



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**EFFECTO DE LA AUTOFAGIA EN LA ACTIVACIÓN DEL  
INFLAMASOMA DURANTE LA INFECCIÓN CON  
EL VIRUS DENGUE**

**T E S I S**

Que Presenta

**Q.B.P. GIOVANI VISOSO CARVAJAL**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directora de tesis

**Dra. LETICIA CEDILLO BARRÓN**

Co-Director de tesis

**Dr. MOISES LEÓN JUAREZ**

CIUDAD DE MEXICO

AGOSTO 2017



DIRECTORA

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Investigadora Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

CO-DIRECTOR

Dr. Moisés León Juárez

Investigador en Ciencias Médicas C del Departamento de Inmunobioquímica

Instituto Nacional de Perinatología

ASESORES

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Investigador Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

Dr. Michael Schnoor

Investigador Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV

Dr. Porfirio Nava Domínguez

Investigador Titular del departamento de Fisiología y Neurociencias

CINVESTAV

## AGRADECIMIENTOS

*La agradezco a CONACYT por otorgarme la beca con el no. 591391 que permitió realizar mis estudios de Maestría en el departamento de Biomedicina Molecular en el CINVESTAV.*

## DEDICATORIA

Con todo mi cariño, admiración y respeto:

A mi familia

Por el apoyo en cada momento importante, a nunca decir no en los momentos que necesito de su ayuda. Les agradezco infinitamente todo lo bueno que me han aportado. Gracias por estar siempre presente. Dedicado a la excelente familia que tuve la fortuna de tener: Humberto Visoso, Tía Guille, Tía Trini, Fer, Lidia, May, Karen, Janni.

A mi mamá:

Rufina Carvajal Pastor. Por todas sus enseñanzas de lucha, a nunca darme por vencido, por muy gris que esté el día, gracias por el amor y dedicación que siempre me diste desde el primer día que llegué a este mundo, nunca podré pagarte el esfuerzo, sacrificio brindado. Este logro es tuyo también

A mi hermana:

Nayeli Visoso Carvajal. Por todo el apoyo incondicional que siempre me ha brindado, este logro no habría sido posible sin tu ayuda. Y por y felicidad que me brindan mis adorados sobrinos Alexia e Iker.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón por la gran oportunidad que me brindó para realizar mi tesis de maestría bajo su dirección y su asesoría. Agradezco toda su paciencia, consejos y confianza.

Al Dr. Moisés León Juárez, por su asesoría en la revisión de esta tesis, por su paciencia y comentarios aportados.

A los doctores Porfirio Nava Domínguez, Nicolás Villegas Sepúlveda y Michael Schnoor por el tiempo empleado para la asesoría y la revisión de estatesis, así como por los valiosos comentarios y aportaciones que dieron forma y estructura a esta tesis.

A nuestro gran auxiliar y amigo, el Dr. Julio Cordero García por el apoyo brindado para la realización de esta tesis, por su increíble paciencia en todo momento, sus conocimientos, sin duda alguna, muchos de los experimentos realizados no hubieran sido posible sin su ayuda.

A mis compañeros y amigos de Laboratorio, el mejor equipo y ambiente de trabajo que pude encontrar. Agradezco el apoyo que me brindaron desde el primer día que llegué, siempre todos muy amables. A Sofi por su amistad y por ayudarme siempre que lo necesité. A Pao Valenzuela por su ayuda y siempre amabilidad, Alfred, Joss, Pao Hernández, Froy por su apoyo en el laboratorio. A luz, una excelente alumna de servicio social, por ser un gran apoyo en la realización de varios experimentos. A Mayra, en quien pude encontrar una buena compañera y amiga, por todos los momentos divertidos.

A Gaurav Shrivastava por su paciencia, por permitirme aprender bajo su tutoría, la realización de esta tesis fue posible gracias a sus consejos aportaciones y conocimientos.

Y por supuesto a mi generación de maestría. Este gran reto y aspiración comenzó con el gran apoyo y asesoría del Dr. Marco Antonio Meraz.

Agradezco infinitamente a mis amigos y compañeros que iniciaron este recorrido conmigo, aprendí tanto de cada uno de ellos, sin duda esta experiencia ha sido de lo más enriquecedora posible.

A Lily Valdovinos, por si increíble amistad, por compartir conmigo sus ganas de superación y triunfo, por los buenos y malos momentos compartidos, por todo el ánimo brindado durante los cursos de maestría, de ti Lily entendí el significado de nunca darse por vencido.

A Pao Briseño por su gran amistad y por su ayuda siempre que la necesité, agradezco infinitamente su gran apoyo brindado desde el curso propedéutico. A Lou, una excelente persona y amiga. Eli, por todos esos momentos divertidos que compartimos, te extrañaré Eli. A Iván Bautista por todo el ánimo brindado.

A todos mis compañeros y amigos muchas gracias por sus consejos, conocimientos, apoyo, palabras de ánimo y por compartir conmigo y culminar esta meta a pesar de todos los obstáculos: Sandy, Keity, Erick, Lau, Rember, Anaïs, Dxine, Rebe, Adri, Selene, Iván Saldívar y Víctor. (este logro también incluye a Ceci, una buena amiga, Vale y Jonathan).

**LO LOGRAMOS**

## INDICE GENERAL

❖ ÍNDICE DE FIGURAS	I
❖ ÍNDICE DE TABLAS	I
❖ ABREVIATURAS	II
❖ RESUMEN	III
❖ ABSTRACT	IV
❖ INTRODUCCIÓN	1
❖ VIRUS DENGUE	1
❖ PROTEÍNAS VIRALES	2
• Proteínas Estructurales	2
• Proteínas No Estructurales	2
❖ CICLO DE REPLICACIÓN	3
❖ AUTOFAGIA	5
❖ ETAPAS DE AUTOFAGIA	7
❖ INFLAMASOMA Y SUS COMPONENTES	11
❖ ACTIVACIÓN	11
❖ AUTOFAGIA E INFLAMASOMA	13
❖ JUSTIFICACIÓN	17
❖ HIPOTESIS	17
❖ OBJETIVOS	18
• Objetivo general	18
• Objetivos particulares	18
❖ MATERIAL Y METODOS	19
• Purificación del virus.	19
• Titulación del virus dengue por ensayo en placa	19
• Ensayo de Western-Blot	20
• Ensayos de inmunofluorescencia.	21



• Plásmido con LC3	21
• Transfección de plásmidos reporteros con LC3	22
• Ensayos de inhibición de autofagia	22
• Ensayos de inhibición del inflammasoma	22
• Detección de IL-1 $\beta$ por ensayo de ELISA	22
❖ RESULTADOS	24
• Evaluación de la infección con DENV-2 y de una infección productiva en células endoteliales HMEC-1.	24
• Procesamiento de la molécula LC3- II en células HMEC-1 infectadas con el DENV-2.	25
• Expresión de Beclina-1 en una cinética de infección con el virus Dengue en células HMEC-1.	30
• EVALUACION DE LA EXPRESION DE PROTEÍNAS DEL INFLAMASOMA EN CÉLULAS HMEC-1 INFECTADAS CON EL VIRUS DENGUE.	31
• Expresión de NLRP3 en una cinética de infección de DENV-2 en células HMEC-1	31
• Análisis del ensamble del inflammasoma en una cinética de infección de DENV-2 en células HMEC-1 a través de la expresión de caspasa 1	32
• Análisis de la activación del inflammasoma en una cinética de infección de DENV-2 en células HMEC-1	33
• Proteínas de autofagia y del inflammasoma presentan una expresión diferencial en etapas tempranas y tardías de la infección con el DENV-2	34
• Efecto de la inhibición del inflammasoma sobre la producción de partículas virales de DENV-2 en células HMEC-1.	35
• Efecto de la inhibición de la autofagia sobre la replicación viral de DENV-2.	36
• Efecto de la inhibición de la autofagia sobre la actividad del inflammasoma.	37
❖ DISCUSION	39
❖ CONCLUSION Y PERSPECTIVAS	45
❖ BIBLIOGRAFIA	46

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo viral del virus Dengue	15
Figura 2.	Etapas de la autofagia	16
Figura 3.	Estructura del inflammasoma NLRP3	22
Figura 4.	La autofagia suprime la activación del inflammasoma NLRP3	25
Figura 5.	Análisis de la infección de células HMEC-1 a diferentes tiempos post-infección con el DENV-2	30
Figura 6.	Análisis de la expresión de LC3-II en una cinética de infección de células HMEC-1 con el DENV-2	31
Figura 7.	Análisis de la expresión de LC3-II de autofagia en células HMEC-1 con el DENV-2.	32
Figura 8.	Análisis del procesamiento de LC3-II en células HMEC-1 en una cinética de infección con el virus DENV-2	34
Figura 9	Análisis de Beclina-1 en células HMEC-1 en una cinética de infección con el virus DENV-2.	36
Figura 10.	Análisis de proteínas del inflammasoma en células HMEC-1 en presencia del DENV-2	37
Figura 11.	Análisis de la activación del inflammasoma en presencia del virus Dengue en células HMEC-1 en una cinética de infección	38
Figura 12	Análisis de la expresión de componentes de autofagia e inflammasoma en presencia del virus Dengue	39
Figura 13.	Análisis de la inhibición del inflammasoma sobre la replicación viral de DENV-2 en células HMEC-1	41
Figura 14.	Efecto de la inhibición de la autofagia sobre la replicación viral de DENV-2 en células HMEC-1 a 36 horas post-infección	42
Figura 15.	Análisis del efecto de la inhibición de la autofagia sobre la actividad del inflammasoma en células HMEC-1 infectadas con el DENV-2.	44

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Familia de la cinasa fosfatidilinositol (PI3K).	18
----------	---	----

## ABREVIATURAS

<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>Atg</b>	Autophagy-Related Genes
<b>FIP200</b>	Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa;
<b>PI3K</b>	PI3P kinase class III
<b>LC3</b>	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
<b>mTor</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>GβL</b>	G protein beta subunit-like
<b>ULK1</b>	unc-51 like autophagy activating kinase 1
<b>PI<sub>3</sub>P</b>	Phosphatidylinositol 3-phosphate
<b>Vps34</b>	Vacuolar protein sorting 34
<b>SNARE</b>	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88
<b>TNFR</b>	Tumor Necrosis Factor Receptor
<b>IL-1β</b>	Interleucina-1 beta
<b>IκB</b>	Inhibidor NF-κB
<b>IKK</b>	Kinasa de IκB
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>HMEC-1</b>	Human Microvascular Endothelial Cell
<b>NLRP3</b>	NLR Family Pyrin Domain Containing 3
<b>ASC</b>	Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD
<b>ATP</b>	Adenosin Trifosfato
<b>VHC</b>	Virus de la hepatitis C
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>p62</b>	Phosphotyrosine-independent ligand for the Lck SH2 domain of 62 kDa

## RESUMEN

El virus Dengue es un miembro de la familia *Flaviviridae*, del género *Flavivirus*, tiene un genoma de RNA de cadena sencilla (ssRNA) de polaridad y es el agente causal de la enfermedad por Dengue. Dentro del género *Flavivirus*, se han descrito distintos miembros capaces de manipular y controlar procesos para su beneficio, tales como ciclo celular, tráfico vesicular, metabolismo y funciones relacionadas con el sistema inmune, como el inflamasoma, autofagia, entre otros. El virus Dengue es capaz de inducir el proceso de autofagia en diversos modelos celulares para favorecer la replicación viral. La autofagia es un proceso catabólico encargado de mantener la homeóstasis en la célula, a través de la degradación y el reciclamiento de componentes celulares. Así mismo, se ha demostrado que DENV-2 también es capaz de activar el inflamasoma, un complejo multiproteico que forma parte de la respuesta inmune. En los últimos años la relación entre la autofagia y el inflamasoma ha sido de gran interés, debido a que se ha evidenciado que la autofagia controla diversos procesos inflamatorios, como la secreción de mediadores inmunes. De la misma manera, la autofagia ha mostrado tener un efecto sobre señales endógenas involucradas en la respuesta inflamatoria. En este trabajo evaluamos el efecto de estos mecanismos bajo el contexto de una infección viral con el DENV-2 en etapas tempranas y tardías de la infección para intentar elucidar el efecto entre ambos fenómenos. La inducción de la autofagia se evaluó a través de los marcadores LC3-II y Beclina-1. Por su parte, la activación inflamasoma a través de componentes del complejo, tales como NLRP3, ASC, caspasa-1 y IL-1 $\beta$ . Se encontró que la autofagia muestra una mayor actividad en las primeras horas post-infección y una disminución en las etapas tardías. En contraste, la actividad del inflamasoma mostró un comportamiento distinto, se encontró una mayor actividad en las etapas tardías post-infección y una menor actividad en los tiempos tempranos de infección. Por otra parte, se demostró que tanto la autofagia como el inflamasoma parecen favorecer la replicación del virus Dengue. Finalmente, se mostró que en ausencia de la autofagia el inflamasoma parece mostrar una mayor actividad, sugiriendo un posible papel de la autofagia sobre el complejo multiproteico.

## ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is a member of the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus* and it causes the disease known as dengue. It possesses a single stranded RNA (ssRNA) genome and is present in 4 serotypes, (DENV 1-4). Among the genus *Flavivirus*, different members have been described to manipulate and control processes for their own benefit, such as cell cycle, vesicular traffic, metabolism and functions related to the immune system, like inflammasome, autophagy, and others. Dengue virus is able to induce the process of autophagy in different cell models to favour viral replication. Autophagy is a catabolic process tasked with maintaining cellular homeostasis through degradation and recycling of cell components. It has been reported that DENV-2 is able to activate inflammasome, a multiprotein complex that is part of the immune response. In recent years, the relation between autophagy and inflammasome has been of great interest, due to the evidence that autophagy controls different inflammatory processes like the secretion of inflammatory mediators. Autophagy has also been shown to have an effect on endogenous signals involved in the inflammatory response. In this work, we evaluated the effect of these mechanisms under the context of a viral infection, namely, DENV-2, in early and late stages of infection to try to elucidate the relation between both events during DENV infection. The induction of autophagy was evaluated through the use of LC3-II and beclin-1 as markers. On the other hand, the activation of the inflammasome was analyzed through the use of markers for components of the complex, such as NLRP3, ASC, caspase-1 and IL-1 $\beta$ . We found that autophagy shows an increase in activity in the first hours post-infection and a decrease in the late stages. In contrast, the inflammasome activity showed a different behavior, as we found higher activity in the late stages and lower activity in the early stages of infection. We show that both, autophagy and inflammasome appear to benefit dengue virus replication. Finally, we show that in the absence of autophagy, inflammasome activity increases, suggesting that DENV-induced autophagy affects the activity of the multiprotein complex.

