



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**Caracterización de las partículas virales del virus
Dengue 2 en las células C6/36 del mosquito *Aedes albopictus*
persistentemente infectadas**

T E S I S

Que presenta

Q. B. P. JOSÉ MANUEL REYES RUIZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR

Directora de la Tesis: Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

Co-director: Dr. Juan Santiago Salas Benito

México, D. F.

Julio 2015

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 8 DE VIROLOGÍA, A CARGO DE LA TUTORÍA DE LA DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL, PROFESORA E INVESTIGADORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL; Y EN EL LABORATORIO 3 DE BIOMEDICINA MOLECULAR, BAJO LA TUTORÍA DEL DR. JUAN SANTIAGO SALAS BENITO, PROFESOR E INVESTIGADOR TITULAR DE LA ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

Directora de tesis

Dra. Rosa María del Ángel Núñez

Co-director

Dr. Juan Santiago Salas Benito

Asesores

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano *

Dr. Juan Ernesto Ludert León *

* Investigador titular del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN.

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(CONACyT) POR LA BECA **No. 558744** BRINDADA PARA LA REALIZACIÓN
DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

Índice	Página
Índice de figuras.....	1
Lista de abreviaturas.....	2
Resumen	4
Abstract.....	5
Introducción	6
Epidemiología.....	6
Estructura del DENV.....	8
Genoma del DENV	9
Ciclo de replicación del DENV	10
Antecedentes	13
Persistencia viral	13
Células C6/36 persistentemente infectadas con DENV	17
Justificación	20
Hipótesis	21
Objetivos.....	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Metodología	23
Líneas celulares	23
Propagación del virus	23
Infección de las células.....	23
Ensayo de placa lítica.....	24
Ensayo de interferencia viral	24
Extracción del RNA.....	25
Tratamiento con DNAsa	25
Síntesis de cDNA	25
qRT-PCR	25
RT-PCR (PCR-Transcriptasa inversa).....	26
Evaluación de virus infeccioso intracelular y extracelular.....	27
Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	28

Microscopía inmunoeléctrica (MIE).....	28
Resultados.....	29
Ensayos de interferencia viral.....	30
Detección de partículas virales infectivas intracelulares y extracelulares de las células C6-L.....	33
Expresión del genoma viral en el sobrenadante de células C6-L.....	34
Evaluación de la presencia y localización de las partículas virales en las células C6-L.....	36
Discusión.....	50
Conclusiones.....	58
Perspectivas.....	59
Referencias.....	60

Índice de figuras

Figura 1.	Distribución del DENV y del mosquito transmisor	7
Figura 2.	Modelo del virión maduro del DENV	8
Figura 3.	Genoma del DENV	10
Figura 4.	Representación del ciclo de replicación del DENV	12
Figura 5.	Establecimiento de la línea celular C6-L	19
Figura 6.	Detección de la presencia de RNA de DENV en las células C6/36 persistentemente infectadas (C6-L)	29
Figura 7.	Interferencia viral de tipo homóloga del DENV-2 en las células C6-L	31
Figura 8.	Ausencia de interferencia viral de tipo heteróloga del DENV-2 en las células C6-L	32
Figura 9.	Detección de partículas virales infecciosas del DENV-2 en las células C6-L	34
Figura 10.	En el sobrenadante de las células C6-L hay presencia y expresión del genoma del DENV-2	35
Figura 11.	Alteraciones membranosas inducidas por el DENV-2	37
Figura 12.	Determinación de la presencia y localización de las partículas virales del DENV-2 en las células C6-L	38
Figura 13.	Las partículas virales del sobrenadante de las células C6-L son infectivas en las células C6/36	40
Figura 14.	Presencia de ribosomas unidos a membrana del RER de las células C6-L reinfectadas	41
Figura 15.	La reinfección de las células C6-L con DENV-2 parece potenciar la infección viral y el rearrreglo de las membranas del RER	42
Figura 16.	La proteína prM no está asociada con estructuras membranosas inducidas por DENV-2	44
Figura 17.	Localización y distribución de la proteína NS3	45-48
Figura 18.	Modelo que sugiere la replicación, ensamblaje y liberación de las partículas virales del DENV-2 en las células C6-L	56

Lista de abreviaturas

°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µm	Micrometro
BVi	Brote viral
CM	Estructuras membranosas complejas
DC	Dengue clásico
DC-SING	ICAM 3 no integrina específica de las células dendríticas
DENV	Virus dengue
DGE	Dirección General de Epidemiología
DH	Dengue hemorrágico
DI	Defectuosas interferentes
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EVi	Ensamblaje viral
g	Gramo
h	Hora
HSP	Proteína de choque térmico
JEV	Virus de la encefalitis Japonesa
Kb	Kilobase
M	Molar
MEM	Medio esencial mínimo
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MIE	Microscopía inmunoelectrónica
min	Minuto
mL	Mililitro
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero

nLc4Cer	Neolactotetraosilceramida
nm	Nanometro
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de base
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pv	Poros vesicular
qRT-PCR	PCR en tiempo real
RC	Complejo de replicación
RedC	Red de conductos
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
SCD	Síndrome de choque por dengue
SFB	Suero fetal bovino
SINV	Virus Sindbis
siRNA	RNA pequeños interferentes
SMS	Estructuras de membrana lisa
T	Estructura tubular
TGN	Red trans Golgi
ts	Sensibles a la temperatura
UFP	Unidades formadoras de placa
UTRs	Regiones no traducidas
UV	Luz ultravioleta
Ve	Vesículas de doble membrana
Vi	Virus
Vp	Paquetes membranosos
WNV	Virus del Nilo occidental
Ze	Zonas electrodensas

Resumen

El virus dengue (DENV) es el arbovirus de mayor importancia que afecta al humano en todo el mundo. En condiciones naturales cuando el virus infecta al mosquito, este puede transmitirlo a lo largo de toda su vida sin verse dañado, adquiriendo así una infección de tipo persistente.

En el laboratorio se cuenta con una línea celular C6/36, de mosquito *Aedes albopictus*, persistentemente infectada con DENV-2, denominada C6-L. Esta línea celular asemeja la infección viral que padece el mosquito en la naturaleza, permitiendo el estudio de la interacción virus-vector. Las células C6-L presentan las características de interferencia viral homóloga para los 4 serotipos del DENV pero susceptibilidad a la re-infección por un virus heterólogo, como el virus Sindbis (SINV); no desarrollan efecto citopático pero contienen el genoma y producen proteína viral; pero aparentemente no producen partículas virales. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y localización de las partículas virales del DENV-2 en las células C6-L, con el fin de dilucidar la presencia del virus y la interacción virus-célula del hospedero vector.

Los resultados obtenidos indican que las células C6-L efectivamente producen partículas virales, las cuales no se detectaron por ensayo de placa lítica pero fueron observadas por microscopía electrónica de transmisión (MET) y detectadas mediante qRT-PCR. Esta producción de partículas virales ocurre a nivel de RER, donde hay presencia de fábricas de replicación, que son rearrreglos de la membrana del RER inducidas por el virus. Entre ellas se encontraron paquetes membranosos (Vp) que albergan vesículas de doble membrana (Ve) implicados en el ensamblaje del virus; y complejos replicativos (RC) que participan en la replicación viral, sugiriendo que las células C6-L logran adaptarse al virus para sobrevivir a la infección persistente, inhibiendo, por mecanismos desconocidos, la formación de estructuras tubulares (T) causantes del desarreglo total de la membrana del RER y del citoplasma, que conduce a la muerte celular.

Abstract

Dengue virus (DENV) is considered the most important arbovirus that affects humans worldwide. Under natural conditions, DENV is able to be transmitted by mosquitoes throughout their lifetime without being damaged, thus acquiring a persistent infection.

Our group has developed a cell line of C6/36 cells persistently infected with DENV-2 called C6-L. These cells resemble viral infection suffered by the mosquito in the nature allowing the study of virus-vector interaction. They display some important features such as homologous viral interference for the four serotypes of the DENV but they are susceptible to be reinfected by a heterologous virus such as Sindbis (SINV); they do not develop cytopathic effect but they contain the genome and synthesize viral protein but apparently they do not produce viral particles.

The objective of this work was to determine the presence and localization of viral particles DENV-2 in the C6-L cells, with the final purpose of elucidate the presence of virus and virus-host cell vector interaction. The results indicate that the C6-L cells effectively produce viral particles which were not detected by plaque assay in BHK-21 cells but were observed by transmission electron microscopy (TEM) and detected by qRT-PCR. This viral particle production occurs at level of RER where "viral replication factories" are present, formed by virus-induced membrane rearrangements of RER, that include double-membrane vesicles (Ve) enclosed within membrane packets (Vp) involved in virus assembly, and replication complex (RC) implicated in viral replication. These data suggest that the C6-L cells have archived a process of adaptation to the virus in order to survive the persistent infection, inhibiting, for an unknown mechanism, the formation of tubular structures (T) associated to the total disarray of the membrane RER and cytoplasm, leading to cell death.

Introducción

El dengue es una enfermedad viral causada por el virus dengue (DENV) que posee cuatro serotipos (DENV 1-4) relacionados antigénicamente (Deen *et al.*, 2006). La enfermedad en muchos casos es asintomática o con sintomatología leve, pero puede manifestarse como dengue clásico (DC) con la aparición repentina de fiebre acompañada de dolor de cabeza frontal y dolor retro-orbital, seguido de síntomas como vómito, debilidad, mialgia y artralgia. También se presenta como dengue hemorrágico (DH) o dengue severo, que es una forma más grave de la enfermedad y con síntomas clínicos similares a los del DC, pero el período crítico del DH comienza cuando la fiebre desaparece al ocurrir manifestaciones hemorrágicas, que incluso ocurren 24 horas antes. Se puede llegar a observar petequias, epistaxis, hemorragias en sitios de venopunción, sangrado de encías y hematemesis. La fuga de plasma determina la gravedad de la enfermedad y los pacientes que empeoran desarrollan el síndrome de choque por dengue (SCD), mostrando intenso dolor abdominal, vómito persistente, pulso débil e hipotensión. Si el incremento de la permeabilidad vascular progresa, conduce al colapso vascular que culmina en falla orgánica múltiple, cuyo resultado suele ser fatal y conlleva a la muerte. Una infección secundaria con un distinto serotipo del DENV incrementa el riesgo de desarrollar DH y SCD, evento que se conoce como infección facilitada por anticuerpos (Akbar *et al.*, 2012; Deen *et al.*, 2006; Halstead, 2007; Kalayanarooj, 2011; OMS, 2015; Teo *et al.*, 2009). Actualmente se reconoce que otras manifestaciones clínicas pueden estar asociadas con la infección, entre ellas la miocarditis, la hepatitis, la encefalitis, la colecistitis, la mielitis y la colitis aguda (Gulati and Maheshwari, 2007; Nimmagadda *et al.*, 2014; Pawaria *et al.*, 2014 Pothapregada, 2014).

Epidemiología

DENV es la causa más común de enfermedades por arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) a nivel mundial (figura 1). Es transmitido por mosquitos hembra infectadas del género *Aedes*, principalmente las especies *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. La incidencia de esta enfermedad ha aumentado enormemente en las

últimas décadas. A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que al año se producen 390 millones de infecciones por dengue, de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente. Estimando que más de 3900 millones de personas (más del 40 % de la población mundial) están en riesgo de contraer la enfermedad en 128 países (OMS, 2015). Los cuatro serotipos del DENV se encuentran distribuidos en todo el mundo y se sugiere que han surgido de cepas silvestres que se encuentran en el sureste de Asia (Wang *et al.*, 2000).

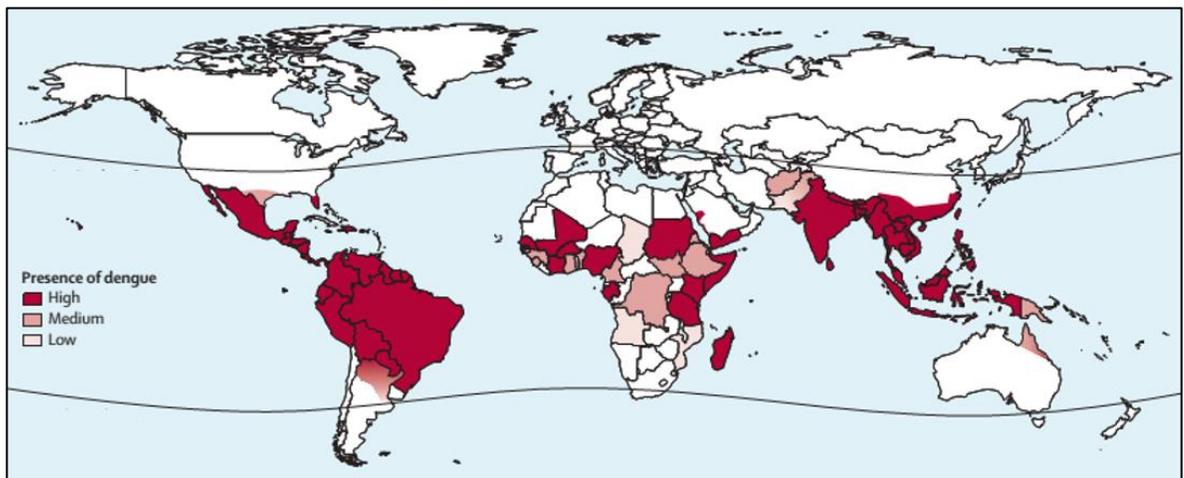


Figura 1. Distribución del DENV y del mosquito transmisor. Mapa que muestra los países con presencia del DENV (áreas sombreadas en tonalidades de color rojo según la presencia alta, media y baja del virus) y los límites geográficos de la distribución del mosquito *Aedes aegypti*, principal vector del virus (área entre las líneas oscuras) (Back and Lundkvist, 2013; Guzman and Harris, 2015).

En México, la Dirección General de Epidemiología ha reportado en la semana epidemiológica 24 (actualizada al 22 de Junio 2015) 5,232 casos por dengue, donde el 53% de los casos confirmados, corresponden a Guerrero, Chiapas, Colima, Veracruz y Quintana Roo; y el estado de Colima presenta la incidencia más alta (DGE, 2015). Cabe mencionar que en México se encuentran presente los 4 diferentes serotipos de DENV, lo cual hace más probable que las personas desarrollen DH por una reinfección con un serotipo distinto. Por lo anterior, el dengue es un problema muy importante de salud pública, no sólo en México sino también a nivel mundial.

Estructura del DENV

DENV pertenece al género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*. El virus maduro e infeccioso es esférico, envuelto, con ~50 nm de diámetro y está formado por tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside “C” de 11 KDa, que con múltiples copias encapsida el genoma de RNA para formar la nucleocápside viral; la proteína de membrana “M”, de aproximadamente 8 KDa (que es el resultado del procesamiento proteolítico de su forma precursora prM de ~21 KDa), y la proteína de envoltura “E”, de 53 KDa (que posee tres dominios estructuralmente distintos) están ancladas a una bicapa lipídica o envoltura, derivada de la célula del huésped que rodea la nucleocápside (figura 2) (Kuhn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003a; Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Perera and Kuhn, 2008).

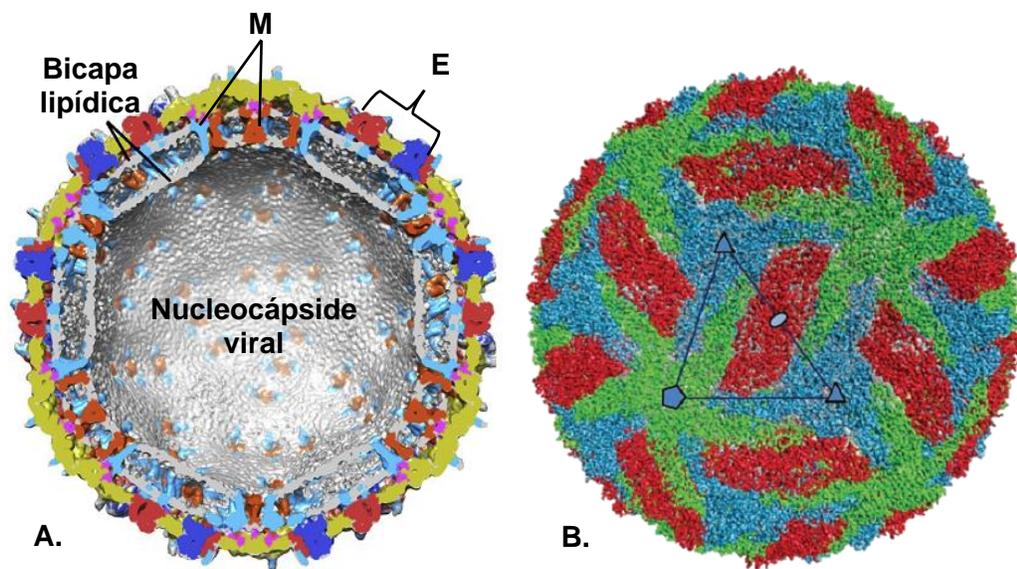


Figura 2. Modelo del virión maduro del DENV. (A) Criomicroscopía electrónica de la estructura del DENV maduro revela la interacción molecular *in situ* entre la bicapa lipídica, la longitud total de las proteínas de membrana (M; en color naranja y azul cielo) y envoltura (E; dominio I, II y III en rojo, amarillo y azul respectivamente), y el área de la nucleocápside viral (Zhang *et al.*, 2003a; Zhou, 2014). (B) Organización icosaédrica del DENV donde los dominios I, II y III de la proteína E se muestran en color azul, rojo y verde respectivamente. Se representan los ejes icosaédricos de la partícula viral con símbolos: 2 pliegues, *eclipse*; tres pliegues, *triángulo*; y 5 pliegues, *pentágono* (Kuhn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2013).

Los tres dominios estructurales de la proteína E tienen conformación tipo barril-beta y se denominan: EDI, EDII y EDIII. La proteína E es responsable del proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana celular durante la entrada del virus (Kuhn *et al.*, 2002) y al parecer el dominio III (EDIII) es responsable de la unión de la proteína E al receptor celular ya que varias mutaciones en este dominio afectan la entrada del virus a la célula (Roehrig, 2003; Modis *et al.*, 2004).

Genoma del DENV

La nucleocápside de DENV encapsida el genoma viral de RNA de cadena sencilla y sentido positivo (RNA de cadena plus) que contiene aproximadamente 10,700 nucleótidos (~11 Kb). Este RNA monocistrónico codifica para un solo marco de lectura abierto (ORF), flanqueado por las regiones 5' y 3' no traducidas (UTRs) (figura 3) (Harris *et al.*, 2006; Lindenbach and Rice, 2003).

Cuando el genoma es liberado al citoplasma sirve como mRNA y es traducido en el retículo endoplasmático rugoso produciendo una poli proteína de 3,411 aminoácidos que es procesada proteolíticamente co- y post traduccionalmente. En el extremo N-terminal de la poli proteína se encuentran codificadas las tres proteínas estructurales: cápside (C), precursora de membrana (prM) y envoltura (E); y enseguida se encuentran codificadas las siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Gebhard *et al.*, 2011; Rice *et al.*, 1985). El genoma requiere ser ciclizado para que la replicación viral se lleve a cabo, para ello es necesaria la presencia de al menos dos pares de regiones conocidas como 5'-3'CS (secuencias de ciclización 5'-3') y 5'-3'UAR (regiones de AUG río arriba 5'-3') (Friebe *et al.*, 2011; Villordo and Gamarnik, 2009). Recientemente se han reportado cambios en la estructura del genoma viral durante su adaptación en el mosquito y el humano, describiendo mecanismos que mantienen posible la convivencia viral en cada hospedero y la eficiencia replicativa (Villordo *et al.*, 2015).

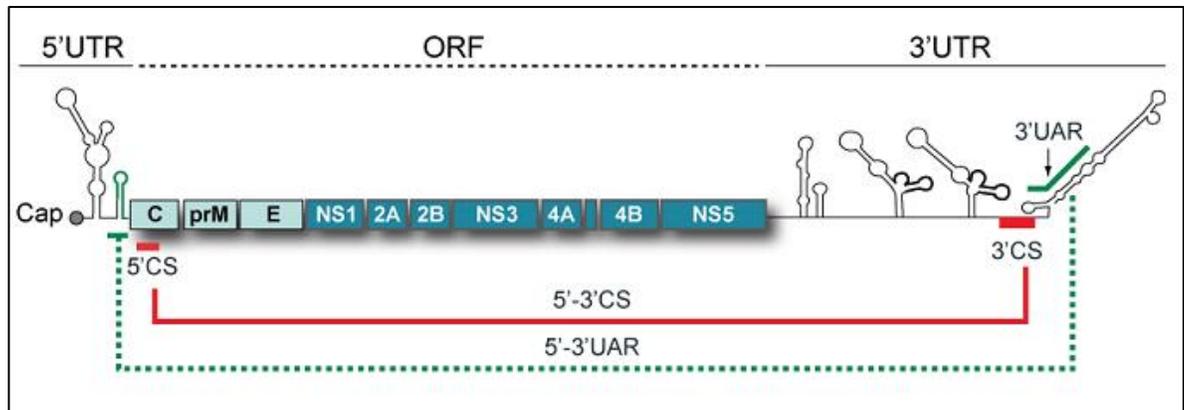


Figura 3. Genoma del DENV. Conformado por las regiones 5' y 3' no traducidas (UTRs) y el marco de lectura abierto (ORF) mostrando las proteínas estructurales (C, prM y E) y las proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). También se observan los elementos 5'-3'CS (línea roja) y 5'-3'UAR (línea discontinua en verde) necesarios para la replicación viral (Gebhard *et al.*, 2011).

