okadaico (inhibidor de PP2A).

La dosis de metformina prescrita para pacientes diabéticos se encuentra en el rango de 6.7 a 11.3 mg/ kg de peso. La concentración de metformina utilizada en estos experimentos fue menor. El compuesto C es una droga sintética que en la actualidad solo se utiliza para fines de investigación. Las concentraciones de este compuesto, utilizadas en este trabajo, se tomaron en cuenta de acuerdo a lo reportado en la bibliografía.

El pre-tratamiento de células HuH-7 con metformina a las concentraciones de 1.0 y 10 mM, en las cuales no se modifica la viabilidad celular, produce una disminución significativa en el porcentaje de células infectadas evaluado por la técnica de citometría de flujo, así como una reducción significativa en los niveles de expresión de la proteína no estructural NS1 determinado por western blot, además de que la cantidad de genoma viral determinada por qPCR también se observó reducida, así como la producción de progenie viral; sugiriendo que el ciclo replicativo de DENV se ve afectado al activar a AMPK. Un mecanismo que nuestro grupo de trabajo propone para explicar este acontecimiento, es que, cuando AMPK se encuentra en su forma activa, es capaz de fosforilar a la HMGC_oAR inactivandola. Por su parte, la pérdida de la función de la HMCoAR repercute en la cantidad de colesterol sintetizada *de novo*, reduciendo así, los niveles disponibles de este compuesto necesarios para el ensamblaje de las balsas lipídicas, la formación de complejos replicativos, la formación de “gotitas lipídicas”; componentes celulares que son esenciales para el virus, afectando de manera significativa el ciclo replicativo, a nivel de entrada, replicación y ensamblaje.

El pre-tratamiento de células Huh-7 con compuesto C, contrario a lo que se esperaba, no incrementa el porcentaje de células infectadas. Sin embargo, se observó un incremento en los niveles de expresión de la proteína NS1, así como de la producción de partículas virales. Como es que no incrementa la infección pero si las partículas virales. Aunque no se observa aumento en el número de células afectadas, el compuesto C inactiva a AMPK aún más de lo que ya se encuentra inactivada por el virus, esto le permite al virus mejorar la eficiencia de replicación, es decir, que cada célula es más “eficiente” produciendo virus. Este

razonamiento podría explicar por qué se observa un aumento en la cantidad de proteína viral y en la producción de partículas virales.

El pre-tratamiento de células Huh-7 con ácido okadaico disminuye significativamente el porcentaje de células infectadas, los niveles de expresión de la proteína no estructural NS1, así como también la producción de progenie viral. Todo lo anterior sugiere que el ciclo replicativo de DENV se ve afectado al inactivar a PP2A. En un inicio se pensaba que durante la infección por DENV, la PP2A se encontraba sobreactivada en respuesta a la infección viral, y que esto le permitía desfosforilar de una mejor manera a la HMGC_oAR y con ello aumentar su actividad enzimática en comparación con una condición normal. Evento que no fue observado experimentalmente, ya que cuando se inhibió a PP2A con ácido okadaico y se evaluó la actividad de la HMCoAR no se redujo su actividad (Soto-Acosta en preparación). Sin embargo, la inactivación de la PP2A parece reducir la infección viral por un mecanismo alterno a la desfosforilación de la HMGC_oAR. Uno de estos mecanismos puede ser que la inactivación de PP2A por parte del ácido okadaico inhibe la desfosforilación de AMPK, por lo que la enzima se encuentra en su estado activo y así mantiene reprimida la actividad de la HMGC_oAR, con esto, la replicación viral se reduce. Otro mecanismo que puede explicar lo mencionado anteriormente, es que la inactivación de PP2A no permite que se desfosforile los componentes participantes en la vía de señalización Akt/PI3K y así encontrarse activos. Esta vía se ha relacionado con la producción de interferón en otros virus. Por lo que, en la infección por DENV pudiera estar sucediendo lo mismo. Sin embargo, es necesario investigar de manera más detallada estos mecanismos para determinar qué proceso participa realmente.