## I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad por dengue es una de las infecciones virales transmitidas por mosquitos más frecuentes en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Aproximadamente 390 millones de infecciones ocurren a nivel mundial cada año. El agente causal de esta infección es el virus dengue (DENV) del cual han sido descrito 4 serotipos (DENV-1 a DENV-4) siendo *Aedes aegypti* el principal vector transmisor de la infección (OMS, 2016).

De manera general, existen dos formas clínicas de la enfermedad. El dengue clásico el cual se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza frontal, mialgia, artralgia, náuseas, vómitos y erupciones que duran de 3-7 días. El dengue clásico puede progresar a una forma severa, que se caracteriza por manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia, y fuga plasmática, pudiendo ocasionar la muerte del paciente (Mathew, 2008). Los factores que definen las formas severas de la enfermedad son múltiples, desde la coincidencia de una infección secundaria con un serotipo heterólogo, hasta factores que dependen del mosquito, del aislado y del serotipo, entre otros (Wu et al, 2013).

## I. VIRUS DENGUE

El virus Dengue es un miembro de la familia *Flaviviridae*, del género *Flavivirus*, es un virus envuelto de morfología esférica, y con un diámetro de aproximadamente 50 nm. La partícula viral está cubierta por una bicapa lipídica derivada de la célula huésped, y esta a su vez cubierta por la proteína de envoltura (E). En el interior de esta bicapa lipídica se encuentra la nucleoproteína formada por la asociación entre el RNA viral y la proteína de cápside (C).

El genoma viral consiste en una cadena sencilla de RNA polaridad positiva y de un tamaño de 11 kb. Este RNA contiene un solo marco de lectura abierto, además posee dos regiones no traducidas en los extremos 5' y 3'. En el extremo 5' se encuentra un cap de tipo I (m<sup>7</sup>GpppAmp). El 5' UTR de DENV está conformado por aproximadamente 95-101 nucleótidos de longitud. Por otra parte, el extremo 3'UTR

tiene 450 nucleótidos de longitud, este extremo 3' carece de cola poli A y se divide en tres dominios funcionales. Tanto el extremo 5' como 3' son necesarios para la traducción y para la replicación viral. El ORF viral codifica para una sola poliproteína de 3391 aminoácidos que es procesada por proteasas celulares y por la proteasa viral NS2B-3 para dar lugar a tres proteínas estructurales: cápside (C), precursora de membrana (prM) y envoltura (E), las cuales conforman la estructura del virión. Mientras que las siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 están implicadas en el proceso de replicación viral (Egloff et al., 2007).

## **II. PROTEÍNAS VIRALES:**

### **III.I PROTEÍNAS ESTRUCTURALES**

La proteína E es una glicoproteína tiene un tamaño de 50 kDa, es responsable de la interacción del virus con la célula blanco. Esta proteína está formada por tres dominios estructurales y funcionales: un dominio central (EDI), un dominio de dimerización que contiene un péptido de fusión (EDII) y un dominio de unión a receptor (EDIII) (Screaton et al., 2015).

La proteína de cápside (C) es una proteína que tiene un tamaño de 13.5 kDa, es altamente básica e interacciona con el RNA viral para formar la nucleocápside (Aruna, 2014).

La proteína prM es una glicoproteína que posee un tamaño de 26 KDa, se asocia a la proteína E viral, además es fundamental en la maduración de las partículas virales (Idrees, 2015).

### **III.II PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES**

La proteína NS1 es una glicoproteína de aproximadamente 45 kDa con dos sitios de glicosilación conservados entre Flavivirus. Esta proteína está implicada en el proceso de replicación. Una vez sintetizada se transloca al lumen del RE y posteriormente es secretada extracelularmente.

La proteína NS2A es una proteína hidrofóbica transmembranal de ~22 kDa que forma parte del complejo de replicación, además bloquea la señalización de IFN- $\alpha/\beta$ . Recientemente se le ha atribuido un papel probable como una viroporina, proteína viral capaz de formar poros en las membranas de las células infectada (Shrivastava, 2017).

La proteína NS2B tiene un tamaño de 14 kDa, actúa como cofactor de la proteasa viral NS3 formando el complejo NS2A-NS3, además posee una región hidrofóbica que se ancla a la membrana del RE pudiendo actuar como viroporina (León Juárez, 2015). La proteína NS3A es una proteína multifuncional de 618 aa que actúa como una serin-proteasa, RNA helicasa y ATPasa/NTPasa. Para esta función se requiere su asociación con el cofactor NS2B. El complejo NS2B-NS3 actúa rompiendo los enlaces peptídicos entre C-prM, NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A y NS4A-NS5, además de su actividad de helicasa durante la replicación viral. Por otra parte, las proteínas NS4A (16 kDa) y NS4B (27 kDa) son proteínas integrales de membrana. Se ha sugerido que NS4A induce alteraciones importantes en la membrana del RE para la replicación viral Aruna, 2014).

La proteína NS5 es la más grande del DENV de aproximadamente 103 kDa y la más conservada entre los miembros del género flavivirus. Esta proteína juega un papel importante en la replicación viral ya que contiene actividades enzimáticas requeridas para la formación del CAP y para la síntesis del RNA viral. Cuenta con dos dominios funcionales: El amino terminal metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina y en el C-terminal un dominio de polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp) con actividad de RdRp (Bäck-Lundkvist, 2013).

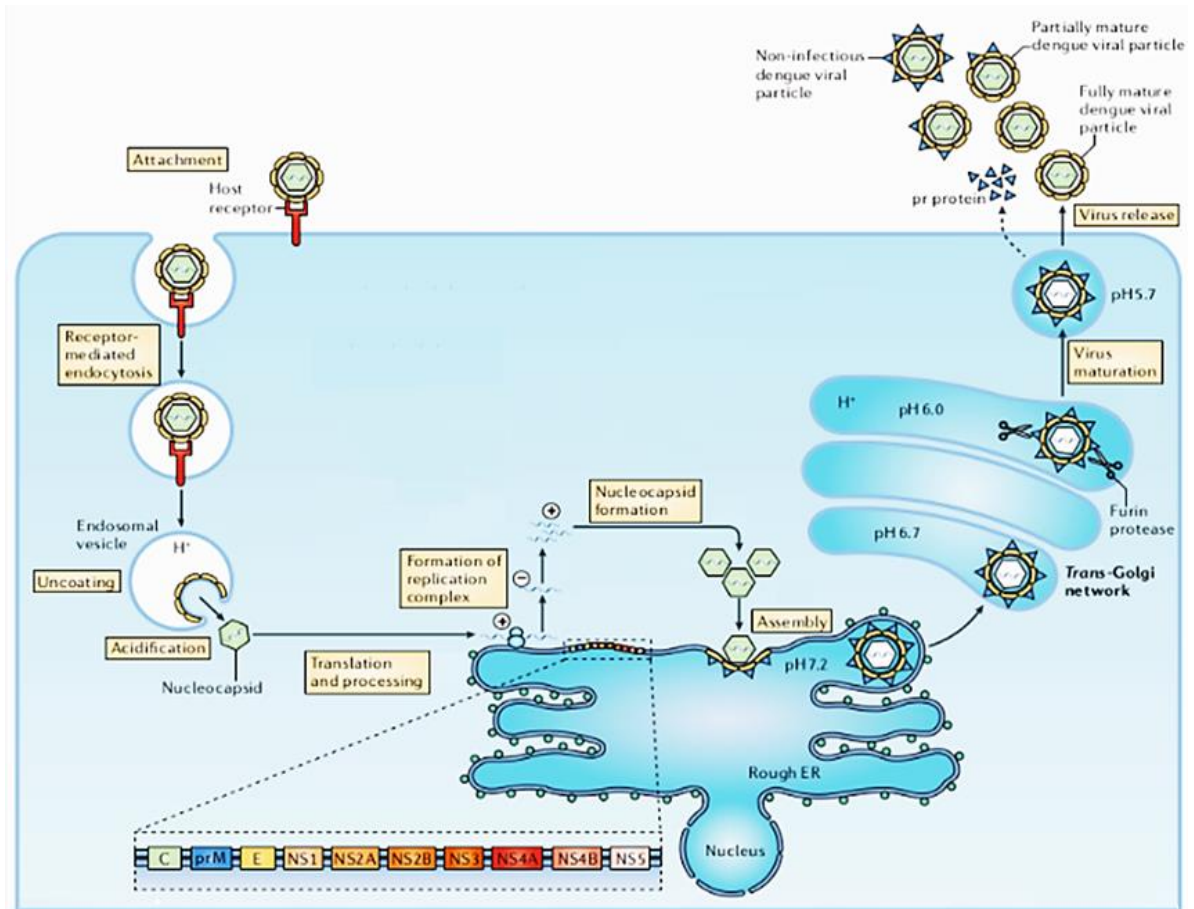
### **III. CICLO DE REPLICACIÓN**

El ciclo de infección comienza, una vez que un mosquito infectado inocula partículas virales en la piel. Se ha descrito que existen diferentes células permisivas a la infección por el virus Dengue, entre ellas los macrófagos, las células dendríticas, los fibroblastos, los hepatocitos y las células epiteliales, endoteliales, entre otras (Whitehead et al., 2007, Bustos Arriaga, 2011, Diamond et al., 2015).



El primer evento del ciclo viral consiste en la interacción entre el dominio III de la proteína E con sus respectivos receptores celulares específicos. Se han descrito varias moléculas del huésped que funcionan como receptores para el virus; entre ellas se encuentran DC-SIGN, heparán sulfato, proteínas de shock térmico (HSP70, HSP90), CD14, etc. La interacción entre el virus-receptor permite el ingreso de la partícula viral a la célula blanco, a través de un mecanismo de endocitosis mediado por receptor (Screaton et al., 2015). Posteriormente, el ambiente ácido del endosoma promueve un cambio conformacional en la proteína E, exponiendo al péptido fusogénico localizado en el dominio II. Esta asa fusogénica favorece la fusión de la membrana endosomal con la membrana viral, promoviendo la disociación de la nucleocápside y la liberación del genoma viral al citoplasma de la célula. El RNA viral funciona como un mensajero y esto permite que se lleva a cabo la traducción, que se da lugar en el retículo endoplásmico (RE) a través de un mecanismo dependiente del cap 5'. El factor de iniciación eucariótico eIF4F reconoce esta región en el genoma viral y recluta al complejo ribosomal para iniciar la traducción de las proteínas virales (Bäck-Lundkvist, 2013).

Una vez sintetizadas las otras proteínas virales, se forman los complejos de replicación viral que se alojan en estructuras de membrana provenientes del RE. La replicación viral inicia cuando la cadena de RNA de polaridad positiva es copiada en una cadena de RNA de polaridad negativa, la cual sirve como un molde para la síntesis de las cadenas de RNA de polaridad positiva, las cuales se asocian con la proteína de cápside y que culmina en la formación de la nucleocápside (Screaton et al., 2015). Ya en el RE se lleva a cabo el ensamble de las nuevas partículas virales y enseguida migran a través de la red de trans-Golgi, donde la proteína preM es escindida por la proteasa celular furina, lo cual permite el reordenamiento de las proteínas M y E en la superficie del virión. Posteriormente, los viriones se secretan por exocitosis y la proteína preM se disocia para producir partículas virales maduras que se caracterizan por presentar una estructura lisa (Screaton et al, 2015, Whitehead).



**Figura 1. Ciclo viral de DENV.** El proceso de replicación viral de DENV comienza cuando un virión se une directamente a través de receptores celulares específicos y subsecuentemente ingresa a la célula blanco. La acidificación de la vesícula endosomal promueve la fusión de la membrana endosomal y la membrana viral, liberando la nucleocápside dentro del citoplasma. Posteriormente se llevan a cabo los procesos de traducción y replicación en el RE. Más tarde ocurre el ensamblaje de las partículas virales, las cuales son transportadas por la red del aparato de Golgi.

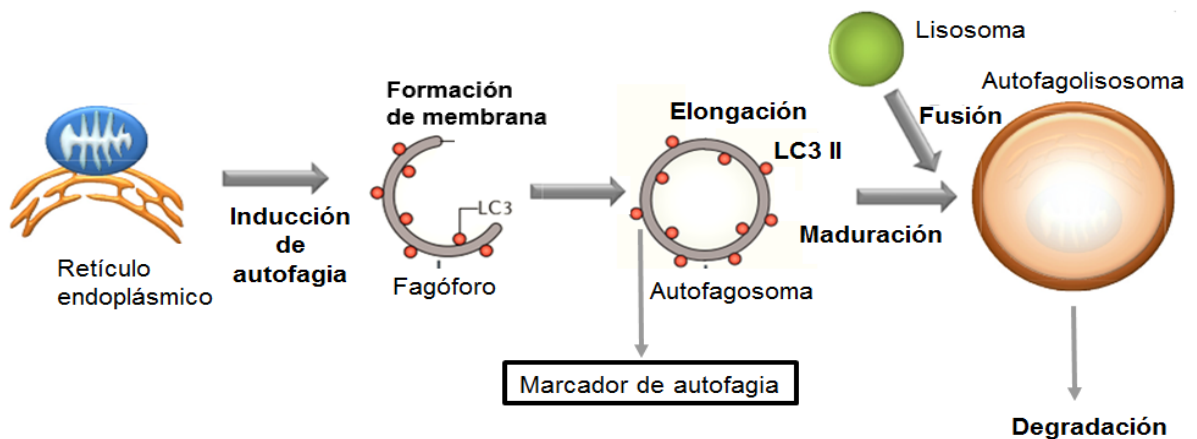
#### IV. AUTOFAGIA

Durante el ciclo de infección del DENV se ha identificado que diversos procesos celulares como la autofagia, entre otros que son manipulados por el virus para ser utilizados en las diferentes etapas del ciclo viral

La autofagia es un proceso catabólico encargado de mantener la homeóstasis celular, a través de la degradación y el reciclamiento de componentes celulares tales como agregados proteicos, proteínas plegadas erróneamente, e inclusive organelos celulares, tales como mitocondrias (Yuk-Jo, 2013). La autofagia es un proceso normal que se lleva a cabo en el citoplasma, sin embargo, puede incrementar por

diversos estímulos asociados a estrés, tales como la privación de nutrientes (principalmente por falta de aminoácidos), hipoxia, estrés oxidativo, así como por la invasión de agentes patógenos, frecuentemente intracelulares, etc. (Yuk-Jo, 2013, Deretic et al., 2013). La autofagia está regulada por una gran variedad de genes relacionados a fenómeno, denominadas proteínas Atg.