Ciclo de replicación del DENV

El mosquito hematófago del género *Aedes*, puede alimentarse de la sangre de un huésped humano infectado con el DENV, adquiriendo la infección. El virus infecta el intestino medio, moviéndose por el hemocele, y replicándose en muchos órganos y compartimientos del cuerpo del mosquito, entre ellos, las glándulas salivales. Cuando introduce su probóscide en un humano sano libera en la saliva el virus. Estos virus tienen inicialmente como blanco de infección a los monocitos, macrófagos y células dendríticas, incluyendo las células de Langerhans de la piel (Jessie *et al.*, 2004). El virus se fija a su receptor mediante la proteína E. En células de mamíferos se une a heparán sulfato (Chen *et al.*, 1997), nLc4Cer (Aoki *et al.*, 2006; Wichit *et al.*, 2011), DC-SIGN (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Tassaneetrithep *et al.*, 2003), HSP90 y HSP70 (Reyes-Del Valle *et al.*, 2005), proteínas de 44 y 74 KDa (Martínez-Barragán and del Angel, 2001) y receptores de manosa (Miller *et al.*, 2008); mientras que en células de mosquito se puede unir a prohibitina (Kuadkitkan *et al.*, 2010) y proteínas de 40 y 45 KDa (Reyes-del Valle and del Angel, 2004; Salas-Benito and del Angel, 1997; Yazı Mendoza *et al.*, 2002) por mencionar algunos. A continuación, el virus es internalizado a la célula por endocitosis mediada por clatrina (van der Schaar *et al.*, 2008). El pH ácido del endosoma conduce a la fusión

de la envoltura viral con la membrana del endosoma, liberando la nucleocápside con el genoma al citoplasma (Heinz and Allison, 2003; Stiasny and Heinz, 2006). La nucleocápside se disocia y el RNA viral al ser de cadena sencilla y con sentido positivo es traducido como RNA mensajero por los ribosomas adosados a la membrana del retículo endoplasmático rugoso (RER) en una poli proteína que es procesada por proteasas virales y celulares en tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Clyde *et al.*, 2006). Después de la traducción y plegamiento de las proteínas individuales, las proteínas no estructurales junto con las celulares inducen invaginaciones membranosas en el lumen del RER que están unidas al citoplasma por estructuras similares a un poro (Welsch *et al.*, 2009). En el interior de estas vesículas membranosas ocurre la replicación viral mediante la actividad entre otras de la proteína NS5 (RNA polimerasa dependiente de RNA) que genera una cadena de polaridad negativa complementaria al genoma viral, usada como molde para generar múltiples copias del RNA viral. Durante la morfogénesis, la proteína C se asocia con el RNA recién sintetizado formando la nucleocápside la cual por gemación en el RER adquiere la bicapa lipídica en la que se encuentran las proteínas trans membrana prM y E, generando partículas virales inmaduras. Estas partículas se caracterizan por tener un diámetro de 60 nm y el arreglo de sus proteínas de superficie forman 60 espículas confiriéndole una apariencia rugosa. Cada espícula está compuesta por tres heterodímeros prM-E (Zhang *et al.*, 2003b; Zhang *et al.*, 2007). Estas partículas viajan del RE al espacio extracelular por la vía secretoria convencional. Durante este trayecto el pH ligeramente ácido (6.0) de la red trans-Golgi (TGN) provoca la disociación de los heterodímeros prM-E produciendo 90 dímeros de proteína E alineados sobre la superficie del virus. Esta reorganización estructural de las glicoproteínas permite que la endoproteasa celular furina corte el péptido precursor de membrana (prM) (Yu *et al.*, 2008; Zybert *et al.*, 2008) en la secuencia de reconocimiento Arg-X-(Lis/Arg)-Arg (donde X es cualquier aminoácido) obteniéndose la proteína de membrana “M” y el péptido “pr”. El péptido pr actúa como chaperona estabilizando la proteína E durante el tránsito del virus a través de la vía secretora hasta su salida donde se disocia originando el virus

maduro infeccioso que se distingue por medir casi 50 nm de diámetro y tener 180 monómeros de proteína E organizados en 90 dímeros unidos herméticamente y recostados sobre la superficie de la membrana viral, dándole al virus una apariencia lisa (figura 4) (Back and Lundkvist, 2013; Clyde *et al.*, 2006; Kuhn *et al.*, 2002; Prasad and Schmid, 2012).

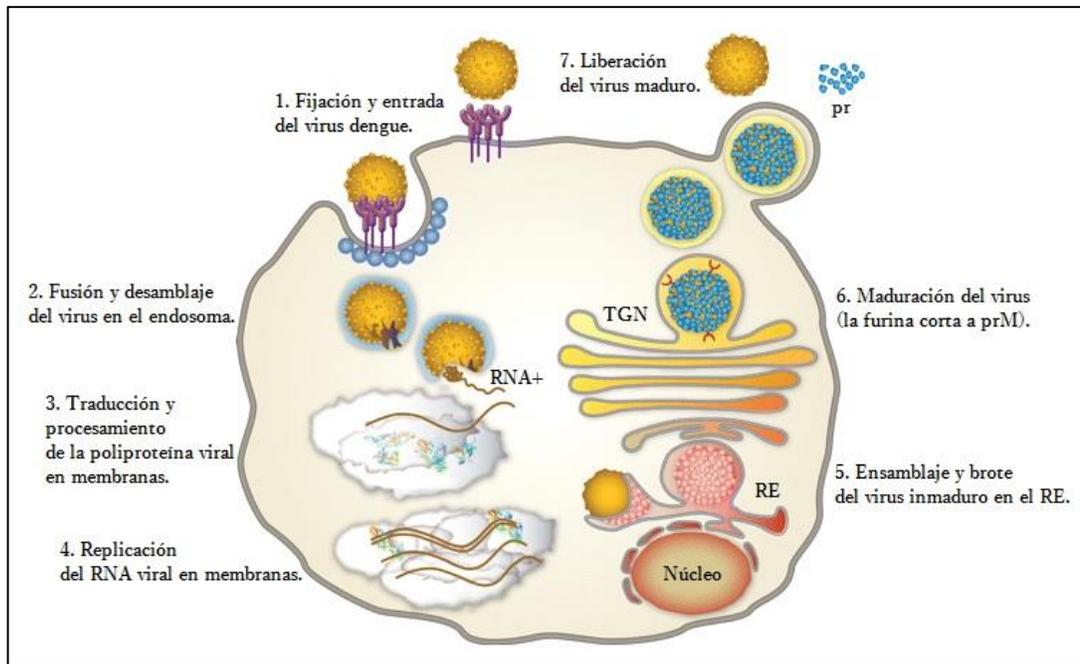


Figura 4. Representación del ciclo de replicación del DENV (Laughlin *et al.*, 2012).

Antecedentes

Persistencia viral

Los arbovirus, virus transmitidos por artrópodos, son un grupo de al menos 530 virus de los cuales aproximadamente 134 han mostrado ser causantes de enfermedades en los humanos (Center for Disease Control and Prevention, 2010). Se mantienen en la naturaleza en un ciclo de transmisión horizontal entre el vector artrópodo hematófago y el huésped vertebrado (Gubler, 2001), aunque se ha documentado la transmisión vertical (Lequime and Lambrechts, 2014). La mayoría de los arbovirus que producen enfermedad en el humano son miembros de las familias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* y *Reoviridae*. El DENV, miembro de la familia *Flaviviridae*, se ha convertido en el causante de la enfermedad viral transmitida por artrópodos a humanos más prevalente durante las últimas décadas (Messina *et al.*, 2014).

La infección por virus en el humano se presenta en su mayoría como una infección de tipo aguda, una infección que puede ser temporal y autolimitada, sin embargo se ha reportado que algunos virus pueden desarrollar una infección de tipo persistente (De Gascun and Carr, 2013; Lucs *et al.*, 2015; Vockerodt *et al.*, 2015). La persistencia viral se refiere a la supervivencia del virus dentro de la célula huésped por largos periodos de tiempo, sin causarle daño.

Existe evidencia que sugiere una infección persistente en humanos por *Flavivirus* transmitidos por mosquitos (Baty *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2010) aunque cabe mencionar que el establecimiento de la infección persistente por los *Flavivirus* en humanos parece estar principalmente asociada con aquellos encefálicos (Diamond, 2003), entre ellos el virus de la encefalitis japonesa (JEV) (Ravi *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 1991). Se ha descrito que el virus del Nilo occidental (WNV) puede ser transmitido por transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos de donadores con previa infección con el virus, sugiriendo una persistencia viral en los donadores, y la sangre como una fuente transmisora de la infección (Montgomery *et al.*, 2006; Pealer *et al.*, 2003). Además, parece ser que la inmunosupresión resulta un factor

importante para el establecimiento de la persistencia viral en el humano (Penn *et al.*, 2006).

El mosquito *Aedes*, hospedero artrópodo, juega un papel crucial en la biología de la infección persistente. El establecimiento de la infección persistente en los mosquitos para ser un proceso multifactorial y los mecanismos por los cuales se lleva a cabo no están completamente dilucidados. Los mecanismos antivirales en el mosquito vector son los RNA pequeños interferentes (siRNA), principales combatientes de la infección (Blair, 2011), y las vías de señalización Toll, JAK/STAT e Imd/Jnk (Fragkoudis *et al.*, 2009; Lambrechts y Scott, 2009; Sánchez-Vargas *et al.*, 2009; Xi *et al.*, 2008). Sin embargo, los reportes sugieren que el mosquito *Aedes* es un vector eficiente para la transmisión viral debido a que el virus ha generado mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica para producir una infección de tipo persistente. Un ejemplo es que, la defensa antiviral de los siRNA en el mosquito, que participan durante la infección persistente y natural por el virus dengue, no es totalmente efectiva para detener la replicación viral, sugiriendo un posible mecanismo de evasión de siRNA por los arbovirus (Blair, 2011; Blair and Olson, 2015).

Se ha observado que en la infección de células de mosquito Aag2 y la infección oral de mosquitos adultos *Aedes aegypti*, con DENV-2, el mosquito monta una respuesta anti-viral mediada por siRNA, y su disminución da como resultado un incremento en la replicación viral (Sánchez-Vargas *et al.*, 2009). Además, se ha reportado la presencia de secuencias relacionadas con los virus agente de fusión celular (cell fusing agent virus) y virus del río Kamiti (Kamiti river virus) en el genoma de dsDNA (DNA de doble cadena) de mosquitos *Aedes albopictus* (*Aedes w-albus*) y *Aedes aegypti* (*Aedes aegypti* A20), sugiriendo que la persistencia viral en la célula puede estar relacionada con la integración del RNA viral en el genoma eucariota, además de una implicación evolutiva por parte de los *Flavivirus* (Crochu *et al.*, 2004).

La exitosa persistencia viral en la naturaleza del mosquito probablemente también dependa de factores ambientales y ecológicos, como la temperatura (Girard *et al.*, 2005; Kramer and Ebel, 2003). La asociación de factores celulares y virales pudiera estar involucrada, debido a que el desarrollo de la infección persistente implica que los factores de muerte celular deben ser evadidos o modulados, a través de mecanismos poco conocidos (Lee *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 1998; McLean *et al.*, 2011).

Otro de los factores que se han propuesto para explicar el establecimiento y mantenimiento de una infección persistente es la participación de partículas virales defectuosas interferentes (DI), que fueron descritas por von Magnus en 1951 al infectar fluido alantoideo de embriones de pollo con pases seriales de virus no diluido de la cepa PR8 del virus influenza. Las partículas DI contienen genomas truncados o defectuosos que, al carecer de genes esenciales para llevar a cabo su ciclo de replicación, necesitan la ayuda de un virus silvestre o “completo” que le proporcione las funciones faltantes, conocido como virus *helper* y es, por lo general, el virus parental o wild-type (silvestre). Los genomas defectuosos son replicados y encapsidados, compiten con las partículas virales del virus silvestre, se pueden generar durante pases seriales del virus y dan soporte para explicar la conversión de las infecciones *in vitro* agudas a persistentes.

Huang y Baltimore, en 1970, al igual que otros grupos sugieren que las partículas DI juegan un papel clave en el establecimiento de las infecciones persistentes. Por ejemplo, Weiss y colaboradores (1980) lograron obtener una infección persistente en células BHK con una preparación de virus Sindbis (SINV) enriquecida con partículas DI; por su parte Preble y Youngner (1973), y Youngner y colaboradores (1976), con sus resultados infirieron que los virus mutantes sensibles a la temperatura (“ts”), aislados de células de ratón L, eran un factor importante para el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) respectivamente. Schmaljohn y Blair, en 1977, transfirieron el medio de cultivo de la

línea celular de riñón de conejo (células MA-111) persistentemente infectadas con JEV a una línea celular de riñón de mono verde africano (células VERO) sin infección, estas últimas adquirieron la infección persistente. Estos autores, encontraron una alta cantidad de partículas no infecciosas, sugiriendo que las partículas DI juegan un papel importante en la persistencia viral. Por otro lado, se ha sugerido que las partículas DI del virus de la estomatitis vesicular (VSV) modulan la virulencia (Cave *et al.*, 1985); en el caso del virus de la encefalitis del Valle de Murray (MVEV) y el WNV, se sugiere también que sus partículas DI son responsables del mantenimiento y establecimiento de la infección persistente (Debnath *et al.*, 1991; Poidinger *et al.*, 1991). Además se ha demostrado que la delección del genoma viral de los virus JEV y el MVEV presente en infecciones persistentes conduce a la síntesis de una proteína viral NS1 truncada, sugiriendo que las proteínas virales disfuncionales pudieran estar involucradas en la persistencia viral (Chen *et al.*, 1996; Lancaster *et al.*, 1998), aunque, parece ser que las proteínas virales truncadas son una consecuencia más que una causa de la infección persistente (Liao *et al.*, 1998). A pesar de que las partículas DI y las proteínas virales truncadas pueden ser observadas frecuentemente en infecciones persistentes, no es del todo claro que sean los factores fundamentales para el establecimiento y mantenimiento de este tipo de infección tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ello, el papel de las partículas DI merece más investigación.

Hay evidencia de que las mutaciones que presentan las partículas DI del WNV en la naturaleza interfieren con la transmisión del virus en el mosquito y reducen la patogénesis en ratón (Pesko *et al.*, 2012). Se ha observado que el DENV recuperado ya sea del vector o humano, contiene un genoma viral defectuoso que provoca que el virus deje de ser infeccioso. Este defecto parece mantenerse durante los ciclos naturales de la transmisión debido a la complementación con genomas funcionales provenientes del virus silvestre (Aaskov *et al.*, 2006). También se ha reportado que especies de RNA defectuoso de DENV se relacionan con la presencia de partículas DI, y han sido identificadas en las infecciones agudas en humanos,

siendo capaces de generar progenie infecciosa y de reducir la severidad de los síntomas de la enfermedad (Li *et al.*, 2011).

Células C6/36 persistentemente infectadas con DENV

Los cultivos de células de mosquitos son una herramienta importante para el estudio de los arbovirus, y desde hace tiempo han sido utilizados para el aislamiento, identificación y caracterización de estos virus, y el estudio de la relación virus-vector. La línea celular C6/36 de *Aedes albopictus*, originalmente establecida a partir de homogenizados de larvas de mosquitos, son fáciles de mantener y muy permisivas a numerosos arbovirus (White, 1987), y han sido ampliamente usadas como modelo de estudio *in vitro* para la infección aguda en mosquitos por DENV.

La mayoría de las infecciones agudas con virus de RNA son transitorias y posteriormente eliminadas del hospedero. Sin embargo, DENV no solo causa enfermedad aguda también puede persistir a largo plazo al menos en modelo *in vitro*.

Se tiene reporte de estudios de infección persistente con DENV en células C6/36, establecida y mantenida por varias semanas. Donde fue observable la ausencia de efecto citopático, la disminución del tamaño de placa lítica conforme a los pases celulares y oscilación de los títulos virales extracelulares (vistos por ensayo de placa lítica), lo que sugiere que algunas partículas virales evolucionaron a partículas DI no infectivas, puesto que el nivel de antígeno viral se mantuvo constante (Chen *et al.*, 1994). Además se han logrado estudiar co-infecciones persistentes con el densovirus de *Aedes albopictus* (AalDENV) y DENV-2 en células C6/36, donde se observa que el 100% de las células fueron co-infectadas y que los virus tienen una alta tasa de infección (Kanthong *et al.*, 2008). Pero además se ha demostrado que es posible una triple co-infección viral con AalDENV, DENV-2 y JEV en células C6/36, las cuales se mantuvieron estables sin mostrar efecto citopático y en el 99% de la población celular se detectaron antígenos de los tres virus (Kanthong *et al.*, 2010), sugiriendo que las células de mosquito son capaces de dar albergue a dos o más

virus simultáneamente de una manera adaptativa, promoviendo la posibilidad de intercambio genético entre diversos virus. También se ha reportado la generación de persistencia viral por DENV en una línea celular derivada de un mosquito no vector, *Toxorhynchites amboinensis* (Kuno, 1982).

En el laboratorio, Juárez-Martínez y colaboradores en el 2013, lograron generar una línea celular C6/36 persistentemente infectada con DENV-2, la cual fue establecida en base al protocolo reportado previamente por Igarashi (Igarashi, 1979) con algunas modificaciones. Esta línea celular, denominada C6-L, presenta interferencia viral homóloga para los 4 serotipos del DENV (León-Guzmán, 2013) pero es susceptible a la reinfección por un virus heterólogo, como virus Sindbis (SINV), evento conocido como ausencia de interferencia viral heteróloga (Salas-Benito, datos no publicados). La línea celular C6-L se estableció infectando a la línea celular C6/36 con el DENV-2 (cepa New Guinea C) a una MOI de 0.1 y el medio de cultivo fue cambiado parcialmente durante semanas, donde cada pase celular corresponde a una semana. Los títulos virales fueron monitoreados periódicamente en el sobrenadante mediante la técnica de placa lítica en células BHK-21 y a partir del pase 42, no se detectaron partículas virales infectivas (figura 5 a), y la inoculación intracerebral con sobrenadante de células C6-L a ratones Balb/c lactantes no causó enfermedad ni muerte por DENV. A partir del pase 7 el efecto citopático empezó a disminuir paulatinamente hasta el pase 30 (figura 5 b), sin embargo el genoma viral fue detectado en todos los pases celulares por RT-PCR. Las proteínas virales NS1 (por ensayo de platelia), E y NS5 (por Western blot) (Juárez-Martínez, 2013) fueron detectadas en las células indicando que existía una infección persistente por DENV-2 en las células C6-L. Estos resultados sugieren que a pesar de que hay RNA y proteína viral, la formación, maduración o liberación de las partículas virales de DENV-2 se encuentra bloqueada en la línea celular C6-L. Entre las posibilidades se contempla que las partículas virales no sean ensambladas, presentan problemas en el proceso de maduración, que existan alteraciones en su secreción al medio extracelular o que la tasa de secreción de partículas virales maduras infecciosas es baja.

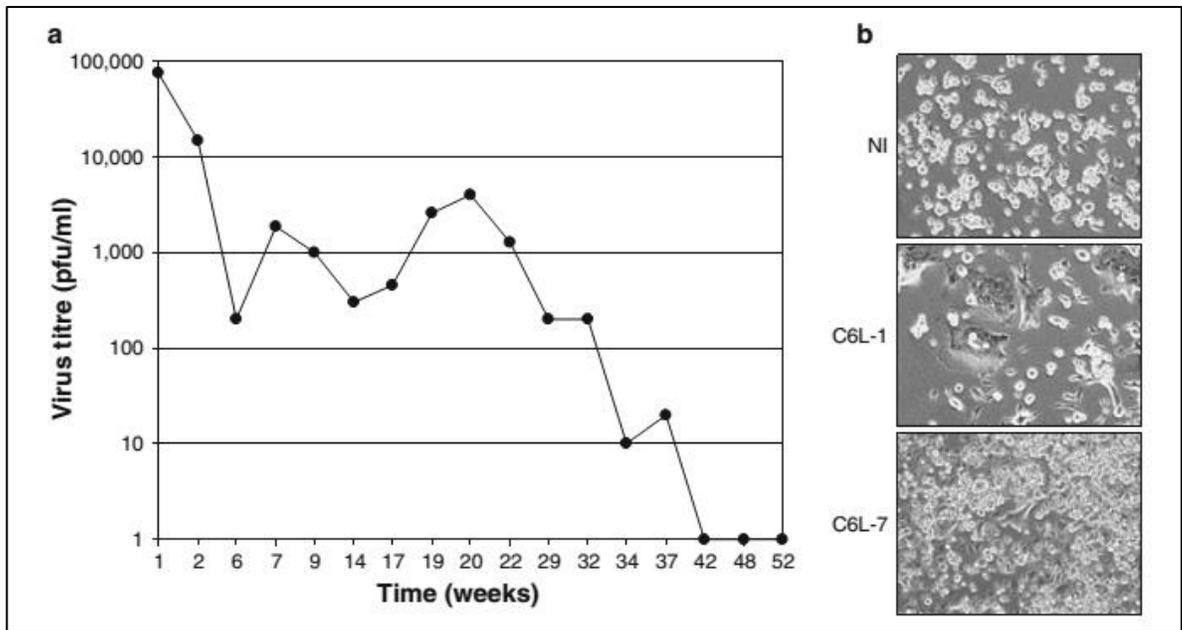


Figura 5. Establecimiento de la línea celular C6-L. Células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 persistentemente infectadas con DENV-2 (cepa New Guinea C) a una MOI de 0.1, mantenidas por 52 semanas reemplazando el medio de cultivo parcialmente. (a) Gráfica que muestra la oscilación del título viral del sobrenadante de las células C6-L en células BHK-21, por ensayo de placa lítica. (b) Micrografías de las células C6-L capturadas a diferentes tiempos post-infección: primer (C6L-1) y séptimo (C6L-7) pase. NI, células C6/36 no infectadas (Juárez-Martínez, 2013).