CONCLUSIONES

- ▶ Durante la infección con DENV, la actividad de AMPK se reduce lo que garantiza entre otras cosas, una eficiente síntesis de colesterol, necesaria durante la infección viral. Por otra parte, durante la infección, la actividad de PP2A no se modifica; sin embargo al inhibir su función reduce de manera significativa la replicación viral.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la interacción directa de las proteínas virales con las enzimas AMPK y PP2A.
- Evaluar el mecanismo por el cual PP2A reduce la infección viral.
- Utilizar inhibidores específicos de la vía de la síntesis de colesterol.
- Evaluar la participación del colesterol directamente en la infección por DENV

BIBLIOGRAFIA

1. Alen, M. M. F. & Schols, D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *J. Trop. Med.* **2012**, 628475 (2012).
2. World Health Organization. DENGUE: GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL. (2009).
3. Simmons, C. P., Farrar, J. J. & Wills, B. Current Concepts Dengue. *N. Engl. J. Med.* 1423–1432 (2012).
4. Klungthong, C., Putnak, R., Mammen, M. P., Li, T. & Zhang, C. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J. Virol. Methods* **154**, 175–81 (2008).
5. Martínez-Barragán, J. D. J. & Del Angel, R. M. Identification of a Putative Coreceptor on Vero Cells That Participates in Dengue 4 Virus Infection Identification of a Putative Coreceptor on Vero Cells That Participates in Dengue 4 Virus Infection. *J. Virol.* **75**, 7818–7827 (2001).
6. Sobia, S. & Ashfaq, U. a. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genet. Vaccines Ther.* **10**, 6 (2012).
7. Angel, R. Del. Entrada del Virus Dengue: Moléculas que pueden modular la patogenicidad viral. *Cinvestav* (2006). at http://pro.cinvestav.mx/Portals/0/SiteDocs/Sec_Difusion/RevistaCinvestav/julio-septiembre2006/entrada_dengue.pdf
8. World Health Organization. *Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control.* (1997).
9. Srikiatkachorn, A. et al. Dengue--how best to classify it. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 563–7 (2011).
10. Leong, A. S.-Y. & Wannakrairo, P. The Pathology of Dengue hemorrhagic fever. **24**, 227–236 (2007).
11. Pang, T., Cardoso, M. J. & Guzman, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol. Cell Biol.* **85**, 43–5 (2007).
12. Seet, R. C. S., Chow, A. W. L., Quek, A. M. L., Chan, Y.-H. & Lim, E. C. H. Relationship between circulating vascular endothelial growth factor and its

soluble receptors in adults with dengue virus infection: a case-control study. *Int. J. Infect. Dis.* **13**, e248–53 (2009).

13. Guzman, M. G. & Vazquez, S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses* **2**, 2649–62 (2010).
14. Dalrymple, N. & Mackow, E. R. Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *J. Virol.* **85**, 9478–85 (2011).
15. Colpitts, T. M., Barthel, S., Wang, P. & Fikrig, E. Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells. *PLoS One* **6**, e24365 (2011).
16. Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Syed, G. H., Siddiqui, A. & Del Angel, R. M. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits replication and viral morphogenesis of dengue virus. *Antiviral Res.* **109**, 132–40 (2014).
17. Soto-Acosta, R. *et al.* The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology* **442**, 132–47 (2013).
18. Brunton, J., Steele, S., Ziehr, B., Moorman, N. & Kawula, T. Feeding uninvited guests: mTOR and AMPK set the table for intracellular pathogens. *PLoS Pathog.* **9**, e1003552 (2013).
19. Alcaraz-Estrada, S. L., Manzano, M. I. M., Del Angel, R. M., Levis, R. & Padmanabhan, R. Construction of a dengue virus type 4 reporter replicon and analysis of temperature-sensitive mutations in non-structural proteins 3 and 5. *J. Gen. Virol.* **91**, 2713–8 (2010).
20. Mosso, C., Galván-Mendoza, I. J., Ludert, J. E. & del Angel, R. M. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* **378**, 193–9 (2008).