Hasta el momento, se han identificado ~40 proteínas Atg, muchas de las cuales están conservadas en levaduras (Jackson et al., 2015). Los complejos proteicos Atg más descritos incluyen al complejo ULK1 y sus reguladores Atg13, FIP200 y Atg101, al complejo PI3K III, conformado por beclina-1 y Atg14 y los sistemas de conjugación de Atg12 y Atg8 importantes para la formación de LC3-II (Mizushima et al., 2011). La autofagia comprende una serie de etapas ordenadas que incluyen: *La formación de novo* de una membrana asociada al RE, el secuestro de componentes citoplasmáticos, empezando por proteínas plegadas erróneamente, agregados proteicos, u organelos celulares, la siguiente etapa consiste en formación de autofagosomas y posteriormente la degradación de moléculas blanco a través en enzimas lisosomales (Weidberg et a., 2011). Estas etapas se ilustran en el siguiente esquema.



**Figura 2. Etapas de autofagia.** Las etapas que comprenden la autofagia inician con la inducción del proceso, la cual está mediada por diversas señales y estímulos como privación de nutrientes o la presencia de agentes patógenos. La formación de la membrana inicial que tiene lugar en sitios de contacto entre el RE-mitocondria. La formación y elongación de la membrana que permite capturar moléculas y material citosólico, posteriormente se da la formación el autofagosoma, una estructura de doble membrana que se fusiona con lisosomas para formar el autofagolisosoma, resultando en la degradación de las moléculas cargo a través de enzimas lisosomales, principalmente proteínas de la familia de las catepsinas.

## V.I ETAPAS DE LA AUTOFAGIA

Las primeras etapas del proceso de autofagia pueden llevarse a cabo a través de un amplio rango de estímulos asociados a estrés celular. La primera etapa está finamente regulada por el complejo mTORC1 (conformado por la serin-treonina cinasa mTOR, y por las proteínas adaptadoras Raptor, GβL y Deptor) el cual también se encarga de regular diversos procesos como ciclo celular, metabolismo, estrés celular, entre otros (Deretic et al 2013).

En condiciones basales, mTOR es capaz de regular negativamente al complejo ULK1, fosforilando dos de sus componentes, Atg13 y ULK1, impidiendo de esta manera su agrupamiento e inhibiendo las señales río abajo que inducen autofagia. Por otro lado, en ausencia de mTOR, el complejo ULK1 es el primero en participar para la formación del autofagosoma (Randall-Denillo, et al 2013). La cinasa ULK1 es capaz de iniciar una serie de fosforilaciones en las proteínas Atg13 y FIP200 (proteína de interacción con cinasas de adhesión focal) promoviendo su ensamblaje (Shi et al., 2012). El siguiente evento río abajo involucra al complejo PI3K III, (conformado por la cinasa PI3K III, beclina-1 y Atg14) el cual se forma inmediatamente ante la presencia del complejo ULK1.

La cinasa PI3K pertenece a una familia de enzimas que catalizan la fosforilación de fosfatidilinositol (PI) en la posición 3 del anillo de inositol, generando fosfatidilinositol 3 fosfato (PI<sub>3</sub>P). La acumulación de PI<sub>3</sub>P genera una plataforma para reclutar proteínas de unión a PI<sub>3</sub>P (Hamasaki et al., 2013, Randall et al., 2013). Las cinasas PI3K se clasifican en tres clases, basado en su distribución subcelular, señales de activación y sustratos específicos. Estas cinasas están compuestas por una subunidad reguladora y una catalítica. Como lo muestra la tabla de abajo (Tabla 1).

PI3K	Sub unidades	Substrato	Activadores
Clase IA	Catalítico (p110 $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ ) Regulatorio (p85 $\alpha$ , $\beta$ , p55 $\gamma$ )	PtdIns (4,5)P <sub>2</sub>	RTKs, Fc $\gamma$ R, Ras
Clase IB	Catalítico (p110 $\gamma$ ) Regulatorio (p101)	PtdIns (4,5)P <sub>2</sub>	GPCRs, Ras
Clase II	Catalítico (PI3K-C2 $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	PtdIns	LPA, receptor de insulina
Clase III	Catalítico (Vps34/hVps34) Regulatorio (Vps15/p150) Accesorio (Vps30/Beclin-1) Accesorio (Vps38/Vps14)	PtdIns	Constitutivo

**Tabla 1. Familia de la cinasa fosfatidilinositol (PI3K).** Se muestran las clases de PI3K, sub unidades, sustratos y las moléculas que se encargan de activar estas cinasas.

Otra proteína que forma parte del complejo PI3K III, es Beclina-1. Esta proteína está involucrada en el proceso de apoptosis ya que interactúa con la proteína Bcl-2, la cual tiene efectos antiapoptóticos (Sun et al., 2009). La interacción entre el complejo Bcl-2-Beclina-1 está mediada a través de un dominio BH3 (Bcl-2 homology 3) de ambas proteínas. Esta proteína juega un papel importante en la inducción de autofagia, ya que cuando se disocia de Bcl-2 es capaz de formar el complejo Beclina-1-Vps34 para continuar con el proceso de inducción. Algunos reportes han indicado que esta proteína es capaz de inducir autofagia de una manera independiente de mTOR, ya que su disociación con el complejo formado con la proteína Bcl-2 es suficiente para inducir la formación del autofagosoma sin requerir la participación del primer complejo arriba, ULK1 (Russel et al., 2012).

El complejo PI3K III se relocaliza en el RE a través de la proteína Atg14, la cual tiene la capacidad de asociarse a membranas del retículo, favoreciendo la acumulación de PI<sub>3</sub>P, y formando las plataformas que reclutan a proteínas de la familia WIP (proteínas que interactúan con PI<sub>3</sub>P) las cuales son importantes para la segunda etapa de la autofagia, en la cual se forma el fagóforo. Esta estructura membranosa formada *de novo* permite la captura de componentes citosólicos y se ha sugerido que se forma en sitios de contacto entre el RE y la mitocondria (Hamasaki-Yoshimori, 2010).

La siguiente etapa de la autofagia consiste en la elongación de la membrana aislada, probablemente a través de la adición de vesículas que permite gradualmente la captura de porciones del citoplasma que contienen a proteínas,

organelos y moléculas blanco de degradación, esta etapa culmina en la formación de una estructura de doble membrana denominada autofagosoma (Cao et al, 2007). Durante este mecanismo intervienen una serie de proteínas Atg que actúan como sistemas de conjugación tipo ubiquitinilación que permiten el procesamiento eficiente de la proteína LC3 (proteína de la cadena ligera 3 asociada a microtúbulo). En la primera reacción se lleva a cabo la formación del complejo Atg16L1-Atg5-Atg12. Previo a esto, el homodímero Atg7 forma un enlace tioéster entre un residuo de cisteína en el sitio activo de Atg7 y la glicina del extremo carboxilo terminal de Atg12, un proceso similar al mecanismo que efectúa una enzima activadora de tipo E1 ubiquitina. El enlace tioéster en el extremo carboxilo terminal de Atg12 se transfiere posteriormente de Atg7 a Atg10 (enzima similar a E2). Posteriormente, la proteína Atg10 cataliza la formación de un enlace isopeptídico que enlaza covalentemente a la proteína Atg5 y Atg12. El segundo sistema se forma para la conjugación de LC3, la cual se sintetiza como una proteína precursora, que inmediatamente es procesada por la serin-proteasa Atg4 eliminando su extremo carboxilo terminal provocando la exposición de una Glicina C-terminal y liberando una forma soluble al citoplasma (LC3-I).

Finalmente, la proteína Atg3 media la modificación lipídica de la proteína LC3-I con un grupo de fosfatidiletanolamina (PE), dando lugar a LC3-II. Esta es la única proteína específica que permanece asociada a la membrana del autofagosoma por lo que ha sido aceptada y ampliamente utilizada como marcador de autofagia (Lee-Iwasaki, 2008).

Las etapas finales de la autofagia comprenden la fusión de los autofagosoma con los endosomas tardíos y lisosomas para formar el autofagolisosoma. Esta etapa está mediada por la translocación de la proteína SNARE y syntaxina-17 a la membrana externa del autofagosoma, esto facilita la fusión de las vesículas y resulta en la acidificación del medio, donde las moléculas que han sido capturadas son degradadas por hidrolasas lisosomales, principalmente proteínas de la familia de las catepsinas (Randall et al, 2013, Gallagher et al, 2016).

Cuando el virus Dengue ingresa a la célula blanco ocurren diversos mecanismos antivirales importantes. El primer evento celular ante la infección viral consiste en la detección del virus a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), incluyendo TLRs, RIG-I-like receptors (RLRs) y receptores tipo NOD (NLRs), los cuales selectivamente se unen a moléculas de RNA provenientes del virus. Los TLRs y receptores de lectina tipo C (CLRs) reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) extracelulares y endosomales, mientras que AIM2 (miembros de la familia IFI200 ausentes en melanoma 2), RLHs (helicasa tipo RIG-I) y los receptores tipo NOD (NLRs) son específicos para PAMPs intracelulares (Chen-Ichinohe, 2015, Latz et al., 2015). La vía de señalización que desencadenan los PRRs son capaces de activar río abajo una serie de moléculas efectoras y proteínas que establecen un estado antiviral para el control de la infección. La presencia del genoma viral promueve la dimerización de TLRs, lo que a su vez induce el reclutamiento de la molécula adaptadora MyD88. El reclutamiento de MyD88 es seguido por el acoplamiento de la cinasa asociada a IL-1R y su adaptador de proteína, el factor 6 asociado a TNFR. La oligomerización de este factor puede activar el complejo cinasa I $\kappa$ B (IKK)<sup>3</sup>, formado por dos subunidades catalíticas, IKK $\alpha$  y IKK $\beta$ , y una subunidad reguladora, IKK. La activación del complejo IKK provoca la fosforilación, ubiquitinación y degradación de I $\kappa$ Bs, lo que resulta en la fosforilación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B, y como consecuencia su translocación al núcleo, donde se une a sus secuencias consenso para activar la transcripción de genes como TNF $\alpha$ , IL-6, las proformas de IL-1 $\beta$ , IL-18, así como NLRP3, una proteína de la familia de los receptores tipo NOD, implicada en la formación del inflamasoma (Kuo et al., 2006).

## **INFLAMASOMA Y SUS COMPONENTES**

El inflamasoma es un complejo multiproteico que participa en la respuesta inmune innata, su activación está mediada por la invasión de agentes patógenos, como agentes virales, fúngicos, protozoarios, agentes ambientales (aluminio presente en las vacunas como adyuvante, sílice, asbesto, cristales de colesterol, uratos, entre

otros), y por componentes intracelulares de respuesta a daño, como especies reactivas de oxígeno (EROS), cristales de ácido úrico, etc. (Chen-Ichinohe, 2015, Yuk-Jo, 2013). La activación del inflamasoma culmina en la maduración y secreción de citocinas pro inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18 (Guo et al., 2015

## **VI.I COMPONENTES DE INFLAMASOMA**

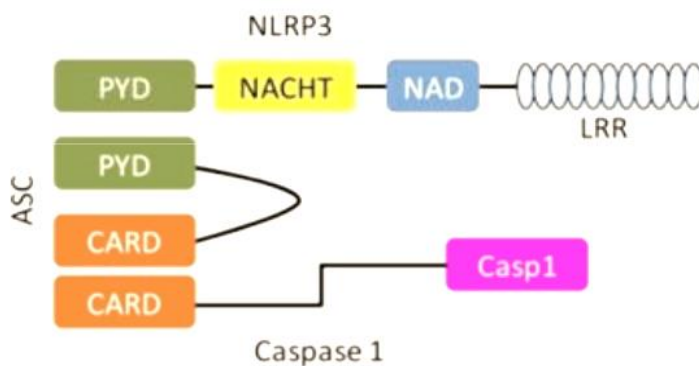
El inflamasoma está formado por la proteína NLRP3, un miembro de la familia NLR; esta molécula está formada por i) un dominio amino terminal efector y de unión (PYR), ii) un dominio central NOD, que es necesario para su oligomerización y unión a nucleótidos, iii), en el extremo carboxilo terminal se encuentra un dominio rico en leucinas que le permite detectar ligandos. Otras componentes que forman parte del complejo incluyen a la proteína adaptadora ASC y la procaspasa-1 (Jo et al., 2015, Abderrazak et al., 2015). El ensamble del complejo está mediado por la interacción entre los dominios PYR de NLRP3 y ASC, para reclutar a la procaspasa-1 a través de su dominio CARD. La estructura del complejo se aprecia mejor en la figura 3. Una vez ensamblado el complejo multiproteico, ocurre el auto procesamiento de la procaspasa-1 para dar lugar a su forma activa, la cual se encarga de procesar a pro IL-1 $\beta$  y pro IL-18 para su maduración. Las citocinas proinflamatorias secretadas participan en la activación de células del sistema inmune, y en la inducción de la infiltración de leucocitos como respuesta al daño generado (Thirumala-Kanneganti, 2010).

## **VI.II ACTIVACIÓN**

La activación del inflamasoma requiere de dos señales, una señal de pre-estimulación o *priming*, en donde, a través de la señalización de TLRs se desencadena la activación de factores de transcripción como NF-kB, que induce la transcripción de NLRP3 y pro-IL-1 $\beta$ . La segunda señal de activación permite el ensamble del complejo multiproteico. Esta señal es generada por el daño ocasionado por los diversos agentes patógenos o bien por moléculas de estrés



celular. Se han descrito 4 señales importantes para la activación del inflamasoma. La primera señal involucra, A) La alta concentración de ATP extracelular que induce la salida de iones potasio a través de canales iónicos P2X7, lo cual permite que más PAMPs y DAMPs entren a la célula a través del receptor purinérgico pannexina-1. B) Debido a que PAMPs y DAMPs pueden ingresar a algunas células por fagocitosis, la ruptura de lisosomas y la subsecuente liberación de componentes lisosomales, especialmente catepsina B pueden participar en la activación del inflamasoma. C) PAMPs y DAMPs son capaces de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) derivadas del complejo I y III mitocondrial, las cuales estimulan la activación del complejo multiproteico. D) La entrada de calcio desde el espacio extracelular y su salida desde reservorios intracelulares como el retículo endoplásmico permiten la activación del inflamasoma. Además, recientemente se ha demostrado que diversas moléculas conocidas como viroporinas, codificadas de diversos virus como DENV, influenza, HVC, etc, son capaces de inducir la movilización de iones almacenados en componentes intracelulares hacia el citosol para activar inflamasoma (Latz, et al., 2013, Lupfer-Kanneganti, 2014).