Justificación

Las células C6/36 de mosquito del género *Aedes* (transmisor del DENV) son utilizadas como modelo para el estudio de la infección de tipo aguda por DENV. Sin embargo, en condiciones naturales, cuando este virus infecta al mosquito, puede transmitirlo a lo largo de toda su vida sin verse dañado, adquiriendo así una infección de tipo persistente.

Las células C6-L, células C6/36 persistentemente infectadas con DENV-2, asemejan la infección viral que padece el mosquito en la naturaleza, por lo tanto, es de nuestro interés caracterizar las partículas virales para comprender la interacción virus-vector.

Hipótesis

Las partículas virales de DENV-2 en las células C6-L poseen características que les impiden ser infecciosas, siendo también posible que el virus no se ensamble.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la presencia de partículas virales de DENV-2 en las células C6-L.

Objetivos particulares

Confirmar la presencia del genoma viral, la interferencia viral homóloga y ausencia de interferencia viral heteróloga en las células C6-L.

Evaluar la presencia de partículas virales intracelulares y extracelulares del DENV-2 en las células C6-L.

Determinar la localización intracelular de las partículas virales del DENV-2 en las células C6-L.

Metodología

Líneas celulares

Las células C6/36, derivadas de larvas de mosquito *Aedes albopictus* (Igarashi 1978) y adaptadas para crecer a 35 °C (Kuno and Oliver, 1989), y células persistentemente infectadas con DENV-2 (C6-L) (Juárez-Martínez, 2013), se cultivaron en medio MEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1X de vitaminas (Invitrogen), 0.034% de bicarbonato de sodio (J. T. Baker) y penicilina-estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL respectivamente) (Sigma) a un pH de 7.1 ajustado con hidróxido de sodio. Las células se incubaron a 35 °C en ambiente húmedo. Las células BHK 21, derivadas de riñón de Hámster sirio recién nacido, se crecieron en medio MEM (Invitrogen) suplementado con 10% de SFB y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5% para los ensayos de placa lítica.

Propagación del virus

La propagación del DENV-2 (New Guinea C) donado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), se realizó en cerebro de ratón lactante cepa Balb/c, de 2-3 días de nacidos, los cuales se inocularon con una jeringa de insulina por vía intracerebral a nivel de la fontanela bregmática con 5 µL de DENV-2. Después de la inoculación, se revisaron los ratones diariamente hasta notar signos característicos de la encefalitis como ataxia, movimiento torpe y lento, y parálisis parcial o total de las extremidades posteriores. Una vez observados estos síntomas, los ratones se sacrificaron y almacenaron a -70 °C. Se extrajo el cerebro de los ratones con una jeringa de 10 mL. El extracto se homogenizó en medio de cultivo suplementado con 20% de SFB en volumen 1:1. Se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y posteriormente el sobrenadante se recuperó y se almacenó a -70 °C en alícuotas hasta su uso (Gould and Clegg, 1981). Fue titulado por ensayo de placa lítica.

Infección de las células

Las células C6/36 y C6-L crecidas a una confluencia de 70-80%, se infectaron con DENV-2 o SINV (virus Sindbis VR-1248, ATCC) a una multiplicidad de infección

(MOI) de 1 o 5; o bien con el sobrenadante de células C6-L filtrado en membrana de 0.22 μm , dependiendo del experimento. El virus se dejó absorber por 1 hora a 37 °C, las células se trataron con glicina ácida (pH 3) por 30 segundos para inactivar el virus que no hubiera entrado a las células, se hicieron tres lavados con PBS pH 7.4 y se adicionó medio fresco MEM suplementado con suero. Para el caso de la infección con el sobrenadante de C6-L se realizó una dilución 1:1 con medio. En todos los casos la infección se dejó proceder por 48 horas.

Ensayo de placa lítica

El ensayo de placa lítica se realizó en células BHK-21, las cuales se sembraron en multiplaca de 24 pozos a razón de 2.5×10^5 células/pozo en 0.5 mL de MEM de cultivo/pozo. Cuando alcanzaron una confluencia del 80-90%, se inocularon con el sobrenadante recuperado, de manera directa o con diluciones en serie en base 10 (directo, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} para el DENV-2, y 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} para SINV; y también con el input usado para la infección inicial). Se incubó durante 4 horas a 37 °C con CO₂ al 5% para permitir la absorción del virus y se adicionó el medio de soporte carboximetilcelulosa al 3% (1.5 g de carboximetilcelulosa (densidad media-Sigma) en 50 mL de agua destilada con medio 2x (1.92 g de MEM-Invitrogen), 0.068 g de NaHCO₃ (J. T. Baker), 10 mL de SFB, 1.5 mL de antibióticos para 100 mL). Después, se incubó a las mismas condiciones durante seis días para el caso del DENV-2 y tres días para SINV. El medio de cultivo se eliminó por aspiración y las monocapas fueron teñidas con naftol blue-black y ácido acético por 15 minutos a 37 °C para evidenciar la formación de placas líticas.

Ensayo de interferencia viral

Para confirmar la persistencia del genoma viral, y la interferencia viral homóloga y ausencia de interferencia viral heteróloga en las células C6-L, se sembraron 1×10^6 células C6-L o C6/36 por pozo en una multiplaca (Corning) de 6 pozos. En el momento en que alcanzaron una confluencia de 60-80% se infectaron con DENV-2 y SINV a una MOI de 1 como fue previamente descrito. Las células C6-L se re infectaron. Como control se usaron células “mock infected” (células C6/36

incubadas con lisado de cerebro de ratones Balb/c lactantes no inoculados con el virus). La infección se dejó proceder por 48 h a 35 °C. Se recuperó el sobrenadante de cada condición y se almacenó a -70 °C para posteriormente determinar los títulos virales por el ensayo de placa lítica en células BHK-21 como se indicó anteriormente.

Extracción del RNA

El RNA de las células se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El RNA se resuspendió en agua DEPC con inhibidor de RNAsas (Invitrogen) y se almacenó a -70 °C. La extracción del RNA viral del sobrenadante de las células C6-L se realizó con el Kit RNA MicroPrep (Zymo Research) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El RNA aislado se almacenó a -70 °C.

Tratamiento con DNAsa

Se tomaron 10 µg de RNA total y se trataron con 2 unidades de DNAsa (New England BioLabs) en un volumen final de 15 µL incubando a 37 °C por 10 minutos. La DNAsa se inactivó con EDTA 5 µM a 70 °C por 10 minutos. El RNA tratado se almacenó a -70 °C.

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando la enzima Improm II (Promega) ajustando el protocolo para un volumen final de 10 µL utilizando OligodT 1 µM como cebador.

qRT-PCR

La RT-PCR se realizó de aislados de RNA, usando los primers DV2C-L 5'-CAATATGCTGAAACGCGAGA-3' y DV2C-R 5'-TGCTGTTGGTGGGATTGTTA-3' (Prada-Arismendy *et al.*, 2012) que amplificaron un fragmento de 151 pb que corresponde al gen de la cápside del DENV. Este producto de PCR fue clonado en el plásmido pJet1.2 Vector System (Thermo). El plásmido recombinante fue

purificado y cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm para preparar una dilución que contenga 10^{10} copias de plásmido/mL usando la fórmula:

$$\text{Número de copias} = \frac{6 \times 10^{23} \frac{\text{copias}}{\text{mol}} \times \text{concentración} \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{L}}\right)}{\text{Peso molecular del plásmido}} + \text{inserto} \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{L}}\right)$$

Se prepararon diluciones seriadas del plásmido (10^9 a 10^2 copias/mL).

En la transcripción reversa se usó 1 μg del RNA total de cada condición experimental, y fue realizada utilizando primers aleatorios (Promega) a una concentración de 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y la enzima transcriptasa reversa ImpromII (Promega) a 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min, 70 °C por 15 min.

Para la PCR en tiempo real (Q-PCR), se usó SYBR Fast universal (Kapa) y el equipo Eco Illumina System. La mezcla de reacción contenía 1 μL de cDNA y 5 μL de Master Mix 2x. El protocolo para la amplificación incluyó 2 min a 50 °C, 2 min a 95 °C, y 40 ciclos a 95 °C por 5 segundos y 30 ciclos a 55 °C. Finalmente, una curva de disociación fue generada por el calentamiento de los productos de PCR de 55 °C a 95 °C para confirmar la usencia de dímeros de los primers.

RT-PCR (PCR-Transcriptasa inversa)

Para confirmar que el genoma del DENV-2 estaba presente en los pases de células C6-L empleados en los experimentos, se utilizó el kit de Promega RT-PCR Access y los primers previamente reportados: DV2M15 forward (5'-TGTTAATGGGTCTTGGGAAAGGATG-3') y DV2M16 reverse (5'-TAAGGACTCTGAGTGTTTCGTCCTGC-3') que amplifican la región NS4A-NS4B-NS5 del genoma viral dando como resultado un amplicon de 1,019 pb (Juárez-Martínez, 2013). Para validar que el RNA no se estaba degradado se usaron dos primers que amplifican el gen ribosomal S7 de *Aedes aegypti*: primer forward S7R (5'-GGGACAAATCGGCCAGGCTATC-3') y reverse S7R (5'-TCGTGGACGCTTCTGCTTGTTG-3'). Siguiendo las siguientes condiciones: un ciclo a 48 °C por 1 h; un ciclo a 94 °C por 4 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos,

60 °C por 1 min, 68 °C por 1 min; y finalmente un ciclo a 68 °C por 10 minutos. Las reacciones se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X teñido con Gel Red y corrido a 80 volts.

Evaluación de virus infectivo intracelular y extracelular

Con la finalidad de evaluar la presencia de virus infectivo intracelular y extracelular, en una multiplaca (Corning) de 6 pozos, se sembraron células C6-L o C6/36 (1 x 10⁶ células/pozo). En el momento en que se alcanzó una confluencia de 60-80% se realizó la infección de células C6/36 con DENV-2 a una MOI de 1 (control positivo). Como control se usaron células “mock infected” (células C6/36 incubadas con lisado de cerebro de ratones Balb/c lactantes no inoculados con virus). Las células C6-L no fueron reinfectadas. La infección se permitió por 48 h a 35 °C. El sobrenadante de cada condición se filtró con una membrana de 0.22 µm para remover restos celulares (*virus extracelular*). Las células se trataron con glicina ácida pH 3 por 30 segundos, inactivando el virus que no entró a la célula y se hicieron tres lavados con PBS. Para recuperar el virus intracelular, las células de las monocapas se rompieron por congelamiento (-70 °C) – descongelamiento (37 °C) en PBS. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min para retirar los restos celulares (pastilla) y la fase acuosa se recuperó (*virus intracelular*). Los virus se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Posteriormente se determinó el título viral por la técnica de placa lítica en células BHK-21 como se describió previamente, inoculando el virus intracelular y extracelular de manera directa o con diluciones en serie en base 10. Para determinar el título viral expresado en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral} = \text{dilución} \times \frac{P_1+P_2+\dots+P_n}{n} \times \frac{1}{V}$$

Dónde:

P= # de placas contadas en todos los pozos

n= # número total de pozos

V= volumen inoculado en mL

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las células fueron crecidas en cajas p25. Las células C6/36, al alcanzar una confluencia de 60-80% fueron infectadas con DENV-2 a una MOI de 1 o con el sobrenadante de células C6-L. Las células C6-L no se re infectaron. Después de las 48 h de infección, las células se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.1 M (pH 7.2) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se post fijaron con tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio por una hora; las células fueron empastilladas por centrifugación, y se deshidrataron con etanol y óxido de propileno, para ser incluidas en resina epóxica Poly/bed y polimerizadas a 60 °C por 24 h. Finalmente, se realizaron cortes finos (70 nm), los cuales fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011.

Como control se usaron células “mock infected” (células C6/36 incubadas con lisado de cerebro de ratone Balb/c lactante no inoculado con virus).

Microscopía inmunoelectrónica (MIE)

Para este ensayo, las células se cultivaron en las condiciones antes mencionadas, pero con la diferencia de que esta vez fueron sembradas en botellas de cultivo de 250 mL con superficie de 75 mm², y las células C6/36 se infectaron con DENV-2 a una MOI de 5. Una vez transcurridas las 48 horas post infección, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.5 % en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron dos veces con PBS e inmediatamente se inició la deshidratación con etanol. Las muestras fueron incluidas en LR-White y polimerizadas con luz UV a 4 °C por 48 horas. Los cortes finos (70 nm) se montaron en rejillas de níquel. Las muestras fueron incubadas toda la noche con el anticuerpo primario anti-NS3 (GeneTex) en una dilución 1:20 o 2H2 anti-prM (ATCC) directo; y como anticuerpo secundario se usó un anti-conejo y anti-ratón, respetivamente, conjugado a partículas de oro de 20 nm (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) en una dilución 1:40 durante 1 hora. Las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011.

Resultados

Detección del genoma de DENV en las células C6-L

El primer paso del proyecto fue demostrar que las células C6-L, persistentemente infectadas, mantenían las características propias de una célula persistentemente infectada como es la ausencia de efecto citopático, presencia del genoma viral e interferencia viral, para poder así realizar los posteriores experimentos. Para analizar la presencia de RNA viral se realizó una RT-PCR punto final, amplificando la región NS4A-NS4B-NS5 del genoma viral (1,019 pb) y el gen ribosomal S7 de *Aedes aegypti* como control endógeno (291 pb). Mientras que el fragmento correspondiente al gen ribosomal S7 de *Aedes aegypti* pudo amplificarse en las tres muestras y observarse a la altura de 291 pb de un gel de agarosa al 1%, el producto de 1,019 pb fue observado solo en las células C6-L (pase 53) y C6/36 infectadas de manera aguda con DENV-2 (control positivo), pero no en las células sin infectar (figura 6).

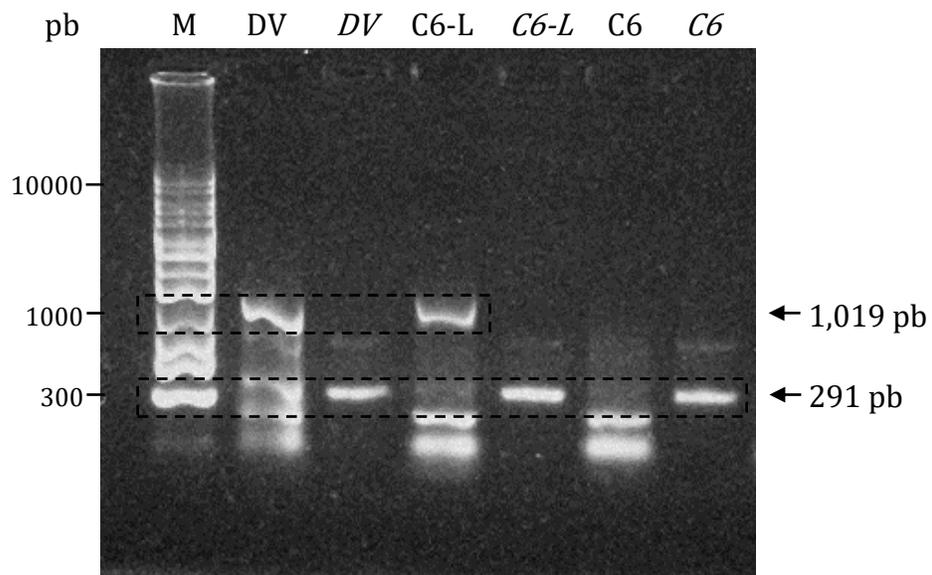


Figura 6. Detección de la presencia de RNA de DENV en las células C6/36 persistentemente infectadas (C6-L). Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red que muestra una reacción de RT-PCR realizada con RNA total de células C6/36 infectadas con DENV-2 (DV); células persistentemente infectadas con DENV-2 (C6-L) pase 53; y células C6/36 no infectadas (C6). Se observan los productos amplificados de 1,019 pb que corresponden a la región NS4A-NS4B-NS5 del genoma viral, y de 291 pb del gen S7 de

Aedes aegypti (DV, C6-L y C6). El marcador de DNA de 1 Kb (Axigen) se observa del lado izquierdo del gel (M).

De esta forma se demostró que las células C6-L contenían genoma del DENV. Cabe mencionar, que la técnica de RT-PCR fue empleada constantemente para verificar que todos los pases celulares de C6-L, utilizados en los experimentos de este trabajo, mantuvieran la infección persistente. Además, los pases celulares de C6-L mostraron ausencia de efecto citopático aparente cuando se observaron al microscopio.

Ensayos de interferencia viral

Estudios en el laboratorio han descrito que las células C6-L presentan interferencia viral de tipo homóloga cuando son re infectadas con los 4 serotipos del DENV y ausencia de interferencia viral de tipo heteróloga con virus Sindbis (SINV). La interferencia viral es un fenómeno que se da cuando la presencia de una infección viral primaria en una célula, interfiere con una segunda infección por un determinado virus (re infección). Esta puede ser de tipo homóloga (cuando el virus pertenece a la misma familia) o heteróloga (si el virus es de una familia diferente).

Para confirmar la interferencia viral de tipo homóloga que presentan las células C6-L cuando éstas son re infectadas con algún serotipo del DENV, las células C6-L (pase 52) se re infectaron con DENV-2 a una MOI de 1 y las células C6/36 se infectaron de la misma manera (control positivo). Transcurridas 48 h post infección el sobrenadante de cada condición fue recuperado y fue titulado en células BHK-21 (ensayo de placa lítica). En la figura 7, se observan los resultados de la titulación viral después de 6 días de infección, notando ausencia de placas líticas en las células BHK-21 inoculadas con sobrenadante de células C6-L (condición **C6-L+DV-2**), a diferencia de cuando se inoculó con el sobrenadante de las células C6/36 infectadas de manera aguda (**C6/36+DV-2**) y el "input" de DENV-2 (**Input DV-2**) usado para la infección, donde se apreció la formación de placas líticas.

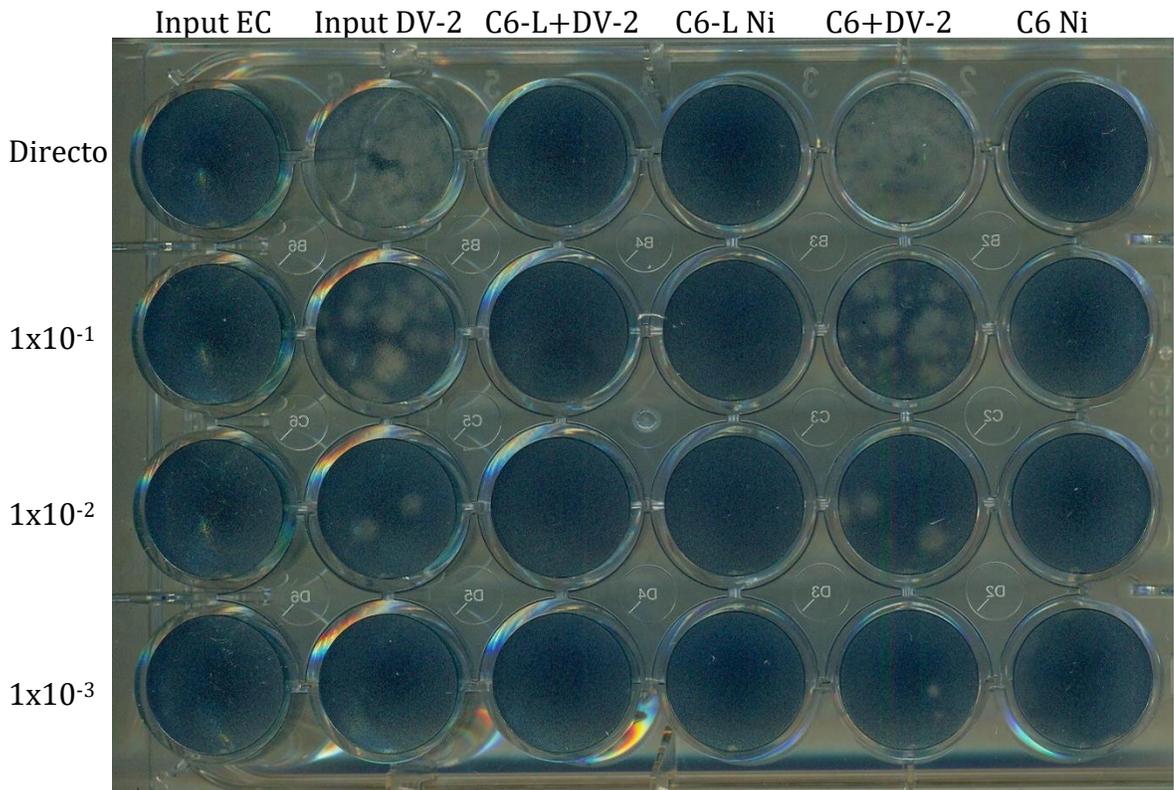


Figura 7. Interferencia viral de tipo homóloga del DENV-2 en las células C6-L. El ensayo de placa lítica se hizo en células BHK-21, las cuales fueron inoculadas con el sobrenadante de células C6/36 no infectadas (Ni), células C6/36 infectadas con DENV-2 (C6+DV-2), células C6-L no infectadas (C6-L Ni), células C6-L re infectadas con DENV-2 (C6-L+DENV-2), y con el Input de DENV-2 (“Input DV-2”) y de lisado de cerebro no infectado (“Input EC”); de manera directa o con diluciones en serie en base 10.

Para corroborar la ausencia de interferencia viral de tipo heteróloga que presentan las células C6-L, estas se re infectaron con SINV a una MOI de 1 por 48 horas al igual que las células C6/36 (control positivo). Al realizar el ensayo de placa lítica se observa que en la condición de células C6-L re infectadas con SINV (**C6-L+SINV**) hay formación de placas líticas, de igual manera que en la infección aguda de las células C6/36 con SINV (**C6/36+SINV**) y el “input de SINV” empleado para la infección (figura 8). Las células “mock infected” (**C6/36 Ni**) fueron utilizadas como control negativo.