**Figura 3. Estructura del inflamasoma NLRP3.**

El inflamasoma es una plataforma formada por la proteína NLRP3, un miembro de la familia NLR, que tiene varios dominios, en el extremo amino posee un dominio efector y de unión (PYD), además, posee un dominio de oligomerización y de unión a nucleótidos (NATCH). En el extremo carboxilo terminal tiene un dominio rico en leucinas que le permite detectar ligandos. Los otros miembros del complejo incluyen a la proteína ASC (proteína de asociación a apoptosis) y la procaspasa-1. El ensamble del complejo está mediado por la interacción entre los dominios PYR de NLRP3 y ASC, para reclutar a la procaspasa-1 a través de su dominio CARD.

## V. AUTOFAGIA E INFLAMASOMA

El inflammasoma y la autofagia son dos fenómenos que la célula emplea para mantener la homeóstasis, tanto por la eliminación de agentes extraños y componentes celulares, así como para la regulación de la respuesta inflamatoria ante la invasión de un agente patógeno.

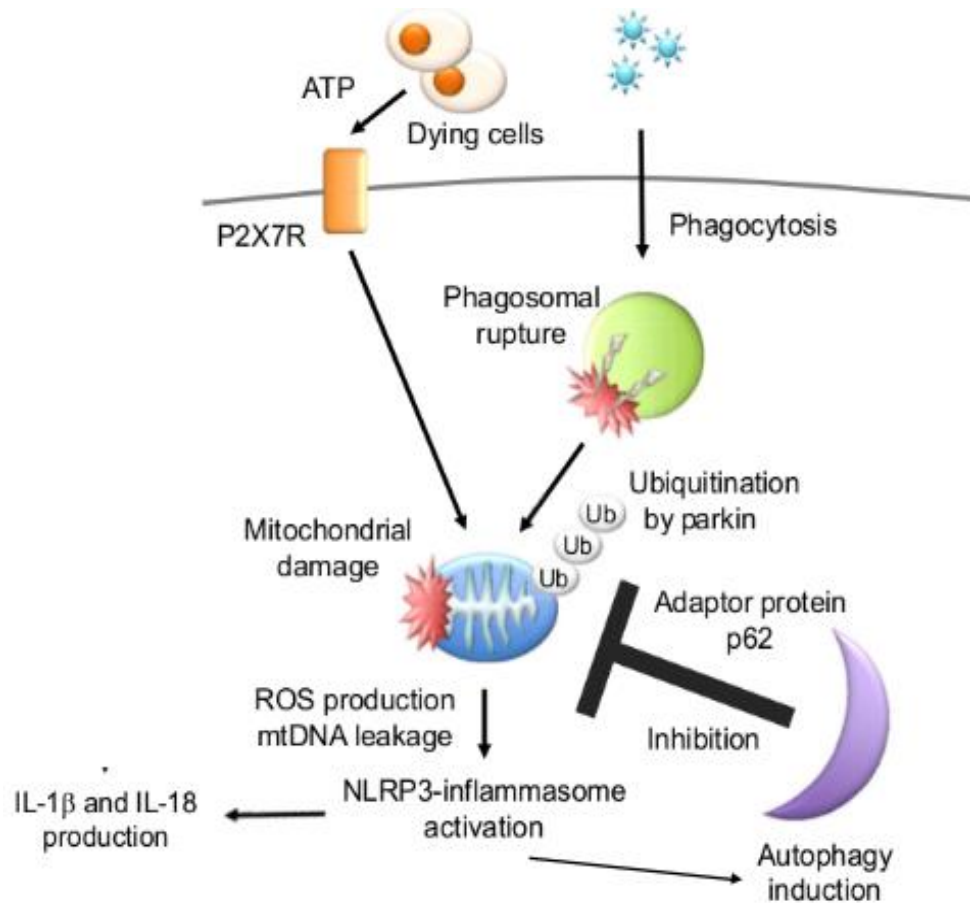
Recientemente se ha descrito la autofagia posee un papel regulador importante sobre la actividad del inflammasoma. Se ha sugerido que un defecto en la autofagia, causada por mutaciones en genes de proteínas Atg (Atg16L), causa una actividad anormal del inflammasoma, presentando altos niveles de IL-1 $\beta$ , provocando un daño tisular severo (Hampe et al, 2007). Ambos mecanismos han sido descritos en infecciones virales.

Se ha demostrado *in vitro*, que la infección por DENV es capaz de inducir la activación del inflammasoma en diversas líneas celulares, entre ellas macrófagos, y por otro lado, también en plaquetas (Wu et al, 2012; Hottz et al, 2013). En experimentos realizados en nuestro laboratorio, se ha demostrado que DENV-2 es capaz de inducir la activación del inflammasoma en una línea celular endotelial. Células HMEC-1 infectadas con DENV-2 mostraron una alta expresión de NLRP3 a las 36 y 48 horas post-infección en comparación con células sin infectar y aquellas células tratadas con el virus inactivo. También se evaluó la activación del inflammasoma a través de la cuantificación de caspasa-1 e IL-1 $\beta$ , mostrando una mayor concentración a las 24 horas y 36 horas post-infección (Shrivastava et al, 2016, manuscrito en preparación).

Se ha demostrado que la infección por DENV es capaz de inducir la activación de la autofagia. Células de hepatocarcinoma y fibroblastos embrionicos murinos transfectadas con GFP-LC3 e infectadas con DENV, mostraron un incremento de la forma LC3-II, en comparación con las células sin infectar. Cuando se evaluó el título viral de células infectadas con DENV, se demostró que la autofagia inducida por el virus favorece la replicación viral. Por lo que la inhibición de la autofagia disminuye considerablemente el título viral (Lee et al 2008).

Se ha sugerido un papel importante de la autofagia sobre la actividad del inflammasoma, debido a que la inhibición de la autofagia provoca un incremento de actividad inflamatoria, principalmente por el aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ . Recientemente algunos grupos de trabajo han corroborado este hecho. Se ha sugerido que la autofagia es capaz de controlar la activación del inflammasoma, a través de la degradación de las formas inmaduras de IL-1 $\beta$ , comprobando que la inhibición de la autofagia promueve el procesamiento de esta citocina (Harris et al., 2010).

El siguiente esquema describe de manera indirecta un papel de regulador negativo de la autofagia sobre el inflammasoma. Se ha descrito que partículas ambientales como uratos, cristales de colesterol, así como agentes patógenos, son capaces de generar daño a nivel mitocondrial, provocando la generación de ROS, lo cual a su vez es capaz de activar el inflammasoma. Por otra parte, se demostró que la E3 ligasa de ubiquitina parkina, induce la ubiquitinación de un conjunto de proteínas expresadas en mitocondrias dañadas, las cuales a su vez pueden ser detectadas por la proteína adaptadora p62, la cual posee un dominio de unión a LC3, promoviendo de esta manera la inducción de autofagia, favoreciendo de esta manera la eliminación selectiva de mitocondrias dañadas. Por lo tanto, la degradación de una fuente importante de ROS como las mitocondrias por parte de la autofagia ha sido sugerida como una manera indirecta de suprimir la activación del inflammasoma (Saitoh-Akira, 2016).



**FIG 4. La autofagia suprime la activación del inflammasoma NLRP3.** Diversas moléculas y agentes patógenos son capaces de inducir ruptura fagosomal, provocando daño mitocondrial. La liberación de ATP proveniente de células dañadas estimula el canal iónico P2X7R y causa daño mitocondrial, provocando la liberación de EROS y DNA mitocondrial, causando activación del inflammasoma. Parkina, una E3 ubiquitin ligasa induce ubiquitinación de proteínas expresadas en mitocondrias dañadas. La autofagia de manera selectiva elimina mitocondrias dañadas después de reconocer proteínas ubiquitinadas por el adaptador p62. La autofagia suprime la activación del inflammasoma a través de la eliminación de mitocondrias dañadas, lo cual previene exceso en la producción de EROS y mtDNA.

Por otro lado, es bien descrito que la autofagia se induce en condiciones normales fisiológicas, sin embargo, se ha descrito que este mecanismo puede incrementar en condiciones de estrés celular como privación de nutrientes, señales proinflamatorias e inclusive bajo infecciones bacterianas y virales (Deretic-Levine, 2009).

Shi et al., 2012 reportaron que, en macrófagos, la inducción del inflammasoma desencadena la activación de la autofagia, la cual depende específicamente de la presencia de la proteína NLRP3. A la par se demostró la colocalización de ASC con

el adaptador autofágico p62, quien posee un dominio de unión a LC3 y es capaz de mandar a degradación aquellas moléculas que reconozca, por lo que este evento de ubiquitinación podría sugerir un mecanismo de regulación negativa directa por parte de la autofagia sobre el inflammasoma.

## **VI. JUSTIFICACIÓN**

Se ha demostrado que la infección por DENV activa los procesos de autofagia e inflammasoma, sin embargo, existe poca evidencia sobre el efecto de una infección viral en la actividad de estos procesos. Recientemente, diversos modelos han propuesto que la autofagia puede degradar algunos de los componentes del inflammasoma. Lo anterior ha sugerido un papel importante de la autofagia sobre la actividad del inflammasoma, debido a que la inhibición de la autofagia provoca un incremento de actividad inflamatoria, principalmente por el aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias.

Dado que ambos eventos han sido descritos durante la infección con dengue, es importante analizar si la autofagia inducida por DENV altera la actividad del inflammasoma, así como valorar la repercusión en términos de replicación viral.

## **VII. HIPOTESIS**

La autofagia afecta la actividad del inflammasoma y favorece la replicación viral en células HMEC-1 infectadas con el virus DENV-2.

## **VIII. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la autofagia inducida por el virus DENGUE en la activación del inflammasoma en células HMEC-1.

## **IX. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.** Caracterizar la expresión de componentes de la autofagia (LC3-II, beclin-1) e inflammasoma (casp-1 e IL-1 $\beta$ ) en células HMEC-1 infectadas con el virus DENV-2 a diferentes tiempos de infección.
- 2.** Evaluar el efecto de la inhibición de la autofagia en la activación del inflammasoma (IL-1 $\beta$ , casp-1, NLRP3) en una cinética de infección de células HMEC-1 con el virus DENV-2.
- 3.** Evaluar el efecto de la inhibición del inflammasoma sobre la autofagia (Beclina-1, LC3-II, y título viral) en una cinética de infección de células HMEC-1 con el virus DENV-2.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **PURIFICACIÓN DEL VIRUS.**

Se prepararon abastos virales del serotipo 2 del virus dengue. Los virus se propagaron en la línea celular C6/36 proveniente de la larva de *Aedes albopictus*, para ello se siembran 6 botellas de C6/36. Las células se crecieron a 36°C sin ambiente de CO<sub>2</sub>. Se utilizó medio mínimo esencial (MEM, GIBCO), suplementado con suero fetal bovino (SFB, GIBCO) al 10%, vitaminas, antibiótico, aminoácidos, L-glutamina y piruvato (todos de GIBCO), 100 unidades/ml de cada uno y 10 unidades/ml de tylosina. Una vez que el efecto citopático es evidenciado por la formación de sincisios del 70%, se recuperaron los sobrenadantes de las botellas (las células fueron desechadas) y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4°C. Las células fueron recuperadas en un tubo Falcon de 50 mL y se concentraron aproximadamente 10 veces con una columna de 100 kDa de cutoff Amicon Ultra 15 (UFC910024) Merck Millipore, posteriormente, se filtraron con una pirinola de 0.22 µm. Se adicionó 1/10 del volumen de SPG y finalmente se alicuotaron e inmediatamente se colocaron en hielo seco. Las alícuotas se almacenaron a -70°.

### **MÉTODO DE TITULACIÓN DEL VIRUS DENGUE POR ENSAYO EN PLACA**

Para la titulación de DENV-2 se utilizaron células Vero. Estas células fueron crecidas en medio RMPI suplementado con SFB al 10%, antibiótico, vitaminas, aminoácidos, L-glutamina y piruvato, 100 unidades/ml de cada uno a 37°C en un ambiente al 5% de CO<sub>2</sub>. Se prepararon tubos Eppendorf estériles; se marcaron desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> y se colocaron en hielo. En condiciones de esterilidad se adicionaron 225 µl de medio Hanks (GIBCO) a cada tubo y se mantuvo en hielo. El virus se descongeló directamente de -70°C a 4°C y se colocó en hielo. Fueron transferidos 25 µl del inóculo al primer tubo y se mezclaron vigorosamente en el agitador. Posteriormente, con una punta nueva se añadieron 25 µl de esta dilución al siguiente tubo y así sucesivamente hasta completar 6 diluciones. El ensayo se realizó por triplicado. Se sembraron 100,000 células por pozo en placas de 24 pozos, donde cada pozo fue inoculado con 100 µl de las diferentes diluciones del virus; como controles se utilizaron células no infectadas y células a las que se les adicionó el virus sin diluir.



Se incubaron por 1 h a 37°C en una atmósfera de humedad al 5% de CO<sub>2</sub> y después de este tiempo se añadieron 500 µl/pozo de medio Overlay (medio MEM 2X (GIBCO) suplementado con L-glutamina a 2 nM, suero fetal bovino al 10%, 100 unidades/ml de antibiótico, carboximetilcelulosa (CMC de SIGMA) al 3% estéril. Finalmente, las células fueron incubadas a 37°C durante 5 días.

Al término de la incubación se decantó el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, se adicionaron 500 µl de metanol al 80% y se dejaron incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas una vez más con PBS 1X, se adicionó 1 ml de PBS-Leche (SIN Tween) al 5% para y se dejó incubando 20 min a temperatura ambiente sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se decantó la solución bloqueadora y las células se lavaron con PBS 1X. Se adicionaron 200 µl de anticuerpo primario (4G2 1:2000) disuelto en PBS-Leche (SIN Tween) al 5% y se incubó 1 hora a 37°C en agitación. Después se lavaron 1 vez con 1 ml de PBS-leche y adicionaron 200 µl por pozo de anticuerpo secundario y se incubó 1 hora en agitación a 37°C. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se decantó la placa y dejó secando 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se adicionaron 180 µl de True Blue por pozo y se incubaron 10 min a TA sin agitación y se procedió a contar las placas. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$(\text{Log}) (\text{Promedio de placas} \times 10^{x+1})$$

#### ENSAYO DE WESTERN-BLOT.

Células HMEC-1 con una confluencia del 80% se infectaron con DENV-2 a una MOI de 5. Se realizaron cinéticas de infección de 3, 6, 12, 24, y 36 horas. Como control se utilizaron células HMEC-1 sin infectar y tratadas con virus inactivado por calor. Después las células se lisaron con buffer RIPA (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 2% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 0.6 M KCl, 5 mM EDTA) en presencia de inhibidor de proteasas (Complete, Invitrogen). Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE cargando 30 µg/µl por pozo y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD), las cuales se bloquearon con PBS-Tween- leche al 5%

durante una hora y después se lavaron cuatro veces con PBS- Tween. Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante una toda la noche a 4°C. Después, las membranas se lavaron de nuevo y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado a HRP (Invitrogen) durante una hora. Después de otra ronda de 4 lavados, las membranas se revelaron en presencia del reactivo de revelado (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, a través del equipo ChemiDoc (BIO-RAD).

#### ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.

Se sembraron 100 000 células HMEC-1 por pozo en placas de 24 pozos. Cada pozo contiene un cubreobjetos. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C en un ambiente de humedad al 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se infectaron a una multiplicidad de 5 con virus purificado. Como control se utilizaron células HMEC-1 sin infectar o tratadas con virus inactivado por calor. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA, SIGMA) al 4% en PBS 1X durante 20 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se permeabilizaron con PBS 1X+Tritón al 0.1% + gelatina al 0.02% durante 30 minutos. Se bloquearon las monocapas con solución PBS 1x + Tritón 0.1% + suero de cabra (10%) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se dejaron en presencia de los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 4 veces con PBS 1X-Tritón 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos utilizando 3 µl Vecta Shield H-1200 con DAPI (Vector) y se analizaron en un microscopio confocal espectral Leica (Leica TCS SP5).

#### PLÁSMIDOS CON LC3

Se utilizó el plásmido GFP-LC3. Es un plásmido de expresión eucariota que codifica para la proteína verde fluorescente fusionada a LC3. La proteína de fusión está bajo el promotor temprano inmediato de CMV.

## TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS REPORTEROS CON LC3-II

Un día previo a la transfección se cultivaron células HMEC-1 en placas de 96 pozos. Posteriormente en un tubo eppendorf (1), se agregaron 99 uL de medio optimen más 1 µg del plásmido reportero con LC3-II (GFP-LC3) y en otro tubo (2) se agregaron 99 µL de medio optimen más 1 µL de lipofectamina 2000, se dejó incubando durante 5 minutos. Después se mezcló el contenido de ambos tubos, el contenido del tubo 1 se agregó al tubo 2 y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Durante los 30 minutos de incubación, se retiró el medio de cultivo de la placa y lavó con PBS 1X dos veces. Pasados los 30 minutos de incubación, se agregaron los 200 µL de la mezcla a la placa y se agitó la placa suavemente para homogenizar. Finalmente se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 4-6 horas. Se lavaron las células con PBS 1X y se agregó 5 mL de medio base RPMI más 2% de suero.

## ENSAYOS DE INHIBICION DE AUTOFAGIA

Células HMEC-1 se incubaron durante 24 horas a 37°C en un ambiente de humedad al 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 80-90%, posteriormente se trataron con el inhibidor wortmanina a una concentración de 100 mM durante 1 hora. Enseguida las células fueron infectadas a una multiplicidad de 5 con DENV-2 por dos horas en presencia de la wortmanina. Finalmente, las células se lavaron con PBS 1X y se les adicionó medio nuevo. Se realizó una cinética de infección de 3, 6, 12, 24, y 36 horas. Como control se utilizaron células HMEC-1 sin infectar o tratadas con virus inactivado por calor. Las células se lisaron con buffer RIPA (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 2% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 0.6 M KCl, 5 mM EDTA) en presencia de inhibidor de proteasas (Complete, Invitrogen) y se realizó el análisis por Western Blot.

## ENSAYOS DE INHIBICION DEL INFLAMASOMA.

Células HMEC-1 se incubaron durante 24 horas a 37°C en un ambiente de humedad al 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 80-90%, posteriormente las células fueron tratadas con LPS (1µg/mL) por 6 horas, pasado ese tiempo, se realizaron 2

lavados con PBS 1X y se trataron con 100  $\mu$ M del inhibidor glybenclamida por 1 hora, posteriormente las células fueron infectadas a 5 MOI con DENV-2 por dos horas en presencia del inhibidor, finalmente las células se lavaron con PBS 1X y se les adicionó medio nuevo. Las células se lisaron con buffer RIPA (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 2% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 0.6 M KCl, 5 mM EDTA) en presencia de inhibidor de proteasas (Complete, Invitrogen) y se realizó el análisis por Western Blot.

#### DETECCIÓN DE IL-1 $\beta$ POR ENSAYO DE ELISA

Para la confirmación de la presencia de IL-1 $\beta$ , se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos que fueron sensibilizadas con 6 ng/pozo de anticuerpo anti IL-1 $\beta$ , utilizando buffer de carbonatos (pH 9.6) por 2 horas. Las placas fueron bloqueadas con leche baja en grasas al 5% disuelta en PBS. Los sobrenadantes recuperados de los cultivos infectado a evaluar se utilizaron a diluciones 1:50-1:100 y la detección de complejos será observada utilizando un anticuerpo secundario conjugado a HRP, utilizando como sustrato peróxido de hidrógeno, y ácido sulfúrico 2N para frenar la reacción.

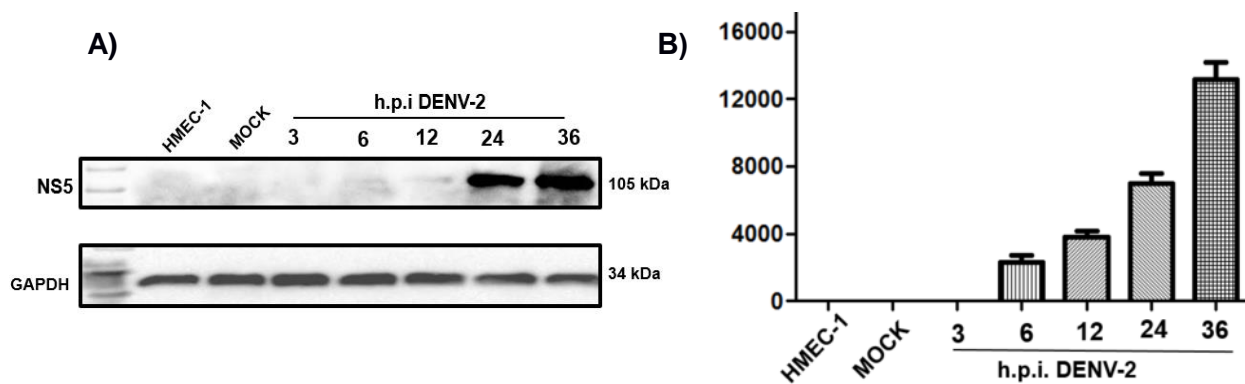
## RESULTADOS

### **Evaluación de la infección con DENV-2 y de una infección productiva en células endoteliales HMEC-1.**

Antes de evaluar el efecto entre los dos fenómenos, autofagia y activación del inflammasoma en etapas tempranas y etapas tardías de la infección fue necesario caracterizar el modelo de trabajo.

El primer evento que se evaluó fue la infección por el virus en células endoteliales. Las células HMEC-1, se infectaron con DENV-2 a 5 MOI. La infección se evaluó en una cinética desde las 3, 6, 12, 24 y 36 horas post-infección (h.p.i). Para ello, se comprobó la presencia de (una proteína estructural, que sugiere la infección), la polimerasa viral dependiente de RNA (NS5), así como la presencia de partículas virales competentes a través de un ensayo de titulación en placa. La figura 5A muestra las células HMEC-1 infectadas con DENV-2. Donde se observa a las 12 horas post-infección la presencia de una banda tenue de aproximadamente 105 kDa que corresponde a la proteína NS5, mientras que a las 24 y 36 horas se observó un mayor enriquecimiento de NS5. No se observó la presencia de la proteína viral en las células que no se infectaron o en las células que fueron falsamente infectadas con el virus inactivado con luz UV (mock).

Para reforzar el resultado anterior, se evaluó la infección productiva de esta cinética, tomando los sobrenadantes a los tiempos ya señalados. La figura 5B muestra el ensayo de titulación en placa de los sobrenadantes y la producción de partículas viables en la cinética de infección. Se empieza a observar la infección a partir de las 6 h.p.i, y se muestra una mayor producción viral en una manera dependiente del tiempo de infección, mostrando un pico máximo a las 36 h.p.i.



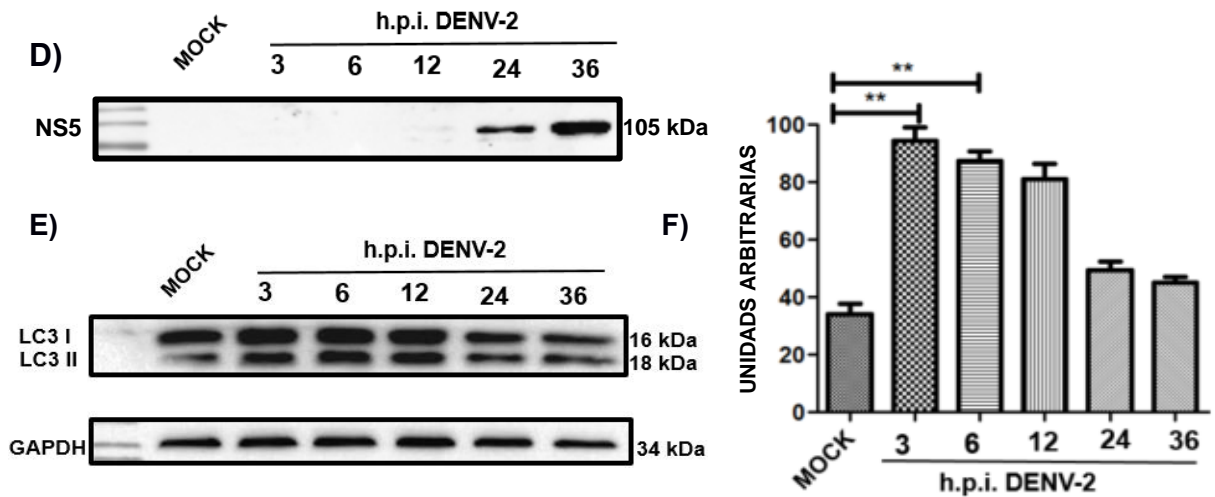
**Figura 5.** Análisis de la infección de células HMEC-1 a diferentes tiempos post-infección con el DENV-2. **A)** Western Blot de NS5 en una cinética de infección desde las 3, 6, 12, 24 y 36 horas en células HMEC-1 infectadas con el DENV-2 a 5 MOI o tratadas con el virus inactivo (mock). **B)** Titulación en placa de una cinética de infección de células HMEC-1 con DENV-2 a diferentes tiempos de infección.

### Procesamiento de la molécula LC3- II en células HMEC-1 infectadas con el DENV-2.

Las proteínas Atg juegan un papel muy importante en la inducción de la autofagia. LC3 es una proteína fundamental para este proceso. Debido a que es la única proteína Atg que se mantiene anclada de manera muy temprana a los autofagosomas, esta molécula es utilizada ampliamente como marcador de autofagia.

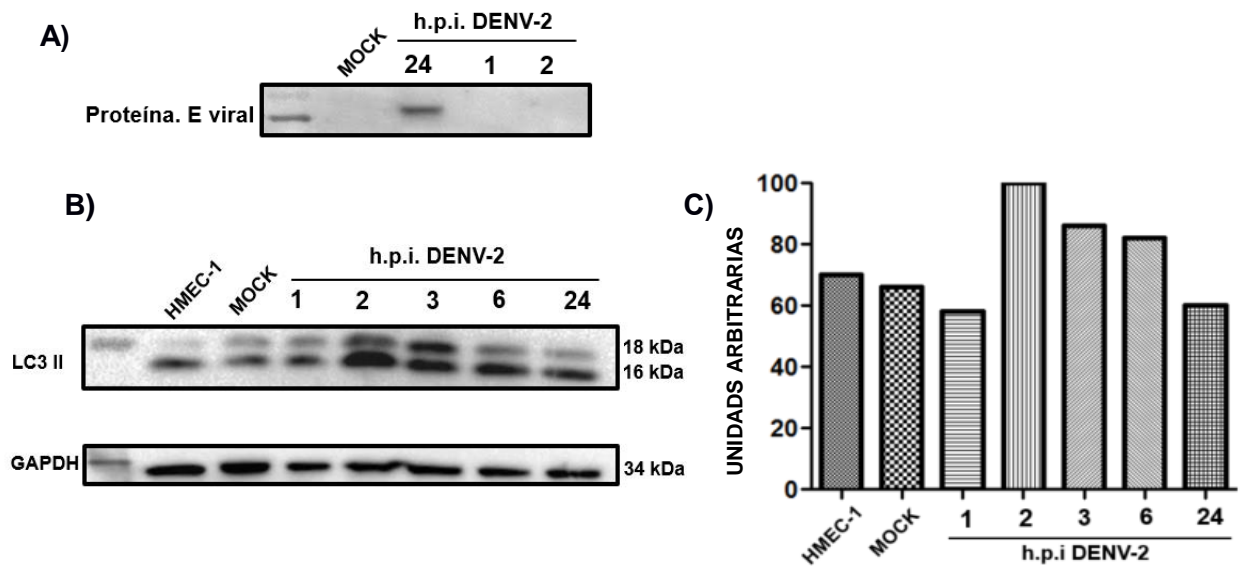
Para poder evaluar la expresión de la forma procesada de la proteína LC3. Las células HMEC-1 fueron infectadas con DENV-2 a 5 MOI como se corrobora en la figura 6A. Así mismo, se analizó mediante Western Blot la forma modificada lipídicamente que corresponde a la banda de 16 kDa y que está relacionada con la inducción de autofagia.

Se evaluó la expresión de esta proteína desde las 3 hasta las 36 horas post-infección, como observa en la figura 6B. Un análisis semicuantitativo se presenta en la figura 6C, donde se observa un incremento en la presencia de la forma LC3-II en las etapas tempranas post-infección (3, 6 y 12 horas). Por el contrario, se muestra una disminución en las etapas tardías de la infección.



**Figura 6.** Análisis de la expresión de proteínas de autofagia en una cinética de infección de células HMEC-1 con el DENV-2. **A)** Western Blot de NS5 en una cinética de infección desde las 3, 6, 12, 24 y 36 horas en células HMEC-1 infectadas con el DENV-2 a 5 MOI o tratadas con el virus inactivo (mock). **B)** Western Blot de LC3-II en una cinética de infección con DENV-2 (3, 6, 12, 24 y 36 h.p.i.) **C)** Análisis densitométrico del WB correspondiente a LC3-II. \* valor significativo  $p < 0.05$ .

Dado que la autofagia inducida por el DENV-2 mostró una actividad incrementada desde los primeros tiempos analizados, decidimos evaluar desde tiempos más cortos post-infección. Células HMEC-1 fueron infectadas a 5 MOI durante 30 minutos, 1 hora, 2 y 24 horas. Desafortunadamente no pudimos obtener una concentración de proteína suficiente a los 30 minutos para realizar el análisis correspondiente. Para corroborar la infección de los tiempos ya mencionados previamente, se evaluó la presencia de la proteína viral E, como se observa en la figura 7A, donde se observa a las 24 horas post-infección a la proteína E, no así en los tiempos más cortos debido a que no es posible evidenciar a la proteína viral a tiempos tan cortos de infección. La figura 6B muestra el Western Blot de la proteína LC3-II desde una hora post-infección. El análisis semicuantitativo se presenta en la figura 7C, donde se muestra que desde la primera hora post-infección ya puede observarse un incremento considerable de la forma LC3-II.



**Figura 7.** Análisis de la expresión de proteínas de autofagia en células HMEC-1 con el DENV-2. **A)** Western Blot de la proteína viral E en células HMEC-1 infectadas con el virus DENV-2 a 5 MOI (1, 2, 24 h.p.i.) **B)** Western Blot de LC3-II en una cinética de infección con DENV-2. **C)** Análisis densitométrico del WB correspondiente a LC3-II (1, 2, 3, 6, 24 h.p.i.).

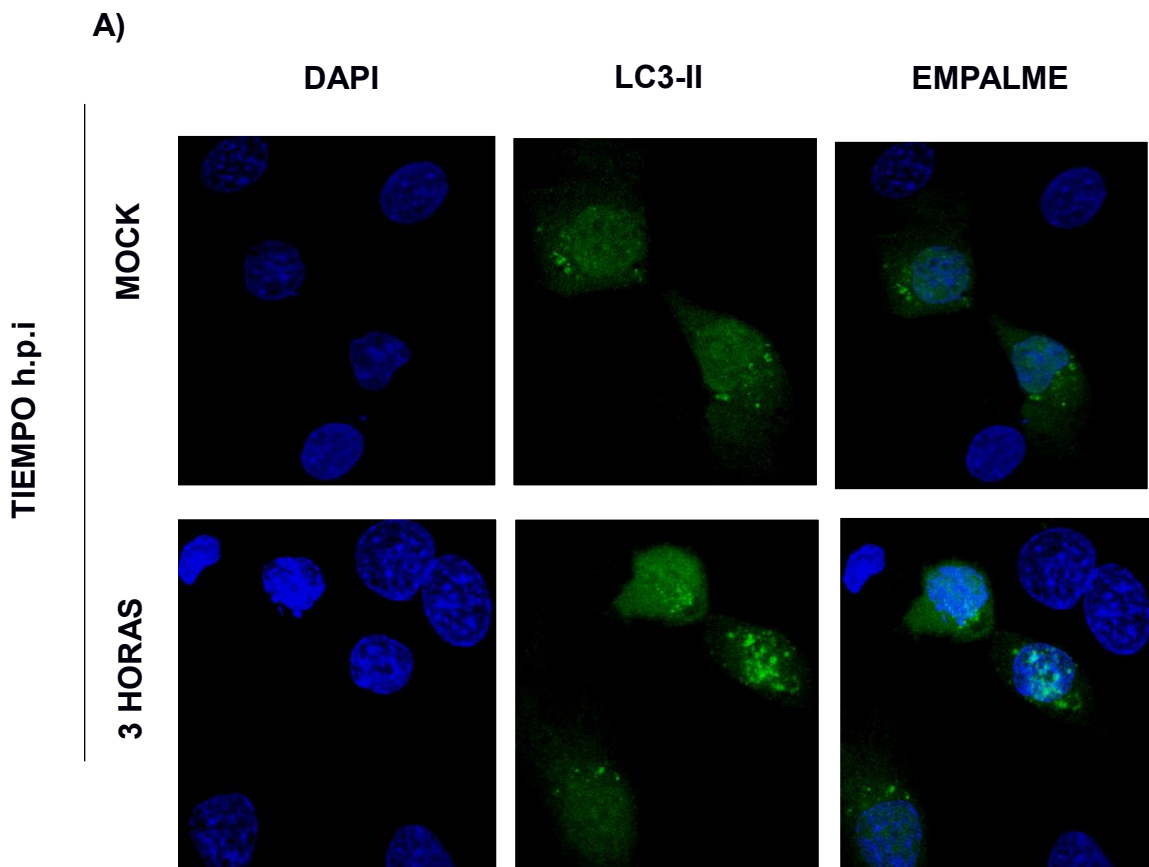
Con la finalidad de corroborar el resultado anterior, se analizó la distribución de la forma LC3-II por medio de microscopía. Para esto se transfectaron las células HMEC-1 con el plásmido GPG-LC3 y 16 horas post-transfección se infectaron con el DENV-2 a 5 MOI. Es muy importante saber si la célula que está infectada es en la que se activa la autofagia, sin embargo, este dato por el momento no es posible, ya que, dado que la activación de la autofagia es muy temprana, no es posible ver la expresión de la proteína de envoltura a tiempos tan cortos de infección por microscopía de fluorescencia. Sin embargo, podemos evidenciar infección productiva en el modelo de HMEC-1 a través del ensayo de titulación en placa de los sobrenadantes correspondientes a las células que fueron teñidas para evaluar la distribución de LC3-II.

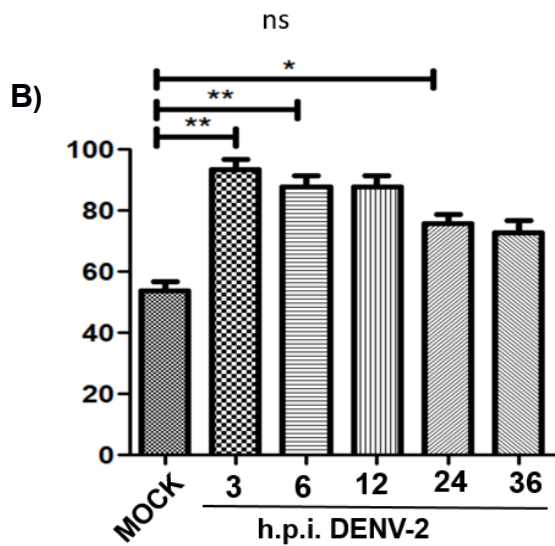
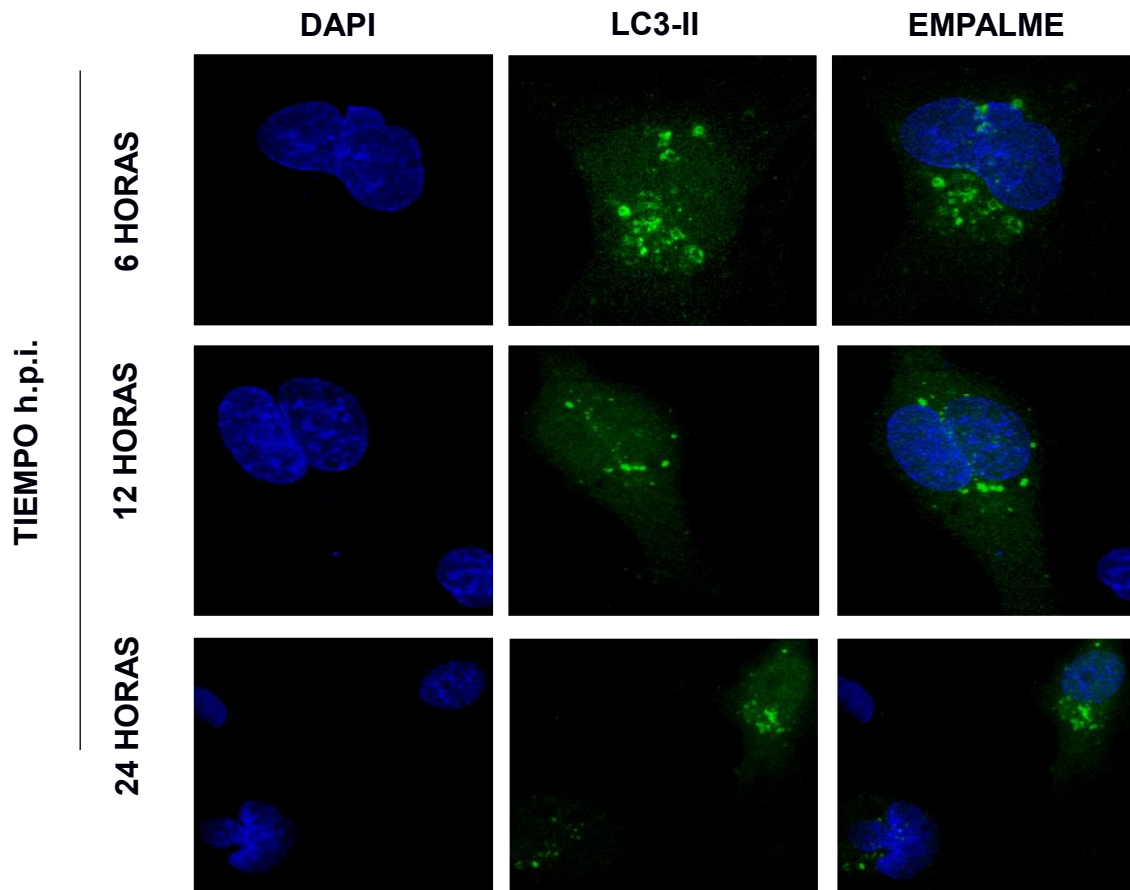
La figura 8A muestra imágenes representativas de los ensayos sobre la distribución de LC3-II en la cinética de infección ya mencionada. Se puede apreciar que en las células infectadas con el virus DEN, desde las 3 h.p.i. se puede apreciar enriquecimiento en el número de puntos correspondientes a la molécula LC3-II, en



contraste con las células falsamente infectadas. Adicional a esto, la figura 8B muestra el análisis gráfico de la distribución de esta molécula, donde se presenta el porcentaje de células LC3-II. Solo las células que mostraron más de 5 puntos de LC3 II célula fueron consideradas como positivas. Se contaron alrededor de 10 campos. Aproximadamente 80-90 células por todos los campos contados.

En este análisis gráfico se observa un patrón similar al mostrado por la forma LC3-II en Western Blot, donde existe un mayor incremento de esta forma en etapas tempranas post-infección y una disminución en etapas tardías, sugiriendo que probablemente la autofagia puede estar favoreciendo de alguna manera el proceso de replicación viral desde las primeras horas de la infección.



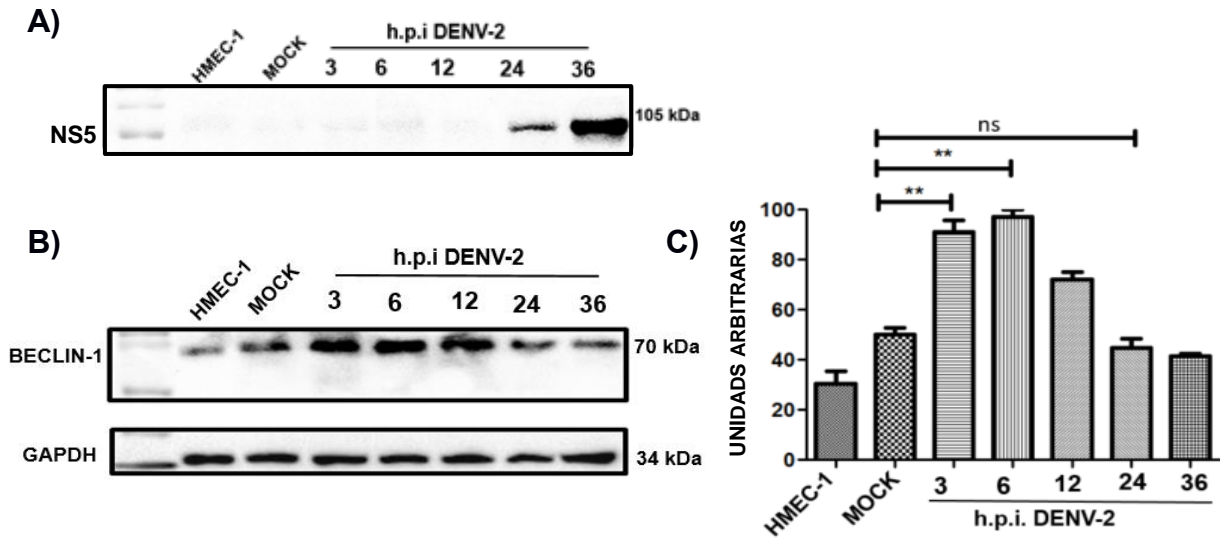


**Figura 8.** Análisis del procesamiento de LC3-II en células HMEC-1 en una cinética de infección con el virus DENV-2 a las 3, 6, 12, 24 y 36 h.p.i. **A)** Inmunofluorescencia de la distribución de LC3-II en una cinética de infección con el virus DENV-2. **B)** Análisis gráfico de la distribución de LC3-II en una cinética de infección con el virus DENV-2. \* valor significativo  $p < 0.05$ . ns. valor no significativo.

## **Expresión de Beclina-1 en una cinética de infección con el virus Dengue en células HMEC-1.**

Como ya se ha mencionado previamente, las proteínas Atg están involucradas de manera muy importante en la inducción de autofagia. La proteína Beclina-1 participa en los primeros eventos rio arriba en la inducción de autofagia, es esencial para la formación del fagóforo, que es la primera estructura necesaria para la formación del autofagosoma.

Para evaluar la expresión de esta proteína, células HMEC-1 fueron infectadas con DENV-2 a 5 MOI, infección que se corrobora al analizar la presencia de la banda correspondiente a la proteína NS5, como se muestra en la figura 9A. La figura 9B muestra el WB de lisados a diferentes tiempos. Un análisis semicuantitativo se presenta en la figura 9C, donde se observa una mayor expresión de Beclina-1 en tiempos tempranos post-infección (3, 6 y 12 horas). El incremento en la expresión de Beclina-1 es notorio en comparación con las condiciones sin infectar o falsamente infectadas. En contraste, se observó una disminución considerable de esta proteína conforme avanza el tiempo de infección, mostrando una menor expresión en las etapas tardías post-infección. Este patrón fue semejante al observado para en LC3-II en el análisis por WB y por inmunofluorescencia. Estos datos adicionales sustentan el posible papel que podría estar jugando la autofagia inducida por el virus Dengue en las primeras horas post-infección en células HMEC-1.



**Figura 9.** Análisis de Beclina-1 en células HMEC-1 en una cinética de infección con el virus DENV-2 a las 3, 6, 12, 24 y 36 h.p.i. **A)** Western Blot de Beclina-1 en una cinética de infección con DENV-2 desde las 3 hasta las 36 horas post-infección. **B)** Se muestra el análisis densitométrico del WB correspondiente a Beclina-1. \* valor significativo  $p < 0.05$ . ns. valor no significativo.