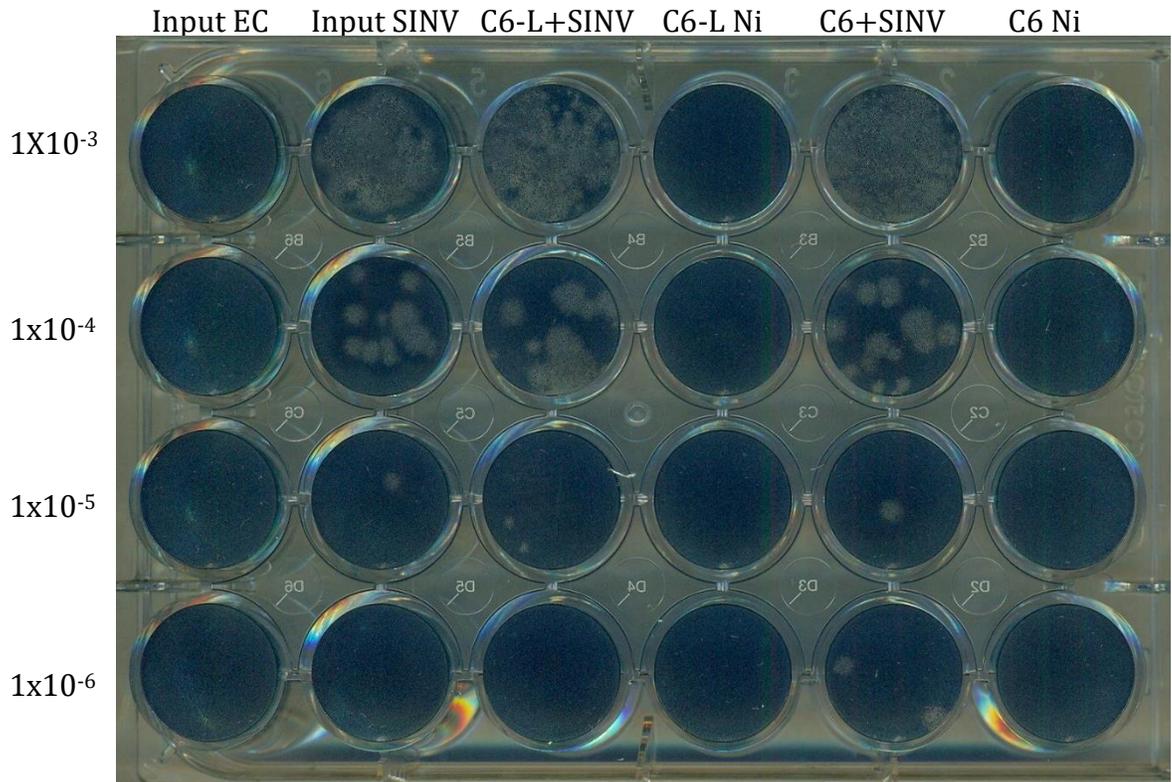


Figura 8. Ausencia de interferencia viral de tipo heteróloga del DENV-2 en las células C6-L. El ensayo de placa lítica se hizo en células BHK-21, las cuales fueron inoculadas con el sobrenadante de células C6/36 no infectadas (Ni), células C6/36 infectadas con SINV (C6+SINV), células C6-L no infectadas (C6-L Ni), células C6-L re infectadas con SINV (C6-L+SINV), y con el Input de SINV (“Input SINV”) y de lisado de cerebro no infectado (“Input EC”); con diluciones en serie en base 10 a partir de 1×10^{-3} .

Estos resultados sugieren que las células C6-L efectivamente presentan interferencia viral de tipo homóloga cuando son re infectadas con DENV-2, evento que indica que el DENV-2 de las células C6-L interfiere con la infección de un virus miembro de la misma familia, *Flaviviridae*. Sin embargo, hay ausencia de interferencia viral de tipo heteróloga por parte del DENV-2 cuando las células C6-L son re infectadas con el SINV que pertenece a la familia *Togaviridae*.

Detección de partículas virales infectivas intracelulares y extracelulares de las células C6-L

Una vez que se confirmaron algunas de las propiedades de las células C6-L, se prosiguió a evaluar la presencia de partículas de DENV-2 en estas células. Dado que en los ensayos de placa lítica previos, el DENV no se detectó en los sobrenadantes, se decidió determinar si las partículas virales intracelulares eran o no infectivas. Para ello, las partículas intracelulares se obtuvieron por congelamiento-descongelamiento y las partículas extracelulares del sobrenadante de las células C6-L (pase 56) sin reinfectar y de células C6/36 infectadas de manera aguda con DENV-2 a una MOI de 1 (control positivo). A las 48 horas post infección, para el caso de infección aguda, se realizaron ensayos de placa lítica en células BHK-21. Los resultados obtenidos demostraron que no se generaron placas líticas con los extractos celulares obtenidos por congelación y descongelación, ni de los sobrenadantes de células C6-L (condiciones **VI C6-L** y **VE C6-L**, respectivamente). Este resultado contrasta con la producción de placas líticas de los virus presentes tanto en las células (intracelulares) como en el sobrenadante (extracelulares) de las células C6/36 infectadas con DENV-2 (condiciones **VI C6+DV-2** y **VE C6+DV-2**, respectivamente) (figura 9). El título viral, expresado en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL) obtenido de los virus intracelulares de las células C6/36 infectadas de manera aguda fue de 2×10^3 UFP/mL, mientras que con los virus extracelulares de esta misma condición, se obtuvo un título viral de 14×10^3 UFP/mL, indicando que en el sobrenadante hay mayor cantidad de virus infeccioso que en el interior de las células.

La incapacidad de los extractos celulares y de los sobrenadantes de células C6-L de formar placas líticas sugiere que en estas células no se producen virus infectivos. Este hecho podría deberse a una falla en la morfogénesis o bien en la maduración de las partículas virales recién formadas.

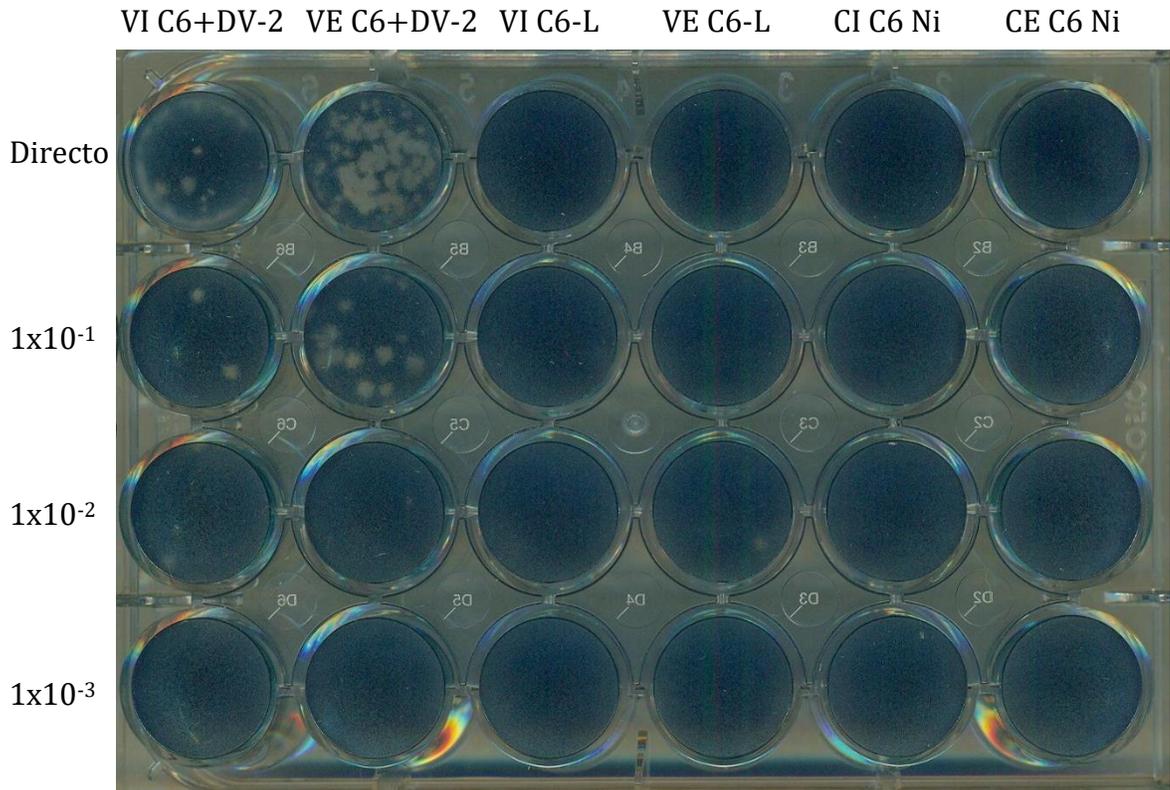


Figura 9. Detección de partículas virales infecciosas del DENV-2 en las células C6-L.

El ensayo de placa lítica se hizo en células BHK-21, las cuales fueron inoculadas de manera directa o con diluciones en serie en base 10, con los virus intracelulares y extracelulares de las células C6/36 infectadas con el DENV-2 a una MOI de 1 (VI C6+DV-2 y VE C6+DV-2, respectivamente); así como el de las células C6-L (VI C6-L y VE C6L, respectivamente); y el contenido intracelular y extracelular de las células C6/36 no infectadas (tratadas con lisado de cerebro de ratón no infectado).

Expresión del genoma viral en el sobrenadante de células C6-L

Como no se observó la formación de placas líticas con el extracto celular y el sobrenadante de células C6-L decidimos averiguar si en el sobrenadante había partículas virales no infectivas. Una forma de analizar este hecho fue evaluar la presencia de RNA viral por la técnica de qRT-PCR. En el experimento también se incluyó la detección intracelular del genoma viral en las células C6/36 infectadas con DENV-2 a una MOI de 1 (control positivo), en las células C6-L sin reinfectar y células C6/36 tratadas con el sobrenadante de C6-L. Se amplificó un fragmento de

151 pb que corresponde al gen de la proteína C de la cápside del DENV, a las 48 horas post infección (para el caso de las células infectadas con el DENV y tratadas con el sobrenadante de C6-L). Los resultados obtenidos demostraron que en el sobrenadante de las células C6-L (pase 56) hay presencia del genoma del DENV-2, y que cuando es utilizado para inocular a las células C6/36 se produce una infección puesto que se detecta la expresión de *novo* del genoma viral. Sugiriendo la presencia de partículas virales infectivas de DENV-2 en el sobrenadante de las células C6-L (figura 10).

También, se determinó que las células C6-L efectivamente están persistentemente infectadas con el DENV-2 y que además hay expresión del genoma viral en el sobrenadante.

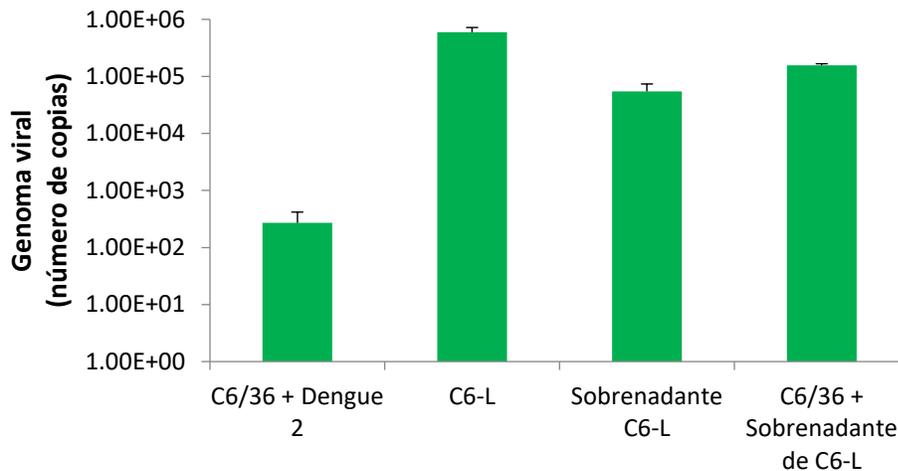


Figura 10. En el sobrenadante de las células C6-L hay presencia y expresión del genoma del DENV-2. Determinación del número de copias del genoma viral que codifica para la proteína C de la cápside del DENV-2, en las células C6/36 infectadas con DENV-2 (control positivo), células C6-L, sobrenadante de células C6-L y células C6/36 tratadas con el sobrenadante de C6-L; mediante qRT-PCR, usando SYBR Fast universal (Kapa).

Evaluación de la presencia y localización de las partículas virales en las células C6-L

Los experimentos anteriormente descritos, sugirieron que en el sobrenadante de células C6-L hay RNA viral y que el sobrenadante de células C6-L es capaz de infectar las células C6/36, sugiriendo que en el sobrenadante de las células C6-L hay partículas virales infectivas para células C6/36 aunque no para células BHK-21 como lo indican los experimentos de plaqueo.

Para definir si las células C6-L presentaban partículas virales, se realizó microscopía electrónica de transmisión (MET). Las condiciones analizadas fueron: células C6/36 infectadas con DENV-2 a una MOI de 1 (control positivo), células C6-L (pase 55), células C6/36 tratadas con sobrenadante de células C6-L y células C6/36 no infectadas (tratadas con el lisado de cerebro de ratón no infectado). A las 48 horas de tratamiento las muestras fueron fijadas, procesadas y posteriormente observadas en el microscopio electrónico de transmisión.

En comparación con las células C6/36 no infectadas, las células infectadas con DENV-2 exhibieron estructuras subcelulares inducidas por el virus a nivel de retículo endoplasmático rugoso (RER). Entre las cuales se identificaron estructuras de vesículas de doble membrana (Ve). Las partículas virales fueron observadas en el lumen del RER en cisternas dilatadas a la periferia de las vesículas inducidas, como esferas electro densas, oscuras y con un diámetro de 45-50 nm (figura 11).

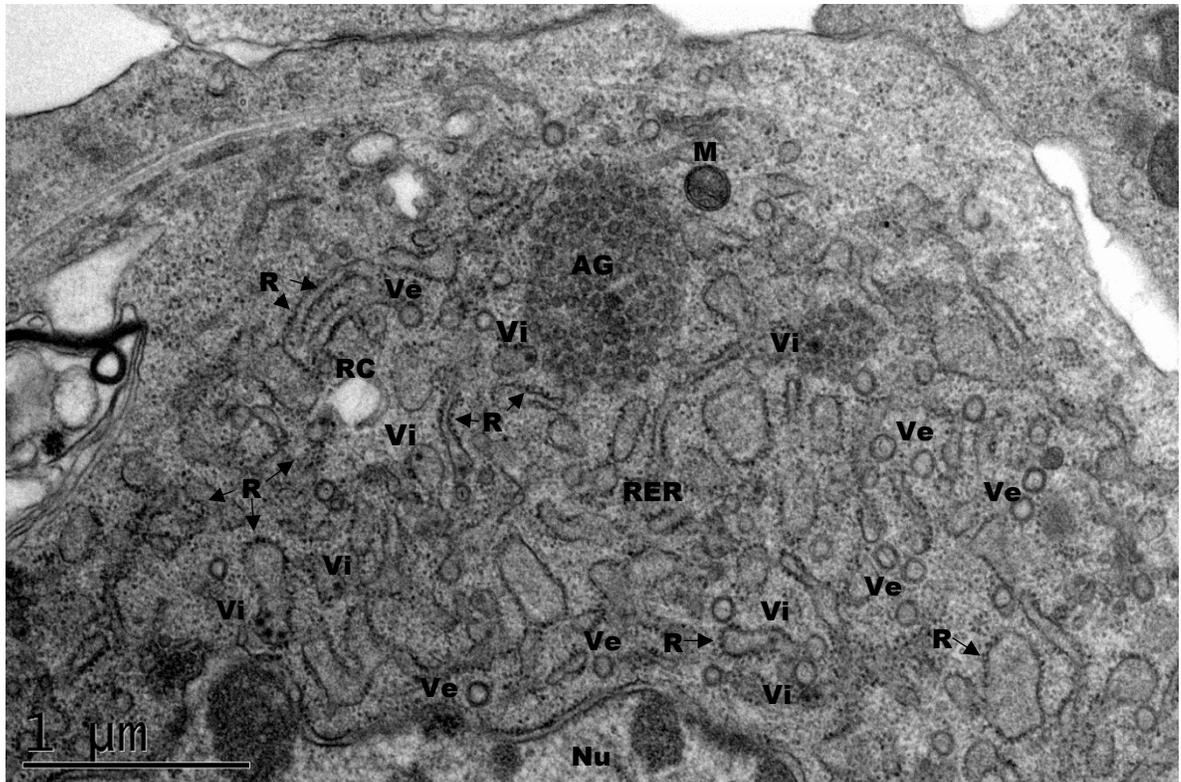


Figura 11. Alteraciones membranas inducidas por el DENV-2. Microscopía electrónica de transmisión de las células infectadas con DENV-2 muestran rearrreglos de la membrana del retículo endoplasmático rugoso (RER), como vesículas de doble membrana (Ve). Las esferas electro densas, pequeñas y oscuras corresponden a la morfología y tamaño de los virus (Vi), los cuales se encuentran en cisternas dilatadas del RER. Se observaron ribosomas cercanos a un complejo de replicación (RC). Núcleo (Nu), mitocondria (M), aparato de Golgi (AG) y ribosomas (R).

Interesantemente, las células C6-L observadas revelaron la presencia de partículas virales localizadas en cisternas dilatadas del retículo endoplasmático rugoso (RER), y dentro de vesículas de secreción que parecieran dirigirse a la membrana celular en un proceso de exocitosis (figura 12 A), y en el espacio extracelular (figura 12 C) También se identificaron estructuras membranas inducidas por el DENV-2 muy bien elaboradas y organizadas, a diferencia de las identificadas en las células infectadas de manera aguda (figura 12 B).

(A) la presencia de partículas del DENV-2 (Vi) en las células C6-L, a nivel de RER. Notando además la presencia de complejos replicativos (RC) y la manera en que la membrana del RER pareciera estar sufriendo un rearrreglo inducido por el virus (*) manteniendo a los ribosomas (R) en su contorno. (B) El virus de las células C6-L induce alteraciones de membrana del RER, que incluye un gran número de vesículas de doble membrana (Ve) encontradas dentro de paquetes membranosos (Vp). También, es observable el brote de un virus de la membrana del RER (BVi). (C) Al parecer los virus de las células C6-L son liberados al medio extracelular. Núcleo (Nu), ribosomas (R), mitocondria (M) y retículo endoplasmático rugoso (RER).

Cuando se determinó que en las células C6-L hay ensamblaje viral del DENV-2, se quiso corroborar si estas partículas virales eran infectivas, al menos en las células de mosquito. Para tal objetivo, las células C6/36 fueron tratadas con el sobrenadante de las células C6-L durante 48 horas. El análisis de MET reveló la presencia de partículas virales y de estructuras de Ve y Vp, además un gran número de ribosomas (R) en el RER (figura 13 A), sugiriendo así que los virus secretados al medio extracelular por las células C6-L son infecciosos y se agrupan en espacios intercelulares para dirigir su salida o entrada (figura 13 B y C).

Para caracterizar que impacto producía a nivel ultra estructural la reinfección de las células C6-L, estas fueron re infectadas con DENV-2 a una MOI de 1 por 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de infección, se procesaron para ser observadas al microscopio electrónico. Bajo estas condiciones se identificaron Ve dentro de Vp y formación de partículas virales a nivel de RER con una marcada presencia de ribosomas (R), pero no se puede asegurar que realmente fueron inducidas por la reinfección (figura 14). Sin embargo, fue notable que la reinfección por DENV-2 induce un rearrreglo de la membrana del RER de mayor grado, además de la formación de estructuras tubulares (T) que no fueron identificadas en las condiciones anteriormente descritas y de posibles complejos replicativos de mayor tamaño (RC?) a los descritos en células de mosquito (Junjhon *et al.*, 2014) (figura 15 A y B).