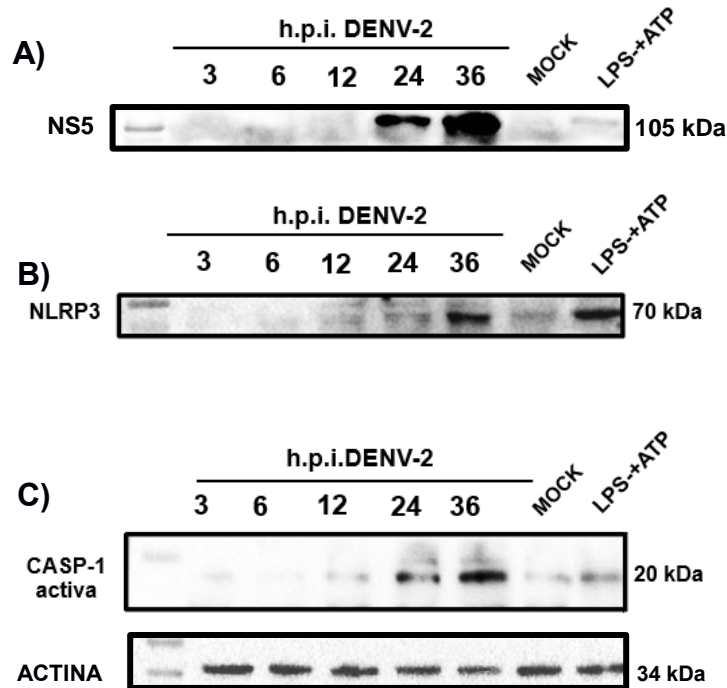
## EVALUACION DE LA EXPRESION DE PROTEÍNAS DEL INFLAMASOMA EN CÉLULAS HMEC-1 INFECTADAS CON EL VIRUS DENGUE.

### Expresión de NLRP3 en una cinética de infección de DENV-2 en células HMEC-1

La activación del inflammasoma como complejo multiproteico, forma parte importante de la respuesta inmune innata. Por esta razón se analizó la activación de este complejo en células HMEC-1 infectadas con el virus Dengue en etapas tempranas y tardías post-infección.

La proteína NLRP3 es uno de los componentes que forman parte del complejo. Para poder analizar su expresión, primeramente, células HMEC se infectaron a 5 MOI y se analizó la expresión de la proteína NS5 para corroborar infección (Figura 10A). En la figura 10B se muestra la expresión de NLRP3 a través de un ensayo de Western Blot, donde se observa un mayor enriquecimiento en los tiempos tardíos post-infección. Se muestra presencia de NLRP3 desde las 24 horas con un pico de máximo de expresión a las 36 h.p.i, en contraste con los controles falsamente

infectados (MOCK). Así mismo, se contó con un control positivo de activación del inflamasoma que es la presencia de LPS más ATP, condiciones ampliamente reportadas y utilizadas para inducir la activación de este complejo.



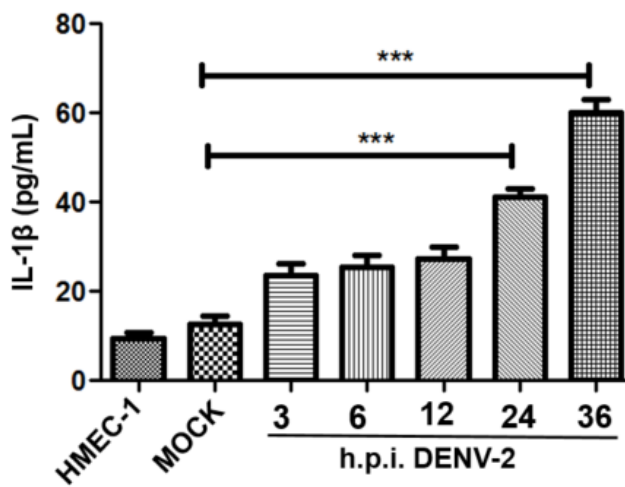
**Figura 10.** Análisis de proteínas del inflamasoma en células HMEC-1 en presencia del virus Dengue. **A)** WB de la expresión de NS5 en células HMEC-1 a una MOI DE 5 con el DENV-2. **B)** WB de NLRP3 en una cinética de infección con el DENV-2 en células HMEC-1. **C)** Western Blot de caspasa-1 en una cinética de infección de células HMEC-1 con DENV-2 a 3, 6, 12, 24 y 36 horas.

***Análisis del ensamble del inflamasoma en una cinética de infección de DENV-2 en células HMEC-1 a través de la expresión de caspasa 1.***

Una vez que se mostraron los cambios en la expresión de NLRP3 dependiente de la infección con Dengue, se evaluó la pro caspasa-1 y su procesamiento. La figura 10C muestra el análisis de la expresión de la caspasa-1 activa con un peso de 20 kDa, este dato indica que el complejo ha sido ensamblado, debido a que esta proteína solamente es auto procesada una vez que el inflamasoma ha sido ensamblado. El Western Blot muestra a la caspasa-1, con un mayor enriquecimiento de esta banda en las etapas tardías de la infección. Este resultado muestra un patrón similar al observado con NLRP3.

### **Análisis de la activación del inflammasoma en una cinética de infección de DENV-2 en células HMEC-1.**

Con el procesamiento de caspasa-1 activa, esta proteína será capaz de promover el procesamiento de pro-IL-1 $\beta$  a su forma activa que le permite ejercer su papel proinflamatorio. La presencia de IL-1 $\beta$  activa se analizó en los sobrenadantes de las células HMEC-1 infectadas con el virus Dengue, por un ensayo de ELISA. La figura 11C muestra la concentración de IL-1 $\beta$  producida por las células como respuesta a la infección con el virus dengue, mostrando un pico de producción máximo a las 36 horas post-infección. Este resultado concuerda con el tiempo óptimo expresión y de activación de caspasa-1 y NLRP3.

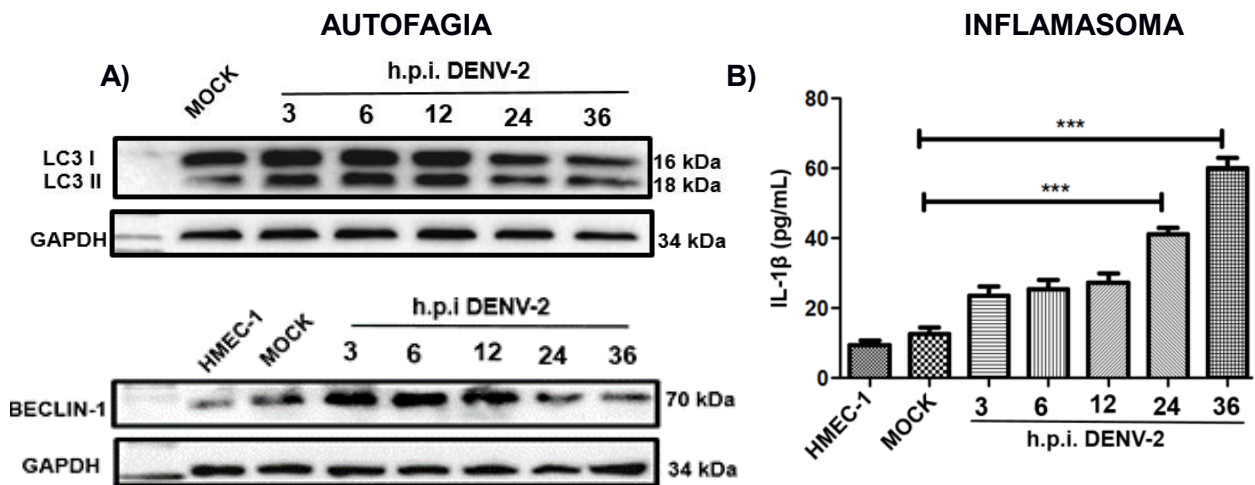


**Figura 11.** Análisis de la activación del inflammasoma en presencia del virus Dengue en células HMEC-1 en una cinética de infección. **A)** Cuantificación por ELISA de IL-1 $\beta$  en una cinética de infección de células HMEC-1 con DENV-2 de 3, 6, 12, 24 y 36 horas. \* valor significativo  $p < 0.05$ .

## Proteínas de autofagia y del inflammasoma presentan una expresión diferencial en etapas tempranas y tardías de la infección con el DENV-2.

La autofagia es un proceso que ha demostrado tener un papel importante en numerosos mecanismos y procesos celulares, incluyendo infecciones virales.

En los últimos años numerosos trabajos han evidenciado el efecto de la autofagia sobre otros mecanismos o proteínas celulares, entre ellos el inflammasoma. Dado que ambos procesos han sido descritos en la infección por el virus Dengue, se decidió caracterizar y analizar su activación en etapas tempranas y tardías de la infección. La figura 12 muestra un análisis simultaneo del inflammasoma y la autofagia con la caracterización de ambos eventos mostrados anteriormente. La figura 12A corresponde a la expresión de proteínas de autofagia, LC3-II y Beclina-1, en ambos casos hay un incremento de estas proteínas en etapas tempranas post-infección y una disminución considerable en las etapas tardías. Por otra parte, al analizar la activación del inflammasoma, se presenta un fenómeno contrario al mostrado en la inducción de autofagia, en la figura 12B se observa a través de la presencia de IL-1 $\beta$  que la activación del inflammasoma ocurre en las etapas tardías post-infección. Con esta evidencia se puede mencionar que ambos procesos ocurren en etapas distintas de la infección.

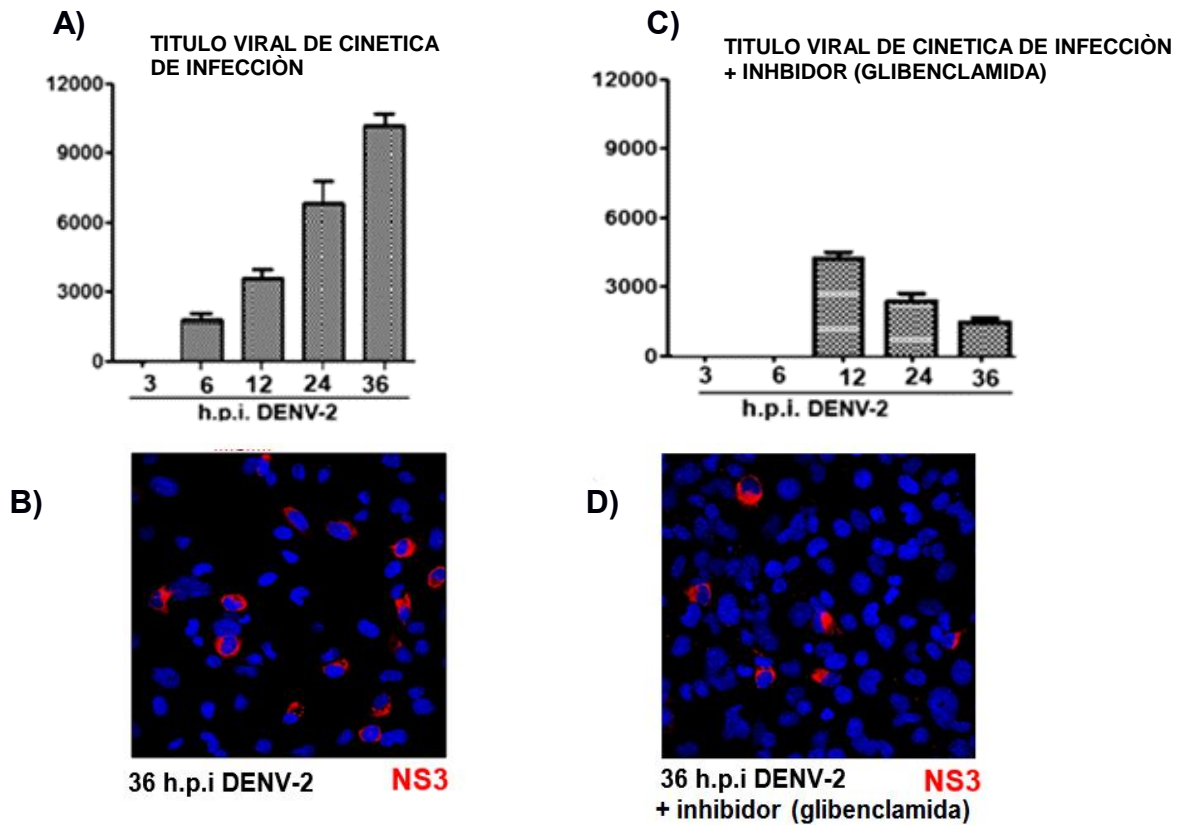


**Figura 12.** Análisis de la expresión de componentes de autofagia e inflammasoma en presencia del virus Dengue. **A.** Western Blot de LC3-II y Beclina-1 en una cinética de infección con DENV-2 desde las 3 hasta las 36 horas post-infección. **B.** Cuantificación por ELISA de IL-1 $\beta$  en una cinética de infección de células HMEC-1 con DENV-2 a 3, 6, 12, 24 y 36 horas. \* valor significativo  $p < 0.05$

## **Efecto de la inhibición del inflammasoma sobre la producción de partículas virales de DENV-2 en células HMEC-1.**

Diversos trabajos han debatido a cerca del efecto que tiene la autofagia sobre otros procesos o proteínas celulares, con respecto a esto, inicialmente otro de nuestros objetivos era analizar el efecto que pudiera tener la autofagia sobre el inflammasoma o viceversa, ya que se ha mencionado mucho sobre la interacción entre ambos mecanismos. Como primer acercamiento a este objetivo, evaluamos el efecto de un inhibidor del inflammasoma (glibenclamida) sobre la replicación de virus. El inhibidor es un potente fármaco que actúa a nivel de un receptor purinérgico importante para la activación del complejo multiproteico. Se evaluó el efecto de glibenclamida sobre la infección productiva a través de la titulación en placa y por medio de inmunofluorescencia a través de la presencia de la proteína viral NS3, la cual forma parte del complejo de replicación. En la figura 13A se muestra la titulación en placa de una cinética de infección, donde se observa una mayor producción de partículas virales en las etapas tardías post-infección. En la figura 13C se muestra la presencia de NS3 36 horas post-infección en células HMEC-1 infectadas con DENV-2, lo cual nos está indicando una infección activa, sin embargo, al agregar 100 mM del inhibidor al sistema, se obtuvo un resultado muy interesante, ya que se puede observar claramente (figura 13D), como la presencia de NS3 se ve abatida, así mismo, la producción de partículas virales también es menor, desde las 24 hasta las 36 horas post-infección se observa un abatimiento de las partículas viables, mostrado en la figura 13B. Este resultado fue inesperado debido al hecho de que el inflammasoma forma parte de la respuesta inmune y en participa combatiendo las infecciones virales, por lo cual nos sorprendió que al inhibir el inflammasoma, la producción e infección viral se vieran disminuidas, algo que podría estar sugiriendo que el inflammasoma de alguna manera también favorece la infección por el DENV-2. Al analizar la inmunofluorescencia podemos observar que el hecho de ver menor presencia de NS3, una proteína que participa en la replicación del genoma viral nos podría estar sugiriendo que probablemente el inflammasoma está favoreciendo de manera temprana la replicación viral ya que parte del complejo viral se ve afectado cuando se trata con el inhibidor glibenclamida.