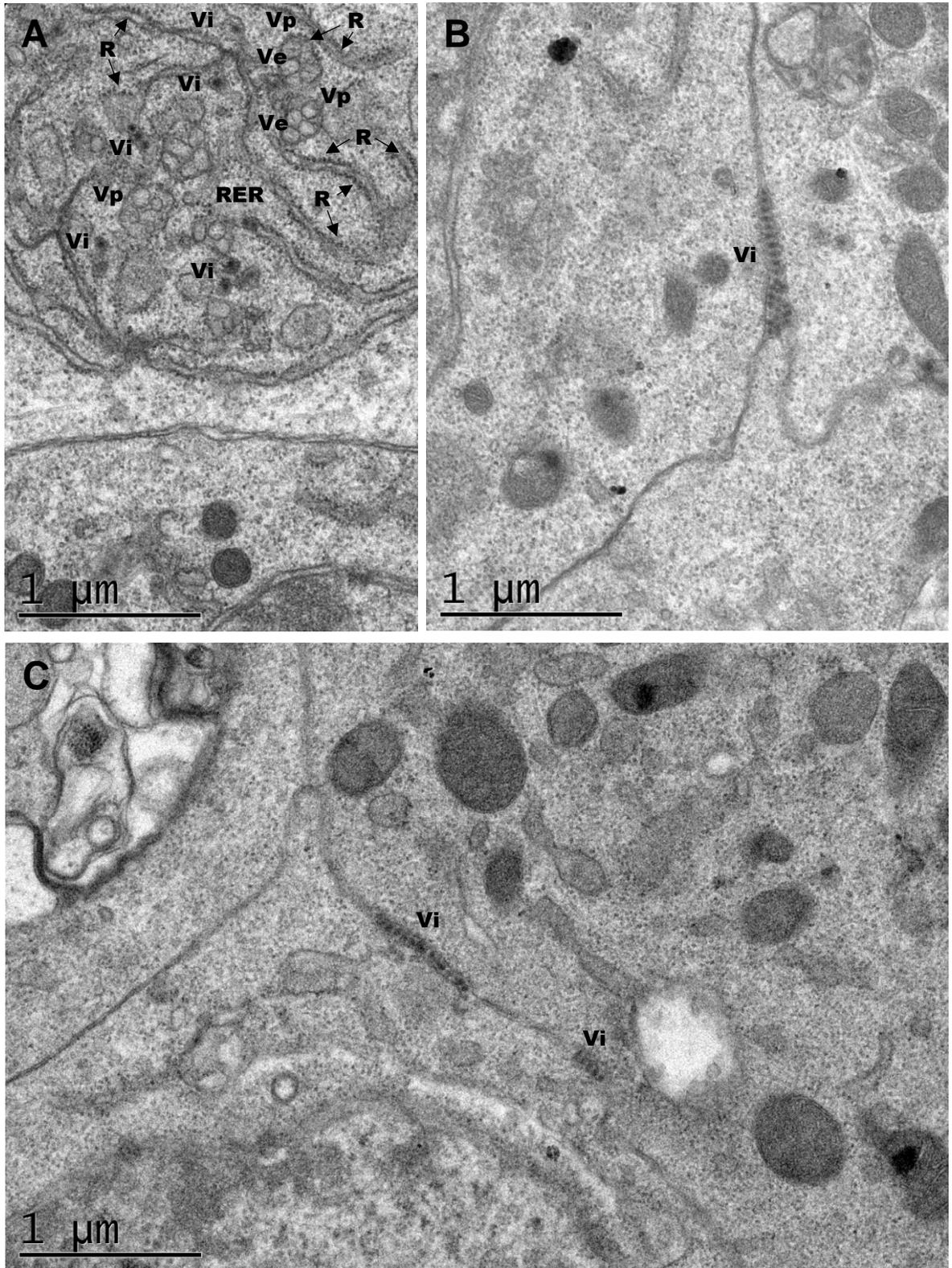


Figura 13. Las partículas virales del sobrenadante de las células C6-L son infectivas en las células C6/36. (A) El DENV-2 de las células C6-L inducen el rearrreglo de

membranas a nivel de RER de las células C6/36, formando Ve encontradas dentro de Vp, que sirven de andamio para la replicación y ensamblaje viral de *novo* de las partículas virales. (B) y (C) los virus (Vi) se acumulan entre célula y célula para promover su entrada o salida.

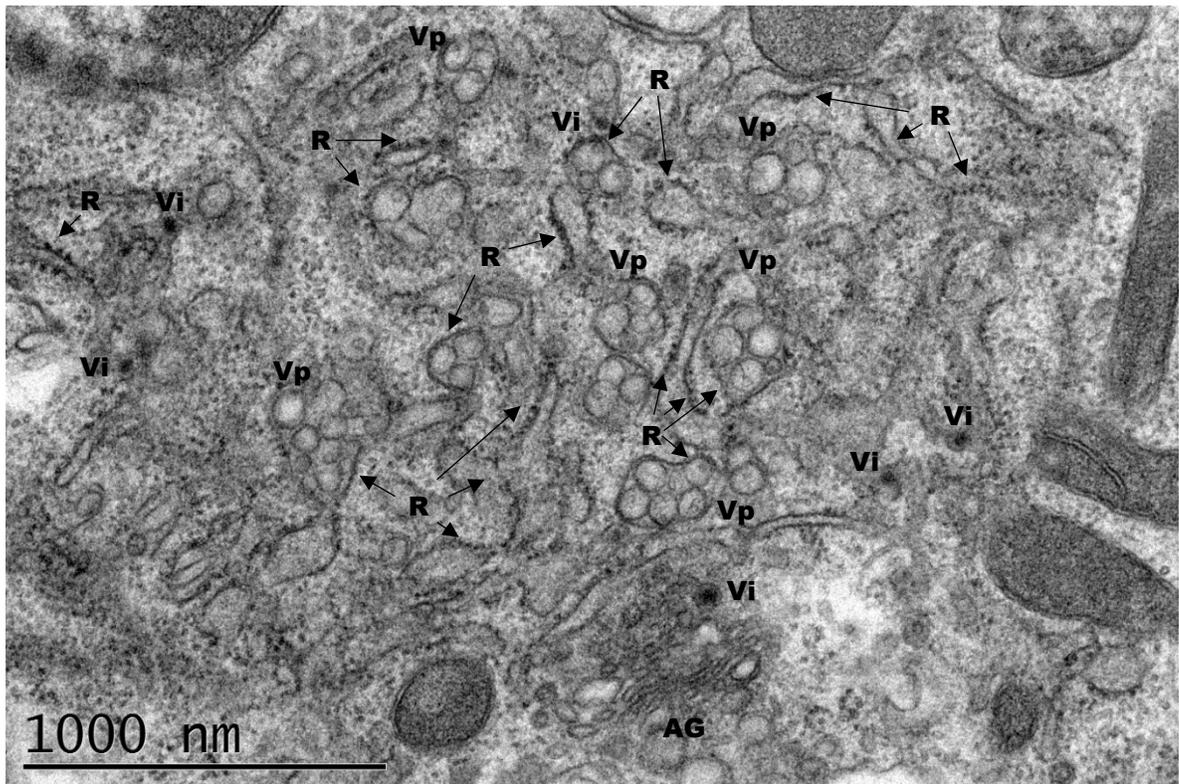


Figura 14. Presencia de ribosomas unidos a membrana del RER de las células C6-L re infectadas. El análisis de MET las células C6-L re infectadas con DENV-2 mostró un gran número de ribosomas (R) anclados a la membrana del retículo endoplasmático y a la periferia de los paquetes membranosos (Vp) que encierran las vesículas de doble membrana (Ve). Se aprecia un virus (Vi) en el aparato de Golgi (AG) sugiriendo un proceso de maduración viral.

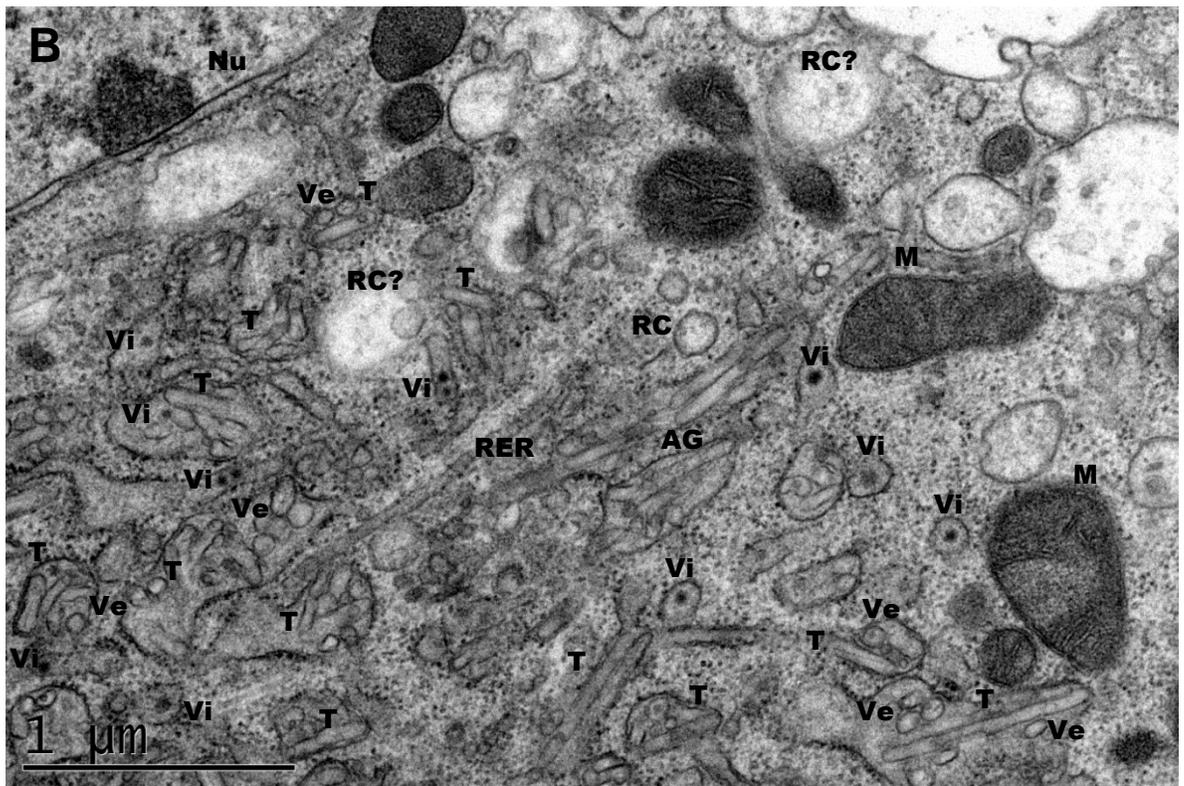
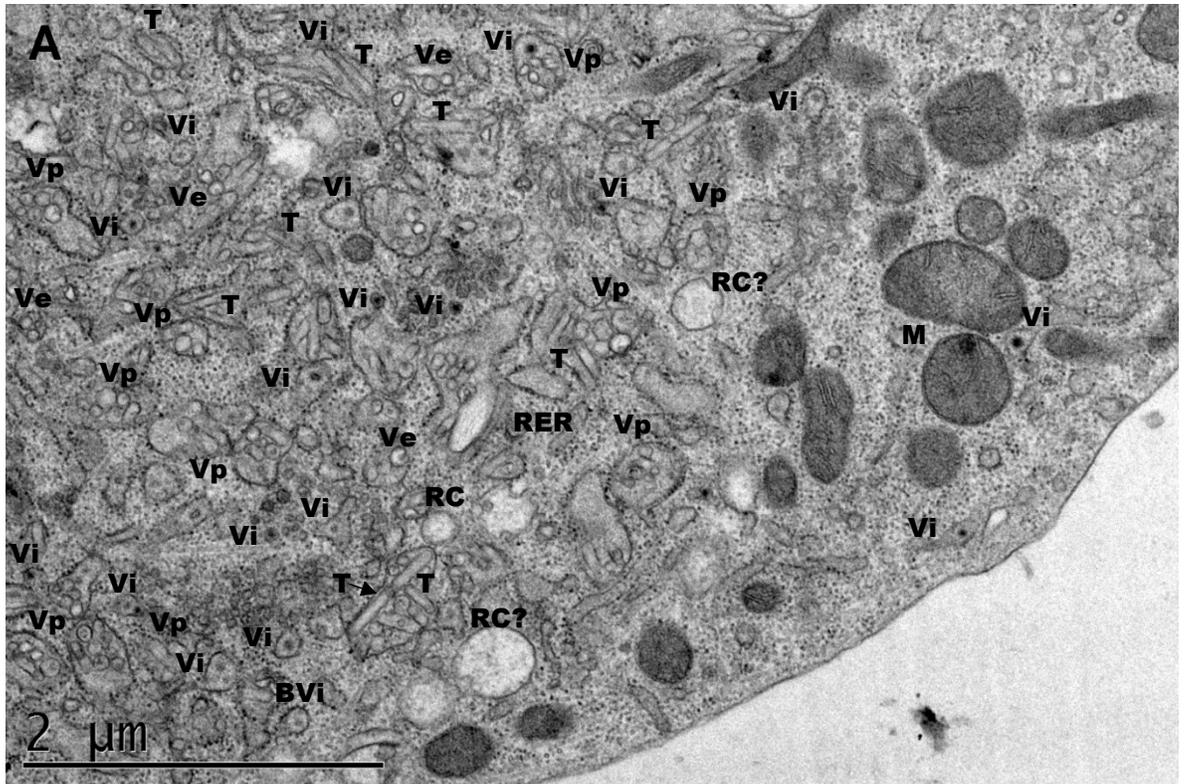


Figura 15. La reinfección de las células C6-L con DENV-2 parece potenciar la infección viral y el rearrreglo de las membranas del RER. (A) Cuando las células C6-L

son re infectadas con DENV-2 se originan un mayor número de Vp que contienen Ve y la presencia de una cantidad considerable de partículas virales en comparación con las células C6-L sin re infectar. Además, se observa la aparición de estructuras tubulares (T) y la formación de presuntos complejos replicativos de tamaño superior a los reportados (RC?). En esta imagen se puede apreciar el brote de un virus (BVi). (B) Una vista a mayor aumento de los cambios ultra estructurales que sufre la células C6-L con la re infección del DENV-2. Núcleo (Nu), complejos replicativos (RC), mitocondria (M) y retículo endoplasmático rugoso (RER).

Con la finalidad de caracterizar a mayor detalle las partículas virales de las células C6-L, se decidió realizar microscopia inmuno electrónica (MIE) inmunomarcando la proteína estructural prM, sin embargo, no se obtuvo una abundante marca pese a las diferentes concentraciones del anticuerpo usadas. Por otro lado, decidimos realizar también el marcaje de la proteína viral no estructural NS3, la cual está presente en los complejos replicativos. El análisis también se hizo para la infección aguda de las células C6/36 a una MOI de 5 y las células C6/36 tratadas con el sobrenadante de las células C6-L a las 48 horas post infección.

El análisis de MIE nos permitió observar que la proteína NS3 se encontraba localizada específicamente en el área de las vesículas de doble membrana (Ve) en la cisterna del RER y se distribuía en el citoplasma bajo las condiciones antes mencionadas. La localización de NS3 en las vesículas de doble membrana (Ve), presuntos complejos replicativos (RC), sugiere fuertemente que es parte integral de estas estructuras. Esto correlaciona con el hecho de que esta proteína es esencial en la replicación del RNA, pues tiene actividad de helicasa (figura 17). En contraste, la proteína prM no fue asociada con las estructuras de membranas inducidas por el virus, pero colocaliza con las partículas virales (figura 16). Además, se observó la presencia de “poros vesiculares” que median la conexión con el citoplasma como lo reportaron Welsch y colaboradores en el 2009 en células de mamífero infectadas con DENV-2, notando que están implicados con los sitios de brote viral (BVi) (figura 16 B).

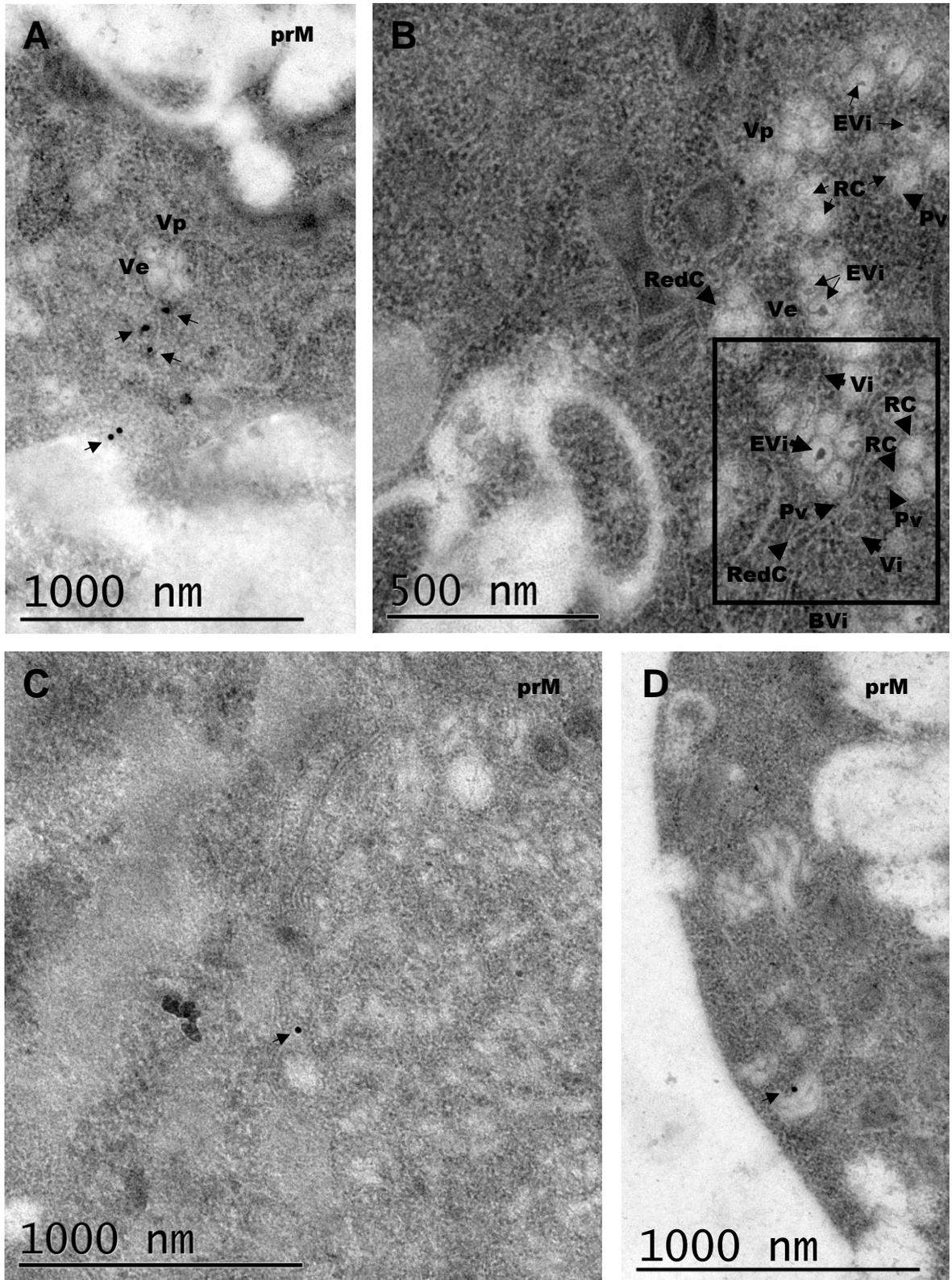
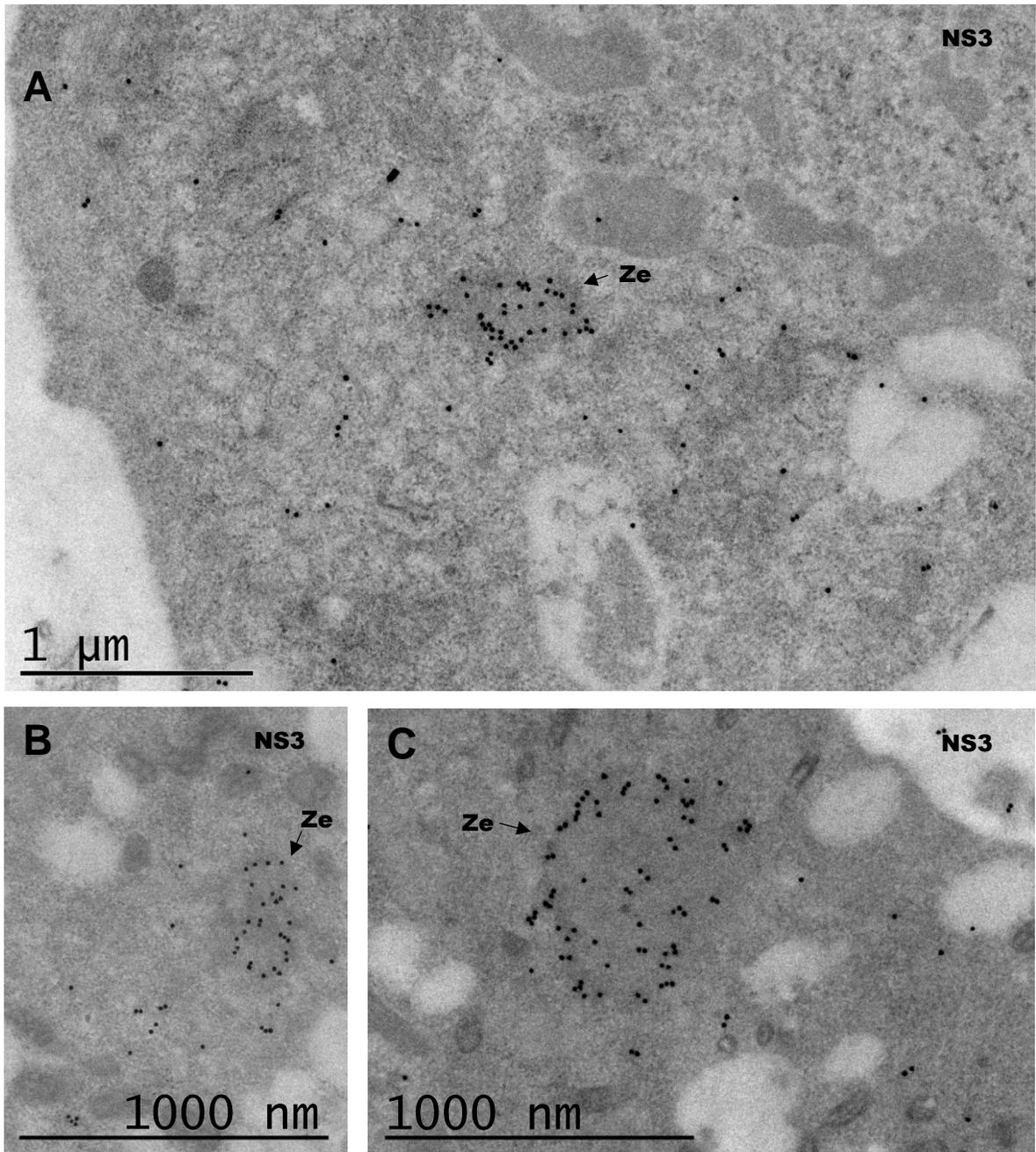
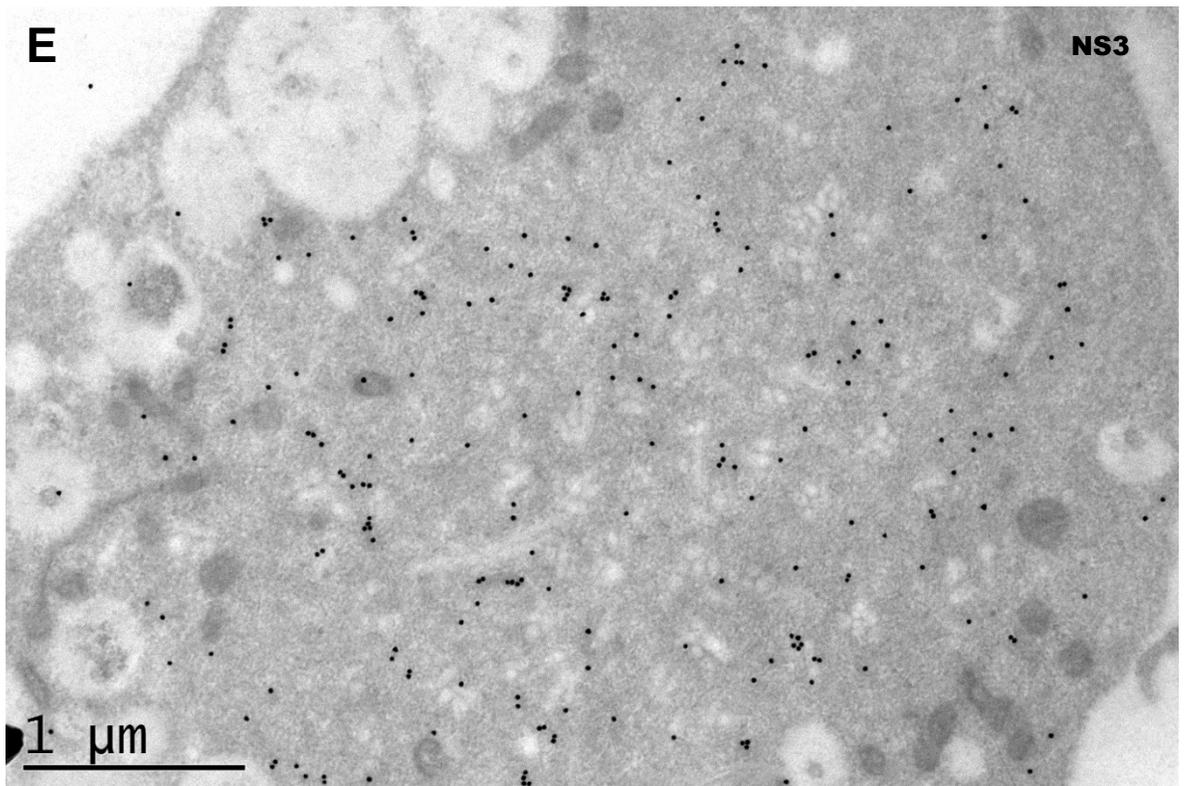
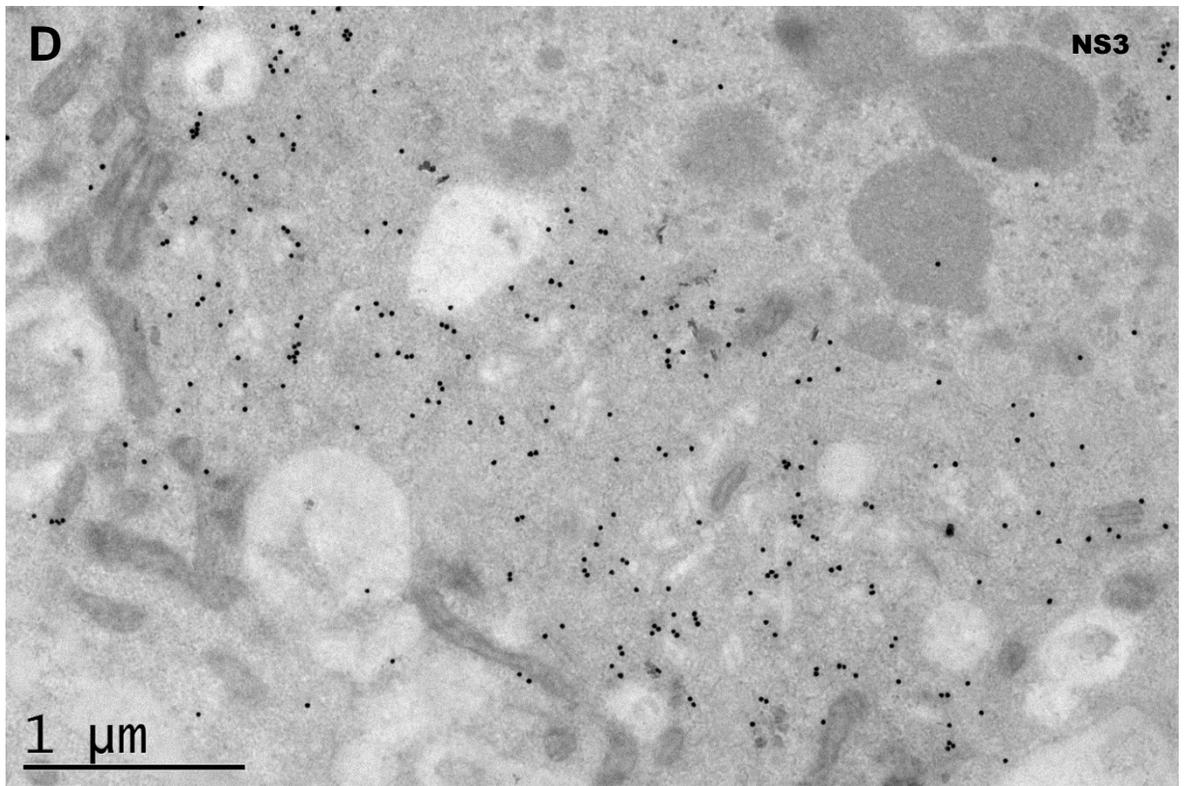
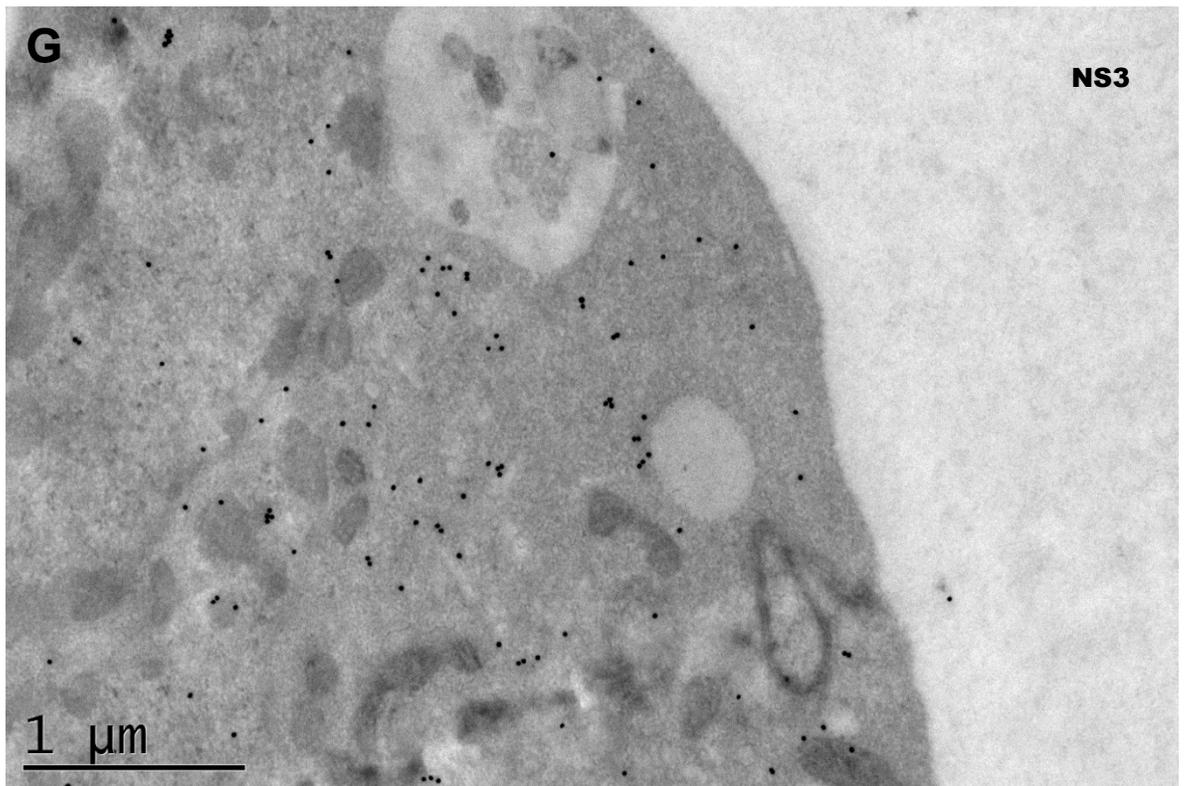
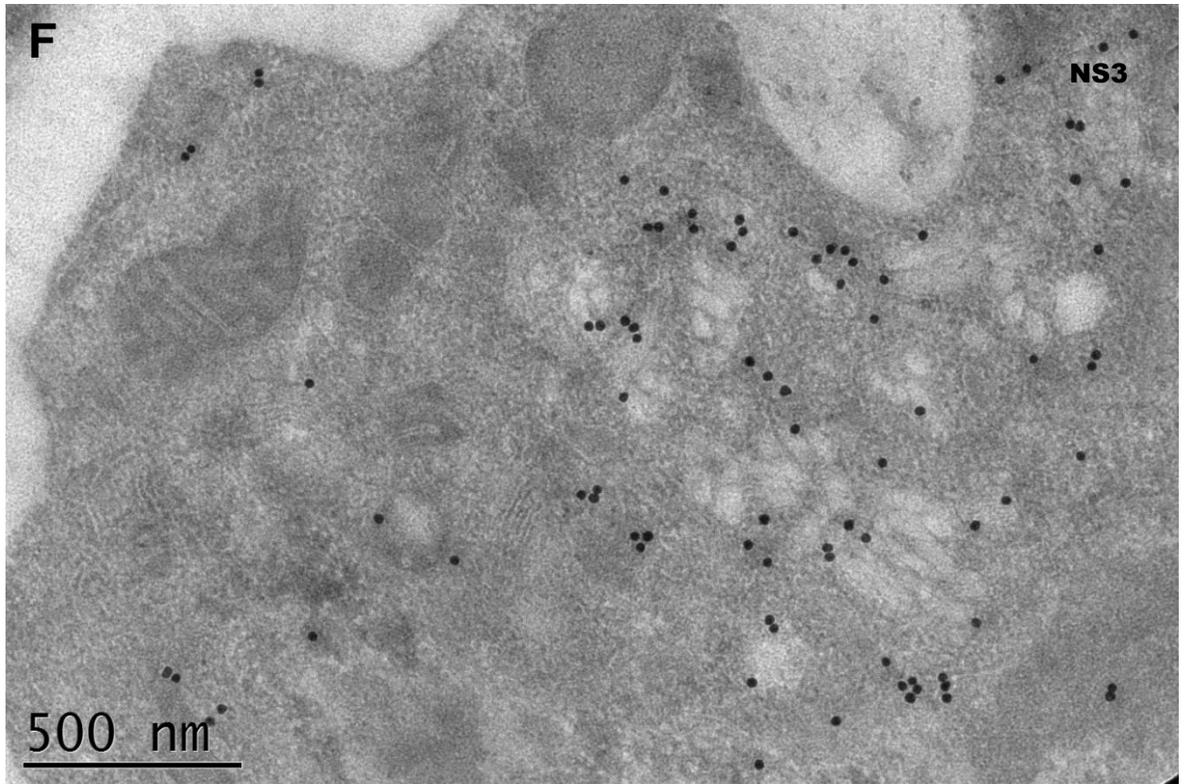


Figura 16. La proteína prM no está asociada con estructuras membranas inducidas por DENV-2. Por microscopía inmunoelectrónica se observó que la proteína prM (señalada

con flecha) no se encuentra asociada a las estructuras membranosas inducidas por el virus en las células C6/36 infectadas de manera aguda con DENV-2 (A), en las células C6/36 infectadas con el sobrenadante (C) y en las células C6L (pase 52) (D). (B) Se señala la presencia de sitios de brote viral (BVi) integrados por complejos replicativos (RC) conectados entre sí y con las Ve por una red de conductos (RedC); ensamblaje viral (EVi) dentro de Ve; “poros vesiculares” (Pv); y virus (Vi) dentro de vesículas de brote viral.







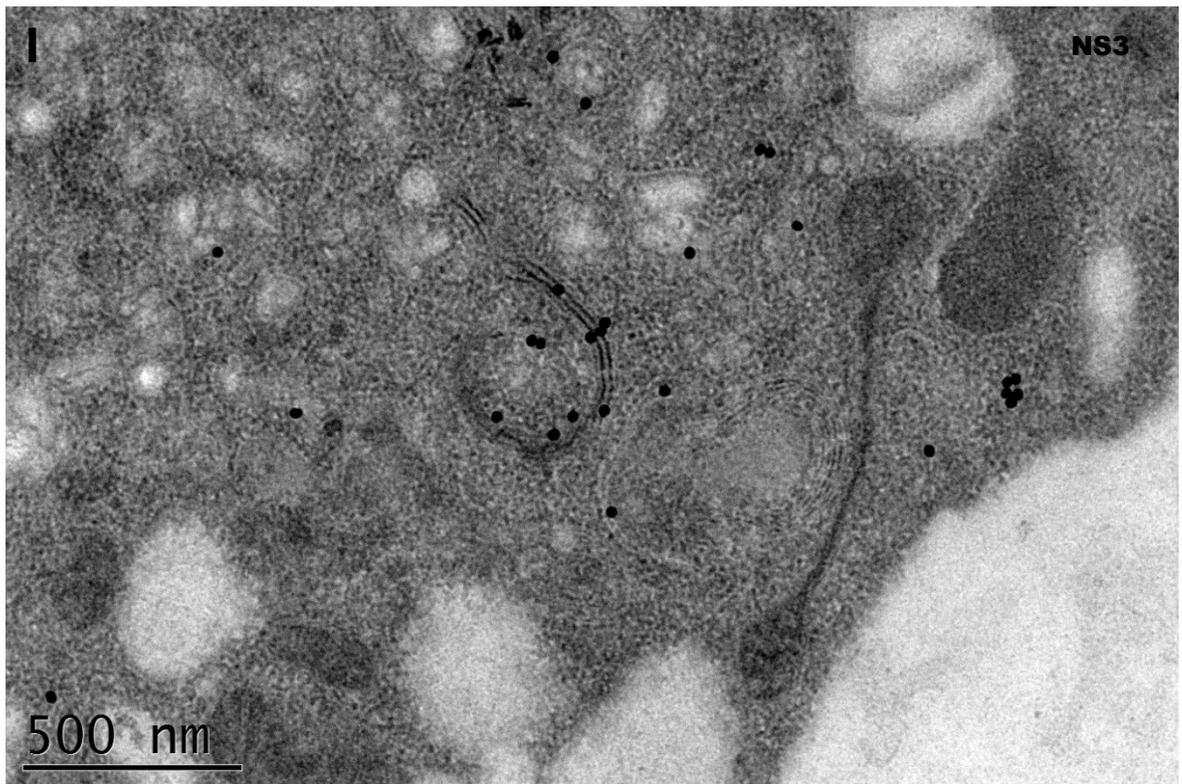
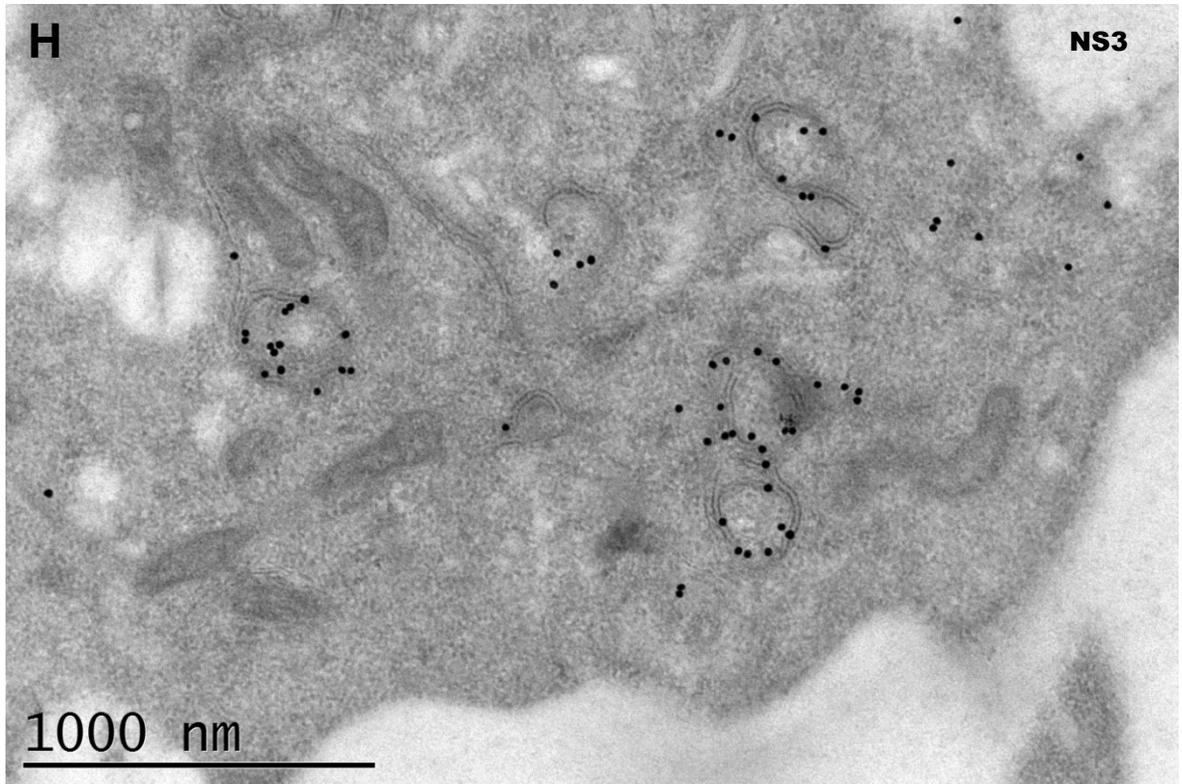


Figura 17. Localización y distribución de la proteína NS3. El análisis de MIE permitió localizar la proteína NS3 del DENV-2 en las áreas donde se encuentran las vesículas de

doble membrana (Ve) en el RER de las células C6/36 infectadas de manera aguda con DENV-2 (A, B y C), células C6/36 tratadas con el sobrenadante de células C6-L (D y E) y en las células C6-L (pase 52) (F, G, H e I). En todas las condiciones se observa que NS3 se encuentra y distribuye de manera uniforme en zonas electrodensas (Ze) (Ejemplo: A, B y C). Además, se identificó que NS3 está fuertemente asociada a ribosomas anclados al retículo endoplasmático rugoso (H e I).

Discusión

A diferencia de lo que ocurre en los seres humanos, el DENV es capaz de establecer una infección de tipo persistente en su mosquito vector, en la cual se constituye una interacción virus-célula aparentemente no citopática. Los mecanismos por los cuales esto sucede no han sido dilucidados pero, como se mencionó anteriormente, puede ser debido a diversos factores.

Las células C6-L, células C6/36 de mosquito *Aedes albopictus* persistentemente infectadas con el DENV-2, estudiadas en el laboratorio, aunque no presentan el efecto citopático característico de las células infectadas con DENV, se sintetizan genoma y proteínas virales en ellas. Además el sobrenadante de éstas células es incapaz de causar muerte o parálisis de ratones lactantes cuando se inocula intracerebralmente, todo lo contrario de lo que ocurre con el sobrenadante de células C6/36 infectadas de manera aguda. Por tal motivo se pensó que las células C6-L producían partículas virales no infectivas o bien, no tenían la capacidad de ensamblar partículas virales.

Con la idea de analizar ambas posibilidades, lo primero que se hizo fue analizar la infectividad de los virus intracelulares y extracelulares de las células C6-L (pase 56) mediante ensayos de placa lítica en células BHK-21. La ausencia de unidades formadoras de placas de los dos compartimentos, nos hizo pensar en alguna de las siguientes posibilidades: a) las células C6-L tenían una tasa baja de producción de partículas virales maduras infecciosas, b) estas células solo producían virus inmaduro o c) las células C6-L eran incapaces de ensamblar partículas virales. Para averiguar, indirectamente, si había partículas virales en el sobrenadante de las células de C6-L se realizó una qRT-PCR, en donde se demostró que había RNA de DENV-2 en el sobrenadante de las células C6-L (pase 56), sugiriendo que si había partículas virales liberadas al medio extracelular. Por otro lado, cuando el sobrenadante de las células C6-L se usó para infectar células C6/36, se logró inducir infección puesto que se detectó la expresión de *novο* del genoma viral. Estos datos sugerían que en el sobrenadante de las células C6-L había virus infectivo para células C6/36 pero no para BHK-21.

En base a estos resultados, se decidió analizar a nivel ultra estructural mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) si las células C6-L presentaban complejos de replicación y si en ellos, había formación de partículas virales. Ya que, como parásitos obligados intracelulares, los virus dependen de la maquinaria de la célula huésped para replicar su genoma y generar la progenie viral. Una característica común entre los virus es la inducción de compartimentos membranosos especializados, a menudo formando estructuras similares a organelos, dentro del citoplasma de la célula infectada con la finalidad de facilitar la replicación y el ensamblaje del virus. Estas fábricas de replicación viral, como se les conoce comúnmente, han sido caracterizadas en células de mamífero y de mosquito infectadas con DENV (Barth, 1992; Grief *et al.*, 1997; Junjhon *et al.*, 2014; Ko *et al.*, 1979; Welsch, 2009) mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía inmunoelectrónica (MIE) y tomografía electrónica (TE) para obtener una perspectiva tridimensional de los complejos de replicación viral. Sin embargo, poco se sabe de estas fábricas de replicación dentro de las células de mosquito persistentemente infectadas.

El análisis de MET de las células C6-L (pase 55) no sólo reveló la presencia y localización de partículas virales a nivel de RER (como esferas pequeñas electrodensas y oscuras de casi 50 nm), sino también estructuras que surgen del rearrreglo del RER inducido por el DENV-2. Entre estas estructuras se encontraron paquetes membranosos (Vp) que albergan vesículas de doble membrana (Ve) que son también conocidos como “estructuras vesículo-tubulares” o “estructuras de membrana lisa” (SMS). Cabe mencionar, que se observó la salida de partículas virales, indicando fuertemente que los virus ensamblados son liberados al medio extracelular. Para determinar si las partículas virales observadas eran infectivas, al menos en las células de mosquito, las células C6/36 fueron tratadas con el sobrenadante de las células C6-L. El análisis de MET evidenció la formación de partículas virales y de estructuras de Ve y Vp de *novo*, un número considerable de ribosomas (R) en el RER, y la agrupación de partículas virales entre célula y célula

para dirigir su salida o entrada. Estos resultados sugieren que las células C6-L liberan partículas virales capaces de infectar nuevas células.

El análisis ultra estructural de las células C6-L re infectadas con el DENV-2 mostró la organización de los ribosomas a la periferia de los Vp, proponiendo que los Vp son derivados del RER y pueden participar en la traducción de las proteínas virales. En base a estas observaciones, se puede sugerir que los ribosomas anclados a los Vp presentan una marcada actividad de síntesis proteica causada por la re infección.

Las estructuras tubulares (T) son otras estructuras originadas también por el rearrreglo del RER inducido por el DENV dentro de las células de mosquito. En contraste con reportes anteriores (Grief *et al.*, 1997; Junjhon *et al.*, 2014; Ko *et al.*, 1979) nuestro análisis de MET en las células C6-L re infectadas con DENV-2, muestra un alto número de estructuras tubulares a las 48 horas post infección. Junjhon y colaboradores sugieren que la generación de estructuras tubulares no tiene aparente relación con la replicación del DENV-2, puesto que en su estudio fueron detectables a partir de las 36 horas post infección después de múltiples rondas de replicación viral, suceso que también es observado en la infección de otros virus de RNA de cadena positiva. Sin embargo, Ko y colaboradores reportaron un gran número de estructuras tubulares (mayor a las observadas en este estudio) cuando las células C6/36 fueron infectadas durante 7 días con el DENV-3, lo que conduce a la idea de “cuando las células C6-L son re infectadas con el DENV-2 se genera un potenciamiento de la infección, de tal magnitud, que una re infección viral de 48 horas logra inducir un cambio ultra estructural de la membrana del RER pronunciado, similar al producido por una infección crónica de 7 días”. Si se toma en cuenta que en las células C6-L sin re infectar no se observaron estructuras tubulares, debido quizá a la adaptación viral que han conseguido las células para mantener la infección persistente, se descarta la posibilidad de que las estructuras tubulares jueguen un papel importante en la persistencia viral, pero sí se sugiere que todavía las células son capaces de responder a una re infección viral.

Se ha reportado que en las células de mosquito infectadas de manera aguda con DENV, hay una correlación entre la producción del virus y el rearrreglo de membranas intracelulares a nivel de RER (Ko *et al.*, 1979); la presencia de estructuras membranosas (Ve, Vp y T) y de partículas virales observadas a diferentes tiempos post infección, correlaciona con la cinética de síntesis de RNA, ensamblaje y liberación de las partículas virales (Junjhon *et al.*, 2014). En este estudio no se puede determinar una correlación entre tiempos post infección, replicación, formación y liberación del DENV-2, debido a que las células C6-L ya se encuentran infectadas y de manera persistente, sin embargo, se logró observar que en estas células existe un número considerable de Ve y de Vp, relacionadas con el ensamblaje y la persistencia del DENV-2.

Una porción de las vesículas de doble membrana (Ve) observadas contenían material electro denso similar a filamentos irregulares, previamente identificados en otros virus de RNA de cadena sencilla y sentido positivo. A estas estructuras se les conoce como complejos replicativos (RC) basados en la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA) (Grief *et al.*, 1997). Para averiguar si los presuntos complejos replicativos de mayor tamaño (RC?) identificados en este estudio, son verdaderos, será necesario marcar el dsRNA.

Las observaciones realizadas por MET corroboraron la ausencia de estructuras membranosas complejas (CM) en células C6/36 de mosquito, como lo reportó Junjhon y colaboradores en un estudio de infección aguda, y también no fueron observadas en las células C6-L, sin embargo, estas estructuras han sido reportadas en células de mamíferos infectadas con *Flavivirus* (Gillespie *et al.*, 2010; Mackenzie *et al.*, 1999; Welsh *et al.*, 2009; Westaway *et al.*, 1997).

Para confirmar la presencia de partículas virales del DENV-2 en las células C6-L, se realizó una microscopía inmunoeléctronica (MIE) inmunomarcando la proteína precursora de membrana (prM). Pese a que se obtuvo poca marca se observó que

esta proteína estructural no estaba asociada con las estructuras de doble membrana (Ve), sin embargo, como se esperaba, colocalizó con las partículas virales.

El siguiente paso fue averiguar la presencia y localización de alguna de las proteínas no estructurales, y para tal objetivo se inmunomarcó la proteína NS3, la cual se observó que marcaba específicamente el área de las vesículas de doble membrana (Ve) en las cisternas del RER y se encuentra también en el citoplasma. La densidad electrónica detectada con el marcaje de oro en la microscopía inmunoelectrónica, es debida al acetato de uranilo que se usa para contrastar los cortes celulares inmunomarcados. Partiendo de este hecho, se encontró a la proteína NS3 distribuida en zonas con densidad electrónica (Ze), zonas de características similares a las que se emiten cuando se usa un anticuerpo específico anti-dsRNA, además de que también se forman cuando el acetato de uranilo se une a grupos fosfatos de los ácidos nucleicos, sugiriendo la posible asociación de la proteína NS3 con el genoma viral. La proteína NS3 tiene actividad de helicasa que es esencial para la replicación del RNA viral y su localización en las vesículas de doble membrana (Ve), presuntos complejos replicativos (RC), y en las Ze sugiere fuertemente que es parte integral de estas estructuras y que en ellas se lleva a cabo la replicación del RNA viral. NS3 tiene también actividad de proteasa y se sabe que participa en el procesamiento de la poli proteína viral. En este estudio se determinó que NS3 está fuertemente asociada a los ribosomas anclados al RER, sugiriendo su participación en el procesamiento de la poli proteína viral del DENV-2.

En este análisis de MIE se observaron con mayor detalle los sitios de brote viral (BVi), figura 16 B, determinando, que el ensamblaje del virus (EVi) se lleva a cabo en relación estrecha con las estructuras inducidas por el DENV-2 (Ve y Vp) e inicia por la encapsidación del RNA viral (complejo cápside-RNA viral) dentro de las Ve donde se encuentran las proteínas virales prM y E, las cuales son transportadas desde las membranas del RER mediante los “poros vesiculares (Pv)” que median la conexión con el citoplasma (Welsch *et al.*, 2009). Se cree que los Pv están involucrados en la regulación de los factores necesarios para la replicación del RNA

viral, así como en la exportación del genoma recién sintetizado para ser traducido, nosotros sugerimos que los Pv están asociados a los complejos replicativos (RC) implicados como ya se mencionó en la replicación del RNA viral, y que los RC están conectados entre sí, y con las Ve en los Vp, por medio de una red de conductos (RedC) que podrían distribuir y compartir proteínas celulares y virales, así como también el genoma viral, para propiciar la replicación y el ensamblaje del virus a nivel del RER. Otra observación que corrobora el ensamblaje del virus, es la presencia de pequeñas gemaciones esféricas de membrana de casi 60 nm de diámetro con marcada densidad electrónica, las cuales indican que una vez ensamblado el virus (Vi), este brota sobre las membranas del RER en estrecha relación con los Pv que participan en la formación y escisión de las vesículas de brote viral, conduciendo así a la liberación del virus.

La caracterización de los cambios ultra estructurales de la membrana del RER, obtenida del análisis por MET y MIE, permitió sugerir un posible modelo para explicar el acoplamiento espacial de las diferentes etapas del ciclo replicativo del DENV-2 en las células C6-L y comprender como se mantiene la infección persistente (figura 18). La deducción de los diferentes pasos del ciclo replicativo fue la siguiente: **(1)** es probable que el genoma del DENV se asocia con el retículo endoplasmático rugoso donde es traducido por los ribosomas (R) originando la poli proteína viral que es procesada proteolíticamente por proteasas celulares y virales, como la proteína NS3 (figura 17 H e I), dando lugar a las proteínas estructurales y no estructurales. **(2)** La proteína NS4A junto con otras proteínas virales, y quizá celulares, inducen invaginación de la membrana del RE, conduciendo a la formación de vesículas que se conectan al citosol mediante un poro vesicular (Pv) (Welsch *et al.*, 2009) (figura 16 B). En el interior de estas invaginaciones (complejos replicativos (RC)) ocurre la replicación del RNA viral (figura 12 B). La proteína NS3, que también tiene actividad de helicasa, participa en la replicación del RNA viral la cual se lleva a cabo en los RC y en las Ze (17 F y G). Los Pv están asociados a los RC, y a su vez los RC están conectados entre sí, y con las Ve en los Vp, por medio de una red de conductos (RedC) que podrían distribuir y compartir proteínas celulares y virales,

así como también el genoma viral, para propiciar la replicación y el ensamblaje del virus a nivel del RER (figura 16 B). **(3)** El RNA viral recién sintetizado se asocia a la proteína C formando el complejo cápside-RNA viral y posteriormente a la nucleocápside se integran las proteínas prM y E para ensamblar el virus (EVi), el cual brota (BVi), en estrecha proximidad con las vesículas inducidas por el virus, sobre las membranas del RER donde los Pv participan en la formación y escisión de las vesículas de brote viral (figura 12 B y 16 B). **(4)** Algunos virus son colectados en cisternas de RER dilatadas (figura 12 A). **(5)** Posteriormente son transportados como virus individuales por medio de vesículas de la vía secretoria al aparato de Golgi (figura 12 A), donde no sabemos con exactitud si se lleva a cabo la maduración de la partícula viral por el corte del péptido pr realizado por la endoproteasa celular furina. **(6)** Finalmente, continúan por la vía secretoria y se reúnen entre célula y célula para ser liberados al espacio extracelular (figura 12 C).

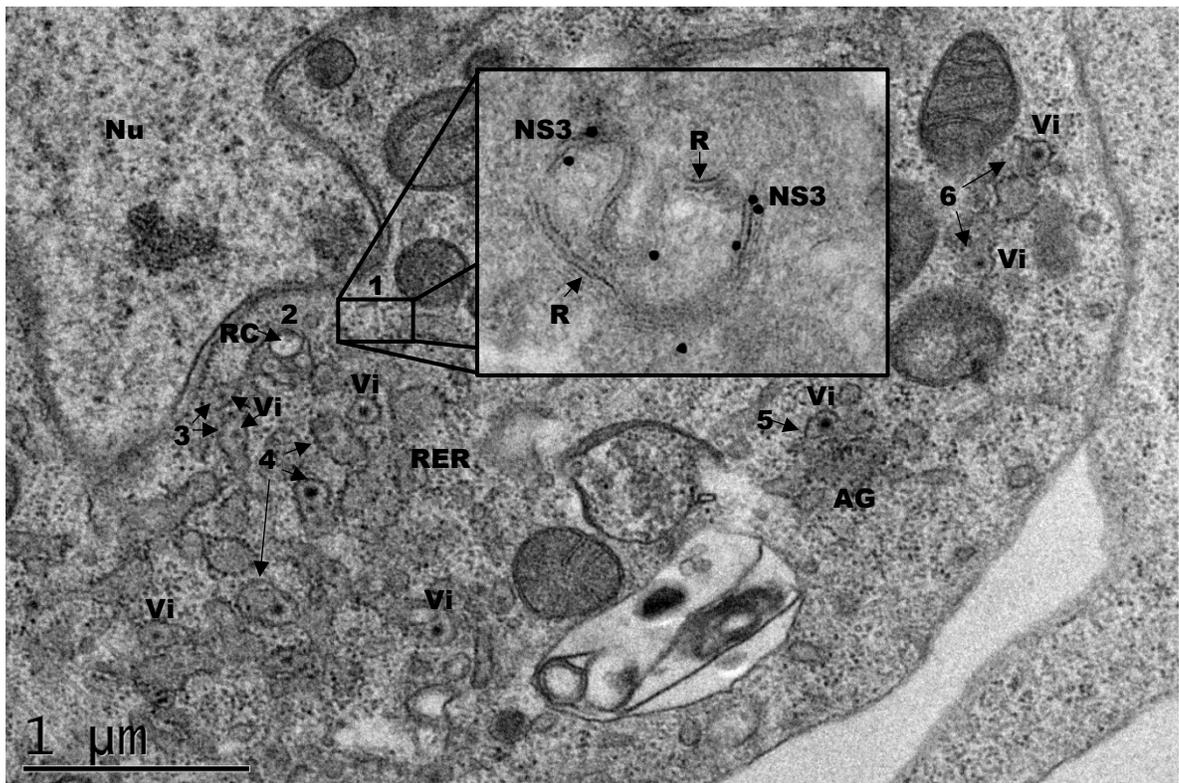


Figura 18. Modelo que sugiere la replicación, ensamblaje y liberación de las partículas virales del DENV-2 en las células C6-L. (1) Traducción del genoma viral y procesamiento proteolítico de la poli proteína viral donde participa la proteína viral NS3; (2)

replicación del genoma viral en estructuras vesiculares, producto del desarreglo del RER inducido por el virus, denominadas complejos replicativos (RC); (3) ensamblaje y liberación del virus (Vi); (4) algunos virus son colectados en cisternas de RER dilatadas; (5) transporte del virus por medio de vesículas de la vía secretoria al aparato de Golgi (AG); y finalmente (6) los virus continúan por la vía secretoria y se reúnen entre célula y célula para dirigirse al espacio extracelular.

Haciendo hincapié en los resultados de Ko y colaboradores, la infección crónica por DENV de 7 días mostró elevado número de estructuras tubulares (T), como ya se mencionó, generando un desarreglo total de la membrana del RER y del citoplasma que condujo a la muerte de las células infectadas. Sin embargo, el estudio realizado aquí indica que las células C6-L no mostraron la presencia de estas estructuras, sugiriendo que probablemente llega un punto determinado en el cual la célula se adapta a la presencia del virus para sobrevivir a la infección, por mecanismos de supervivencia celular aún desconocidos pero que son heredados a la progenie celular para subsistir (presunta implicación evolutiva). De tal manera, que los resultados aquí expuestos podrían sentar la base para determinar como la interacción virus-célula en la naturaleza se mantiene sin causar daño al mosquito hospedero-vector.

De esta manera se logró caracterizar las partículas virales del DENV-2 en las células C6-L, sin embargo no está claro porque estas partículas virales presuntamente no infectan a las células BHK-21 y a los ratones Balb/c recién nacidos. Probablemente se trate de una adaptación del virus a la línea celular de mosquitos, o quizá son necesarias otras técnicas que permitan averiguar las razones.

Conclusiones

Las células C6/36 persistentemente infectadas con DENV-2 (C6-L) producen partículas virales a nivel de RER, que siguen la vía exocítica para ser liberadas al medio extracelular.

Las partículas virales del DENV-2 provenientes de las células C6-L tienen la capacidad de infectar a las células C6/36.

Las células C6-L contienen fábricas de replicación viral (cambios estructurales del RER inducido por el virus) compuestas por paquetes membranosos (Vp) que albergan vesículas de doble membrana (Ve) (participan en el ensamblaje del virus) y complejos replicativos (RC) (participan en la replicación del genoma viral).

Perspectivas

A las partículas virales de las células C6-L:

Tratar con furina los sobrenadantes y los extractos celulares para posiblemente ampliar la tasa de partículas virales maduras infecciosas.

Evaluar con anticuerpos anti-E monoclonales para detectar a la proteína E viral y descartar que el virus no se esté endocitando debido a la falta de interacción entre el receptor celular y la proteína E, que media la entrada del virus a la célula.

Probar en ensayos de plaqueo que las partículas extracelulares son infectivos, para ello, se usarán otras células de mamífero como células Vero mediante ensayo de focos y se averiguará si induce formación de placas líticas en células C6/36 (ensayo de plaqueo).

Referencias

1. Aaskov, J., Buzacott, K., Thu, H.M., Lowry, K., Holmes, E.C., 2006. Long-Term Transmission of Defective RNA Viruses in Humans and *Aedes* Mosquitoes. *Science* 311, 236–238. doi:10.1126/science.1115030
2. Aoki, C., Hidari, K.I.P.J., Itonori, S., Yamada, A., Takahashi, N., Kasama, T., Hasebe, F., Islam, M.A., Hatano, K., Matsuoka, K., Taki, T., Guo, C.-T., Takahashi, T., Sakano, Y., Suzuki, T., Miyamoto, D., Sugita, M., Terunuma, D., Morita, K., Suzuki, Y., 2006. Identification and characterization of carbohydrate molecules in mammalian cells recognized by dengue virus type 2. *J. Biochem. (Tokyo)* 139, 607–614. doi:10.1093/jb/mvj067
3. Back, A.T., Lundkvist, A., 2013. Dengue viruses - an overview. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 3. doi:10.3402/iee.v3i0.19839
4. Barth, O.M., 1992. Replication of dengue viruses in mosquito cell cultures--a model from ultrastructural observations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87, 565–574.
5. Baty, S.A., Gibney, K.B., Staples, J.E., Patterson, A.B., Levy, C., Lehman, J., Wadleigh, T., Feld, J., Lanciotti, R., Nugent, C.T., Fischer, M., 2012. Evaluation for West Nile Virus (WNV) RNA in urine of patients within 5 months of WNV infection. *J. Infect. Dis.* 205, 1476–1477. doi:10.1093/infdis/jis221
6. Blair, C.D., 2011. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol.* 6, 265–277. doi:10.2217/fmb.11.11
7. Blair, C.D., Olson, K.E., 2015. The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses* 7, 820–843. doi:10.3390/v7020820
8. Carson, P.J., Konewko, P., Wold, K.S., Mariani, P., Goli, S., Bergloff, P., Crosby, R.D., 2006. Long-term clinical and neuropsychological outcomes of West Nile virus infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 43, 723–730. doi:10.1086/506939
9. Cave, D.R., Hendrickson, F.M., Huang, A.S., 1985. Defective interfering virus particles modulate virulence. *J. Virol.* 55, 366–373.
10. Center for Disease Control and Prevention, 2010. Arbovirus Catalog - CDC Division of Vector-Borne Diseases (DVBD) [WWW Document]. URL <https://wwwn.cdc.gov/Arbocat/Default.aspx> (accessed 6.9.15).
11. Chen, L.K., Liao, C.L., Lin, C.G., Lai, S.C., Liu, C.I., Ma, S.H., Huang, Y.Y., Lin, Y.L., 1996. Persistence of Japanese encephalitis virus is associated with abnormal expression of the nonstructural protein NS1 in host cells. *Virology* 217, 220–229. doi:10.1006/viro.1996.0109
12. Chen, W.J., Chen, S.L., Fang, A.H., 1994. Phenotypic characteristics of dengue 2 virus persistently infected in a C6/36 clone of *Aedes albopictus* cells. *Intervirology* 37, 25–30.
13. Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., Marks, R.M., 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* 3, 866–871.
14. Clyde, K., Kyle, J.L., Harris, E., 2006. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *J. Virol.* 80, 11418–11431. doi:10.1128/JVI.01257-06

15. Crochu, S., Cook, S., Attoui, H., Charrel, R.N., De Chesse, R., Belhouchet, M., Lemasson, J.-J., de Micco, P., de Lamballerie, X., 2004. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J. Gen. Virol.* 85, 1971–1980. doi:10.1099/vir.0.79850-0
16. Debnath, N.C., Tiernery, R., Sil, B.K., Wills, M.R., Barrett, A.D., 1991. In vitro homotypic and heterotypic interference by defective interfering particles of West Nile virus. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 11), 2705–2711.
17. Deen, J.L., Harris, E., Wills, B., Balmaseda, A., Hammond, S.N., Rocha, C., Dung, N.M., Hung, N.T., Hien, T.T., Farrar, J.J., 2006. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* 368, 170–173. doi:10.1016/S0140-6736(06)69006-5
18. De Gascun, C.F., Carr, M.J., 2013. Human Polyomavirus Reactivation: Disease Pathogenesis and Treatment Approaches. *Clin. Dev. Immunol.* 2013. doi:10.1155/2013/373579
19. DGE, 2015. Dirección General de Epidemiología [WWW Document]. URL http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/panodengue/intd_dengue.html (accessed 6.26.15).
20. Diamond, M.S., 2003. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunol. Cell Biol.* 81, 196–206. doi:10.1046/j.1440-1711.2003.01157.x
21. Ding, X., Wu, X., Duan, T., Siirin, M., Guzman, H., Yang, Z., Tesh, R.B., Xiao, S.-Y., 2005. Nucleotide and amino acid changes in West Nile virus strains exhibiting renal tropism in hamsters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 803–807.
22. Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y.M., Lai, C.J., 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 65, 2467–2475.
23. Fragkoudis, R., Attarzadeh-Yazdi, G., Nash, A.A., Fazakerley, J.K., Kohl, A., 2009. Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. *J. Gen. Virol.* 90, 2061–2072. doi:10.1099/vir.0.013201-0
24. Friebe, P., Shi, P.-Y., Harris, E., 2011. The 5' and 3' downstream AUG region elements are required for mosquito-borne flavivirus RNA replication. *J. Virol.* 85, 1900–1905. doi:10.1128/JVI.02037-10
25. Gibney, K.B., Lanciotti, R.S., Sejvar, J.J., Nugent, C.T., Linnen, J.M., Delorey, M.J., Lehman, J.A., Boswell, E.N., Staples, J.E., Fischer, M., 2011. West Nile virus RNA not detected in urine of 40 people tested 6 years after acute West Nile virus disease. *J. Infect. Dis.* 203, 344–347. doi:10.1093/infdis/jiq057
26. Gillespie, L.K., Hoenen, A., Morgan, G., Mackenzie, J.M., 2010. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J. Virol.* 84, 10438–10447. doi:10.1128/JVI.00986-10
27. Girard, Y.A., Popov, V., Wen, J., Han, V., Higgs, S., 2005. Ultrastructural study of West Nile virus pathogenesis in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 42, 429–444.
28. Grief, C., Galler, R., Côrtes, L.M., Barth, O.M., 1997. Intracellular localisation of dengue-2 RNA in mosquito cell culture using electron microscopic in situ hybridisation. *Arch. Virol.* 142, 2347–2357.

29. Gubler, D.J., 2001. Human arbovirus infections worldwide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951, 13–24.
30. Gulati, S., Maheshwari, A., 2007. Atypical manifestations of dengue. *Trop. Med. Int. Health* 12, 1087–1095. doi:10.1111/j.1365-3156.2007.01891.x
31. Guzman, M.G., Harris, E., 2015. Dengue. *Lancet* 385, 453–465. doi:10.1016/S0140-6736(14)60572-9
32. Halstead, S.B., 2007. Dengue. *Lancet* 370, 1644–1652. doi:10.1016/S0140-6736(07)61687-0
33. Harris, E., Holden, K.L., Edgil, D., Polacek, C., Clyde, K., 2006. Molecular biology of flaviviruses. *Novartis Found. Symp.* 277, 23–39; discussion 40, 71–73, 251–253.
34. Heinz, F.X., Allison, S.L., 2003. Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv. Virus Res.* 59, 63–97.
35. Huang, A.S., Baltimore, D., 1970. Defective Viral Particles and Viral Disease Processes. *Nature* 226, 325–327. doi:10.1038/226325a0
36. Idrees, S., Ashfaq, U.A., 2012. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genet. Vaccines Ther.* 10, 6. doi:10.1186/1479-0556-10-6
37. Igarashi, A., 1979. Characteristics of *Aedes albopictus* cells persistently infected with dengue viruses. *Nature* 280, 690–691. doi:10.1038/280690a0
38. Jessie, K., Fong, M.Y., Devi, S., Lam, S.K., Wong, K.T., 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Infect. Dis.* 189, 1411–1418. doi:10.1086/383043
39. Juárez-Martínez, A.B., Vega-Almeida, T.O., Salas-Benito, M., García-Espitia, M., Nova-Ocampo, M.D., Ángel, R.M. del, Salas-Benito, J.S., 2013. Detection and sequencing of defective viral genomes in C6/36 cells persistently infected with dengue virus 2. *Arch. Virol.* 158, 583–599. doi:10.1007/s00705-012-1525-2
40. Kalayanarooj, S., 2011. Dengue classification: current WHO vs. the newly suggested classification for better clinical application? *J. Med. Assoc. Thai. Chotmaihet Thangphaet* 94 Suppl 3, S74–84.
41. Kanthong, N., Khemnu, N., Pattanakitsakul, S.-N., Malasit, P., Flegel, T.W., 2010. Persistent, triple-virus co-infections in mosquito cells. *BMC Microbiol.* 10, 14. doi:10.1186/1471-2180-10-14
42. Kanthong, N., Khemnu, N., Sriurairatana, S., Pattanakitsakul, S.-N., Malasit, P., Flegel, T.W., 2008. Mosquito cells accommodate balanced, persistent co-infections with a densovirus and Dengue virus. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1063–1075. doi:10.1016/j.dci.2008.02.008
43. Ko, K.K., Igarashi, A., Fukai, K., 1979. Electron microscopic observations on *Aedes albopictus* cells infected with dengue viruses. *Arch. Virol.* 62, 41–52.
44. Kramer, L.D., Ebel, G.D., 2003. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv. Virus Res.* 60, 187–232.
45. Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C., Smith, D.R., 2010. Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology* 406, 149–161. doi:10.1016/j.virol.2010.07.015

46. Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C.T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., Baker, T.S., Strauss, J.H., 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717–725.
47. Kuno, G., 1982. Persistent infection of a nonvector mosquito cell line (TRA-171) with dengue viruses. *Intervirology* 18, 45–55.
48. Kuno, G., Oliver, A., 1989. Maintaining mosquito cell lines at high temperatures: effects on the replication of flaviviruses. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* 25, 193–196.
49. Lambrechts, L., Scott, T.W., 2009. Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 1369–1378. doi:10.1098/rspb.2008.1709
50. Lancaster, M.U., Hodgetts, S.I., Mackenzie, J.S., Urosevic, N., 1998. Characterization of defective viral RNA produced during persistent infection of Vero cells with Murray Valley encephalitis virus. *J. Virol.* 72, 2474–2482.
51. Laughlin, C.A., Morens, D.M., Cassetti, M.C., Costero-Saint Denis, A., San Martin, J.-L., Whitehead, S.S., Fauci, A.S., 2012. Dengue Research Opportunities in the Americas. *J. Infect. Dis.* 206, 1121–1127. doi:10.1093/infdis/jis351
52. León - Guzmán, M. de los Á., 2013. EVALUACION Y DETERMINACION DEL TIPO DE INTERFERENCIA VIRAL EN CELULAS C6/36 PERSISTENTEMENTE INFECTADAS CON EL VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 2 (Thesis).
53. Lequime, S., Lambrechts, L., 2014. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 28, 681–690. doi:10.1016/j.meegid.2014.07.025
54. Liao, C.-L., Lin, Y.-L., Shen, S.-C., Shen, J.-Y., Su, H.-L., Huang, Y.-L., Ma, S.-H., Sun, Y.-C., Chen, K.-P., Chen, L.-K., 1998. Antiapoptotic but Not Antiviral Function of Human bcl-2 Assists Establishment of Japanese Encephalitis Virus Persistence in Cultured Cells. *J. Virol.* 72, 9844–9854.
55. Li, D., Lott, W.B., Lowry, K., Jones, A., Thu, H.M., Aaskov, J., 2011. Defective Interfering Viral Particles in Acute Dengue Infections. *PLoS ONE* 6. doi:10.1371/journal.pone.0019447
56. Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K.E., Padmanabhan, R., 1999. The Serine Protease and RNA-Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue Virus Type 2 NS3 Converge within a Region of 20 Amino Acids. *J. Virol.* 73, 3108–3116.
57. Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 59, 23–61.
58. Lucs, A.V., DeVoti, J.A., Hatam, L., Afzal, A., Abramson, A.L., Steinberg, B.M., Bonagura, V.R., 2015. Immune Dysregulation in Patients Persistently Infected with Human Papillomaviruses 6 and 11. *J. Clin. Med.* 4, 375–388. doi:10.3390/jcm4030375
59. Mackenzie, J., 2005. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic Cph. Den.* 6, 967–977. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00339.x
60. Mackenzie, J.M., Jones, M.K., Westaway, E.G., 1999. Markers for trans-Golgi Membranes and the Intermediate Compartment Localize to Induced

Membranes with Distinct Replication Functions in Flavivirus-Infected Cells. *J. Virol.* 73, 9555–9567.

61. Mackenzie, J.M., Jones, M.K., Young, P.R., 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220, 232–240. doi:10.1006/viro.1996.0307
62. Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Jones, M.K., Westaway, E.G., 1998. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* 245, 203–215. doi:10.1006/viro.1998.9156
63. Martínez-Barragán, J.J., del Angel, R.M., 2001. Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J. Virol.* 75, 7818–7827.
64. McLean, J.E., Wudzinska, A., Datan, E., Quaglino, D., Zakeri, Z., 2011. Flavivirus NS4A-induced Autophagy Protects Cells against Death and Enhances Virus Replication. *J. Biol. Chem.* 286, 22147–22159. doi:10.1074/jbc.M110.192500
65. Messina, J.P., Brady, O.J., Scott, T.W., Zou, C., Pigott, D.M., Duda, K.A., Bhatt, S., Katzelnick, L., Howes, R.E., Battle, K.E., Simmons, C.P., Hay, S.I., 2014. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 22, 138–146. doi:10.1016/j.tim.2013.12.011
66. Miller, J.L., deWet, B.J.M., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C.M., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Gordon, S., 2008. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathog.* 4. doi:10.1371/journal.ppat.0040017
67. Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., Bartenschlager, R., 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J. Biol. Chem.* 282, 8873–8882. doi:10.1074/jbc.M609919200
68. Miller, S., Krijnse-Locker, J., 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 363–374. doi:10.1038/nrmicro1890
69. Miller, S., Sparacio, S., Bartenschlager, R., 2006. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J. Biol. Chem.* 281, 8854–8863. doi:10.1074/jbc.M512697200
70. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S.C., 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313–319. doi:10.1038/nature02165
71. Montgomery, S.P., Brown, J.A., Kuehnert, M., Smith, T.L., Crall, N., Lanciotti, R.S., Macedo de Oliveira, A., Boo, T., Marfin, A.A., 2003 West Nile Virus Transfusion-Associated Transmission Investigation Team, 2006. Transfusion-associated transmission of West Nile virus, United States 2003 through 2005. *Transfusion (Paris)* 46, 2038–2046. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.01030.x
72. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 13–22. doi:10.1038/nrmicro1067

73. Muñoz-Jordan, J.L., Sánchez-Burgos, G.G., Laurent-Rolle, M., García-Sastre, A., 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14333–14338. doi:10.1073/pnas.2335168100
74. Murray, K., Walker, C., Herrington, E., Lewis, J.A., McCormick, J., Beasley, D.W.C., Tesh, R.B., Fisher-Hoch, S., 2010. Persistent infection with West Nile virus years after initial infection. *J. Infect. Dis.* 201, 2–4. doi:10.1086/648731
75. Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.-L., 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, 723–728. doi:10.1038/sj.embor.embor866
76. Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E., Wileman, T., 2007. A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv. Virus Res.* 70, 101–182. doi:10.1016/S0065-3527(07)70004-0
77. Nimmagadda, S.S., Mahabala, C., Boloor, A., Raghuram, P.M., Nayak U, A., 2014. Atypical Manifestations of Dengue Fever (DF) - Where Do We Stand Today? *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* 8, 71–73. doi:10.7860/JCDR/2014/6885.3960
78. Novoa, R.R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., Risco, C., 2005. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 97, 147–172. doi:10.1042/BC20040058
79. Offerdahl, D.K., Dorward, D.W., Hansen, B.T., Bloom, M.E., 2012. A three-dimensional comparison of tick-borne flavivirus infection in mammalian and tick cell lines. *PloS One* 7, e47912. doi:10.1371/journal.pone.0047912
80. OMS, 2015. OMS [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/> (accessed 9.6.14).
81. Overby, A.K., Popov, V.L., Niedrig, M., Weber, F., 2010. Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles. *J. Virol.* 84, 8470–8483. doi:10.1128/JVI.00176-10
82. Pawaria, A., Mishra, D., Juneja, M., Meena, J., 2014. Atypical manifestations of dengue Fever. *Indian Pediatr.* 51, 495–496.
83. Pealer, L.N., Marfin, A.A., Petersen, L.R., Lanciotti, R.S., Page, P.L., Stramer, S.L., Stobierski, M.G., Signs, K., Newman, B., Kapoor, H., Goodman, J.L., Chamberland, M.E., West Nile Virus Transmission Investigation Team, 2003. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N. Engl. J. Med.* 349, 1236–1245. doi:10.1056/NEJMoa030969
84. Penn, R.G., Guarner, J., Sejvar, J.J., Hartman, H., McComb, R.D., Nevins, D.L., Bhatnagar, J., Zaki, S.R., 2006. Persistent neuroinvasive West Nile virus infection in an immunocompromised patient. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 42, 680–683. doi:10.1086/500216
85. Perera, R., Kuhn, R.J., 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 369–377. doi:10.1016/j.mib.2008.06.004
86. PESKO, K.N., FITZPATRICK, K., RYAN, E.M., SHI, P.-Y., ZHANG, B., LENNON, N.J., NEWMAN, R.M., HENN, M.R., EBEL, G.D., 2012. Internally

- deleted WNV genomes isolated from exotic birds in New Mexico: Function in cells, mosquitoes, and mice. *Virology* 427, 10–17. doi:10.1016/j.virol.2012.01.028
87. Poidinger, M., Coelen, R.J., Mackenzie, J.S., 1991. Persistent infection of Vero cells by the flavivirus Murray Valley encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 3), 573–578.
 88. Pothapregada, S., 2014. Atypical manifestations of dengue Fever. *Indian Pediatr.* 51, 937–938.
 89. Prada-Arismendy, J., Rincón, V., Castellanos, J.E., 2012. Comparative Evaluation of Permissiveness to Dengue Virus Serotype 2 Infection in Primary Rodent Macrophages. *J. Trop. Med.* 2012, e950303. doi:10.1155/2012/950303
 90. Preble, O.T., Youngner, J.S., 1973. Temperature-Sensitive Defect of Mutants Isolated from L Cells Persistently Infected with Newcastle Disease Virus. *J. Virol.* 12, 472–480.
 91. Ravi, V., Desai, A.S., Shenoy, P.K., Satishchandra, P., Chandramuki, A., Gourie-Devi, M., 1993. Persistence of Japanese encephalitis virus in the human nervous system. *J. Med. Virol.* 40, 326–329.
 92. Reyes-Del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F., Del Angel, R.M., 2005. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol.* 79, 4557–4567. doi:10.1128/JVI.79.8.4557-4567.2005
 93. Reyes-del Valle, J., del Angel, R.M., 2004. Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant E protein ligand. *J. Virol. Methods* 116, 95–102.
 94. Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., Strauss, J.H., 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229, 726–733.
 95. Roehrig, J.T., 2003. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv. Virus Res.* 59, 141–175.
 96. Roosendaal, J., Westaway, E.G., Khromykh, A., Mackenzie, J.M., 2006. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J. Virol.* 80, 4623–4632. doi:10.1128/JVI.80.9.4623-4632.2006
 97. Salas-Benito, J.S., del Angel, R.M., 1997. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J. Virol.* 71, 7246–7252.
 98. Salonen, A., Ahola, T., Kääriäinen, L., 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285, 139–173.
 99. Sánchez-Vargas, I., Scott, J.C., Poole-Smith, B.K., Franz, A.W.E., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., Olson, K.E., Blair, C.D., 2009. Dengue Virus Type 2 Infections of *Aedes aegypti* Are Modulated by the Mosquito's RNA Interference Pathway. *PLoS Pathog* 5, e1000299. doi:10.1371/journal.ppat.1000299
 100. Schmaljohn, C., Blair, C.D., 1977. Persistent infection of cultured mammalian cells by Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* 24, 580–589.

101. Sharma, S., Mathur, A., Prakash, V., Kulshreshtha, R., Kumar, R., Chaturvedi, U.C., 1991. Japanese encephalitis virus latency in peripheral blood lymphocytes and recurrence of infection in children. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 85–89.
102. Stiasny, K., Heinz, F.X., 2006. Flavivirus membrane fusion. *J. Gen. Virol.* 87, 2755–2766. doi:10.1099/vir.0.82210-0
103. Takegami, T., Sakamuro, D., Furukawa, T., 1995. Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. *Virus Genes* 9, 105–112.
104. Tassaneeritthep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Bix, D.L., Steinman, R.M., Schlesinger, S., Marovich, M.A., 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 823–829. doi:10.1084/jem.20021840
105. Teo, D., Ng, L.C., Lam, S., 2009. Is dengue a threat to the blood supply? *Transfus. Med. Oxf. Engl.* 19, 66–77. doi:10.1111/j.1365-3148.2009.00916.x
106. Umareddy, I., Chao, A., Sampath, A., Gu, F., Vasudevan, S.G., 2006. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J. Gen. Virol.* 87, 2605–2614. doi:10.1099/vir.0.81844-0
107. Van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., Smit, J.M., 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* 4, e1000244. doi:10.1371/journal.ppat.1000244
108. Villordo, S.M., Filomatori, C.V., Sánchez-Vargas, I., Blair, C.D., Gamarnik, A.V., 2015. Dengue virus RNA structure specialization facilitates host adaptation. *PLoS Pathog.* 11, e1004604. doi:10.1371/journal.ppat.1004604
109. Villordo, S.M., Gamarnik, A.V., 2009. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res.* 139, 230–239. doi:10.1016/j.virusres.2008.07.016
110. Vockerodt, M., Yap, L.-F., Shannon-Lowe, C., Curley, H., Wei, W., Vrzalikova, K., Murray, P.G., 2015. The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *J. Pathol.* 235, 312–322. doi:10.1002/path.4459
111. Von Magnus, P., 1951. Propagation of the Pr8 Strain of Influenza A Virus in Chick Embryos. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 29, 157–181. doi:10.1111/j.1699-0463.1951.tb00114.x
112. Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A.D.T., Watowich, S.J., Gubler, D.J., Weaver, S.C., 2000. Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *J. Virol.* 74, 3227–3234. doi:10.1128/JVI.74.7.3227-3234.2000
113. Weiss, B., Rosenthal, R., Schlesinger, S., 1980. Establishment and maintenance of persistent infection by Sindbis virus in BHK cells. *J. Virol.* 33, 463–474.
114. Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., 2009. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus

- Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe* 5, 365–375. doi:10.1016/j.chom.2009.03.007
115. Westaway, E.G., Mackenzie, J.M., Kenney, M.T., Jones, M.K., Khromykh, A.A., 1997. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J. Virol.* 71, 6650–6661.
 116. White, L.A., 1987. Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 cells to viral infection. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1221–1224.
 117. Wichit, S., Jittmittraphap, A., Hidari, K.I.P.J., Thaisomboonsuk, B., Petmitr, S., Ubol, S., Aoki, C., Itonori, S., Morita, K., Suzuki, T., Suzuki, Y., Jampangern, W., 2011. Dengue virus type 2 recognizes the carbohydrate moiety of neutral glycosphingolipids in mammalian and mosquito cells. *Microbiol. Immunol.* 55, 135–140. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00293.x
 118. Wu, R.-H., Tsai, M.-H., Chao, D.-Y., Yueh, A., 2015. Scanning mutagenesis studies reveal a potential intramolecular interaction within the C-terminal half of dengue virus NS2A involved in viral RNA replication and virus assembly and secretion. *J. Virol.* 89, 4281–4295. doi:10.1128/JVI.03011-14
 119. Xie, X., Gayen, S., Kang, C., Yuan, Z., Shi, P.-Y., 2013. Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. *J. Virol.* 87, 4609–4622. doi:10.1128/JVI.02424-12
 120. Xie, X., Zou, J., Puttikhunt, C., Yuan, Z., Shi, P.-Y., 2015. Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. *J. Virol.* 89, 1298–1313. doi:10.1128/JVI.02882-14
 121. Xi, Z., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 4, e1000098. doi:10.1371/journal.ppat.1000098
 122. Yazi Mendoza, M., Salas-Benito, J.S., Lanz-Mendoza, H., Hernández-Martínez, S., del Angel, R.M., 2002. A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 76–84.
 123. Ye, J., Zhu, B., Fu, Z.F., Chen, H., Cao, S., 2013. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine* 31, 461–471. doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.015
 124. Youngner, J.S., Dubovi, E.J., Quagliana, D.O., Kelly, M., Preble, O.T., 1976. Role of temperature-sensitive mutants in persistent infections initiated with vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 19, 90–101.
 125. Yu, I.-M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., Chen, J., 2008. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 319, 1834–1837. doi:10.1126/science.1153264
 126. Zhang, W., Chipman, P.R., Corver, J., Johnson, P.R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T.S., Strauss, J.H., Rossmann, M.G., Kuhn, R.J., 2003a. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat. Struct. Biol.* 10, 907–912. doi:10.1038/nsb990

127. Zhang, X., Ge, P., Yu, X., Brannan, J.M., Bi, G., Zhang, Q., Schein, S., Zhou, Z.H., 2013. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 105–110. doi:10.1038/nsmb.2463
128. Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P.R., Zhang, W., Pletnev, S.V., Sedlak, D., Baker, T.S., Strauss, J.H., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2003b. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* 22, 2604–2613. doi:10.1093/emboj/cdg270
129. Zhang, Y., Kaufmann, B., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2007. Structure of immature West Nile virus. *J. Virol.* 81, 6141–6145. doi:10.1128/JVI.00037-07
130. Zhou, Z.H., 2014. Structures of viral membrane proteins by high-resolution cryoEM. *Curr. Opin. Virol.* 5, 111–119. doi:10.1016/j.coviro.2014.04.001
131. Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., Bernard, K.A., Shi, P.-Y., Li, H., 2007. Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *J. Virol.* 81, 3891–3903. doi:10.1128/JVI.02704-06
132. Zou, J., Xie, X., Wang, Q.-Y., Dong, H., Lee, M.Y., Kang, C., Yuan, Z., Shi, P.-Y., 2015. Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. *J. Virol.* 89, 3455–3470. doi:10.1128/JVI.03453-14
133. Zybert, I.A., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Smit, J.M., 2008. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J. Gen. Virol.* 89, 3047–3051. doi:10.1099/vir.0.2008/002535-0