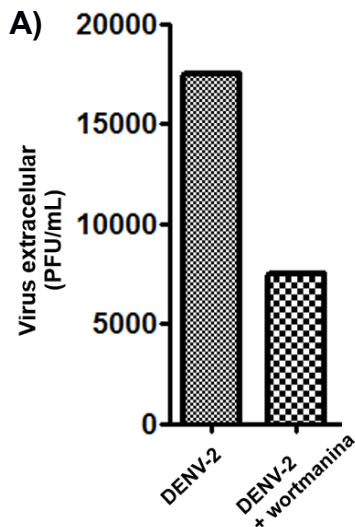


**Figura 13.** Análisis de la inhibición del inflammasoma sobre la replicación viral de DENV-2 en células HMEC-1. **A)** Titulación en placa de una cinética de infección de células HMEC-1 con el DENV-2. **B)** Inmunofluorescencia de NS3 a 36 h.p.i. con el DENV-2. **C)** Titulación en placa de una cinética de infección de células HMEC-1 con DENV-2 en presencia de 100 mM de glibenclamide. **D)** Inmunofluorescencia de NS3 a 36 h.p.i. con el DENV-2 en presencia de 100 mM de glibenclamide.

### Efecto de la inhibición de la autofagia sobre la replicación viral de DENV-2.

Existen diversos estudios acerca de que la autofagia participa de manera importante en la replicación viral, aunque el mecanismo aún no se conoce completamente. Para comprobar este evento en nuestro modelo de estudio, se empleó un inhibidor de autofagia, denominado wortmanina, que actúa inhibiendo la actividad de PI3K III, una de las cinasas necesarias para inducir autofagia. Se evaluó el efecto de este inhibidor sobre la replicación viral a un tiempo de 36 horas post-infección para poder analizar de manera más clara este evento a través de un ensayo de titulación en placa. La figura 14A muestra la producción de partículas virales de DENV-2 en células infectadas y la producción de partículas virales en presencia de wortmanina.

Se puede observar una disminución considerable de partículas virales viables en aquellas células infectadas tratadas con el inhibidor, en comparación con aquellas células que solamente fueron infectadas. Este dato confirma lo que varios grupos de trabajo han reportado, que la autofagia parece tener un papel importante en la producción de partículas virales viables.

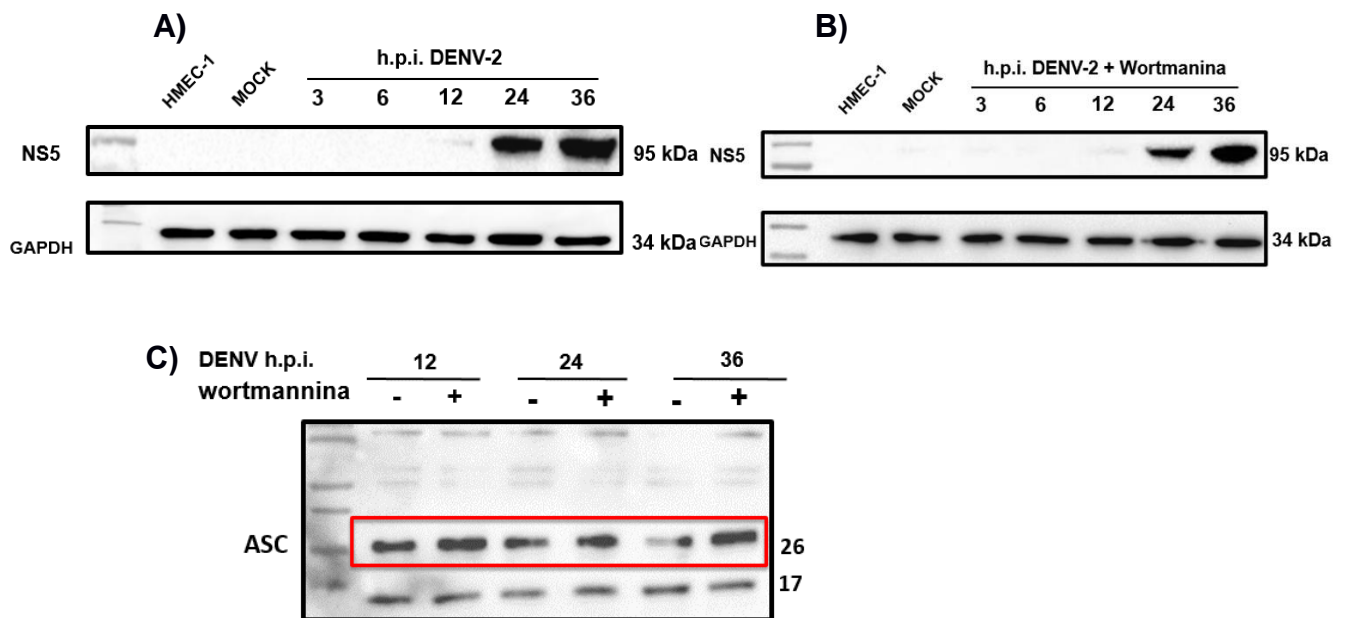


**Figura 14.** Efecto de la inhibición de la autofagia sobre la replicación viral de DENV-2 en células HMEC-1 a 36 horas post-infección. **A)** Titulación en placa de sobrenadantes de células HMEC-1 infectadas con el DENV-2 a 36 h.p.i y células infectadas más 100 mM del inhibidor wortmanina.

### **Efecto de la inhibición de la autofagia sobre la actividad del inflamasoma.**

Existen diversos trabajos que relacionan una disminución en la actividad del inflamasoma en presencia de la autofagia. Algunos reportes muestran un efecto regulador de la autofagia sobre algunas proteínas que conforman el inflamasoma, tales como ASC e 1L-1B. Debido a que nos interesa conocer el efecto que pueda existir entre ambos procesos bajo el contexto de una infección viral, se evaluó la actividad del inflamasoma en ausencia de autofagia, empleando el inhibidor de autofagia, wortmanina. Se utilizó una concentración de 100 mM de wortmanina y se infectaron células HMEC-1 a 5 MOI con el DENV-2, como se muestra en las figuras 15A y 15 B, donde se muestran dos condiciones experimentales, células HMEC-1 infectadas y células infectadas tratadas con el inhibidor. Se muestra en ambas

cinéticas la presencia de la proteína viral NS5. La figura 15C corresponde a la expresión de ASC (proteína adaptadora del inflamasoma) en presencia de las dos condiciones antes mencionadas. Y se puede observar que a las 12, 24 y 36 horas post-infección en presencia de wortmanina, la proteína ASC de aproximadamente 26 kDa, muestra un ligero aumento en su expresión en comparación con la condición solamente infectada. Esto podría estar sugiriendo probablemente un efecto de la autofagia sobre una de las proteínas que conforman el inflamasoma, sin embargo, se necesitan más repeticiones, utilizar otro inhibidores o sistemas para inhibir la autofagia.



**Figura 15.** Análisis del efecto de la inhibición de la autofagia sobre la actividad del inflamasoma en células HMEC-1 infectadas con el DENV-2. **A)** WB de la proteína NS5 en células HMEC-1 infectadas a 5 MOI con el DENV-2 en una cinética de infección. **B)** WB de la proteína NS5 en células HMEC-1 infectadas a 5 MOI con el DENV-2 en presencia de 100 mM de wortmanina en una cinética de infección. **C)** WB de ASC en células HMEC-1 infectadas con el DENV-2 con o sin presencia de wortmanina.

## DISCUSIÓN

Una amplia variedad de estudios ha demostrado que distintos virus son capaces de alterar diversos procesos celulares. Como agentes patógenos invasores, los virus alteran múltiples mecanismos en la célula blanco, tales como tráfico vesicular, metabolismo celular y funciones relacionadas con el sistema inmune, entre otros (Chiramel et al., 2013). Uno de estos mecanismos, es la autofagia, que se encarga de mantener la homeóstasis en la célula, a través de la degradación de agregados proteicos involucradas en la respuesta inmune, o directamente agentes patógenos. Existe evidencia acerca del papel que juega la autofagia como un mecanismo importante de defensa antiviral. Se ha demostrado por ejemplo que este proceso participa en el control de la replicación del VIH en el sistema nervioso central (Virgin, 2009).

Contrario a estos hallazgos, se ha reportado que algunos virus han desarrollado estrategias eficaces no solo para evadir mecanismos del sistema inmune, sino manipulando y controlando procesos para su beneficio. Con respecto a esto, se ha reportado que diversos miembros de diferentes familias de virus inducen autofagia para favorecer la infección viral. El virus de la influenza, un virus de RNA de polaridad negativa y miembro de la familia *Orthomyxoviridae* puede inducir la autofagia, un proceso que se ha considerado necesario para su replicación viral (Zhang, 2014). Además, miembros de la familia *Herpesviridae* tales como el virus de la varicela-zóster (VZV) y el virus de Epstein-Barr (EVB) inducen también autofagia, que se ve asociada con un incremento en la acumulación de autofagosomas en las células infectadas (Takahashi, 2009).

En el género *Flavivirus*, se ha demostrado que el virus de la hepatitis C, Zika y el virus Dengue son capaces de inducir la autofagia para su beneficio, favoreciendo la replicación viral. Con respecto a las células infectadas con DENV-2, se ha observado un incremento en la acumulación de autofagosomas. Este evento se ha evaluado a través de ensayos de transfección con el plásmido GFP-LC3 para visualizar la distribución de LC3-II. Además, se ha demostrado que, en presencia de inhibidores de autofagia, la producción de partículas virales viables se ve abatida

considerablemente (Lee et al., 2008, Panyasrivanit 2011). Recientemente se demostró que un tipo de autofagia denominado como lipofagia, es el mecanismo que involucrado en favorecer la replicación del DENV-2. Evidencias experimentales sugieren que la lipofagia actúa a través de la manipulación del metabolismo de lípidos de la célula, degradando gotitas de lípidos y triglicéridos, resultando en la movilización de ácidos grasos libres, los cuales son transportados a la mitocondria, donde participan en la B-oxidación, para la síntesis de ATP, molécula indispensable para que se lleve a cabo de replicación viral (Heaton, 2010).

Por otra parte, diversos grupos de trabajo, incluido el nuestro, ha reportado que la infección con el DENV-2 también ser capaz de activar un mecanismo importante de la respuesta inmune, que es el inflamasoma (Chen et al., 2012, Wu et al, 2013 Shrivastava manuscrito en preparación).

En los últimos años la relación mutua entre la autofagia y el inflamasoma ha sido de gran de interés, en parte porque se ha evidenciado que la autofagia controla diversos procesos inflamatorios y la secreción de mediadores inmunes. De la misma manera, la autofagia ha mostrado tener un efecto sobre señales endógenas que ocasionan una respuesta inflamatoria, y actualmente su papel sobre la actividad del inflamasoma es ampliamente debatida. Hasta el momento, las evidencias que se han reportado sobre la regulación o el control entre estos dos eventos han sido bajo el efecto de fármacos. En este trabajo evaluamos el efecto de estos mecanismos inducidos bajo el contexto de una infección viral con el DENV-2 en etapas tempranas y tardías de la infección para intentar elucidar la dependencia entre ambos fenómenos. Validamos nuestro modelo de infección, a través de la presencia de la proteína no estructural NS5, la polimerasa dependiente de RNA, así como por la presencia de partículas virales competentes en una cinética de infección con el DENV-2 en células HMEC-1. Mostrando infección en las células en una manera dependiente del tiempo, y no en aquellas falsamente infectadas con el virus inactivado por luz UV, donde no observamos infección. Mostramos que a partir de las 12 horas post-infección se evidencia la presencia de NS5, así como la producción de partículas virales viables, además mostramos a las 36 horas post-infección de nuestra cinética un pico máximo.

Por otra parte, diferentes ensayos han demostrado la activación del inflammasoma, y la inducción de autofagia, esto a través de la expresión de proteínas claves para ambos eventos.

Al analizar la autofagia, evidenciamos su inducción por medio de la expresión de la proteína LC3, un marcador ampliamente utilizado para el análisis este proceso (Kabeya, 2000) y a través de la expresión de Beclina-1, que como ya se ha mencionado previamente, participa de manera importante en la inducción de autofagia. Con respecto a LC3, esta proteína presenta dos formas celulares, LC3-II que corresponde a la forma procesada y localizada en la membrana de los autofagosomas. Lee et al., 2011 demostró que el virus Dengue induce la autofagia en células Hep-G2 a las 24 horas post-infección, a través de plásmidos reporteros de GFP-LC3 y por WB, mostro una clara diferencia con respecto a los controles sin infectar. A pesar de este y otros análisis de autofagia, existe poca evidencia sobre su participación en etapas tempranas de la infección, y debido a que diversos grupos de trabajo muestran a la autofagia como un mecanismo proviral, consideramos importante analizar su inducción desde tiempos tempranos post-infección. Nuestro análisis sobre estos dos marcadores autofágicos mostró una alta expresión de estas proteínas desde la primera hora post-infección. Este mismo patrón de la expresión de ambas proteínas se mantuvo hasta las 12 horas aproximadamente, Además, mostramos una disminución considerable en las etapas tardías post-infección, consideradas 24 y 36 horas. Lo anterior es un dato no reportado, pero congruente, considerando los reportes que mencionan a la autofagia como un proceso que favorece la replicación viral, por lo que el aumento en la expresión de LC3-II y Beclina-1 sugieren un incremento en inducción de la autofagia dependiente del virus Dengue (Randall et al., 2010, Panyasrivanit et al., 2009).

Para reforzar el análisis anterior, evaluamos la distribución de LC3-II a través de plásmidos reporteros con GFP-LC3, encontrando un incremento en la acumulación de la molécula LC3-II en los tiempos tempranos post-infección, mismo patrón que a observamos por WB. Este dato apoya la idea del papel que juega la autofagia en las células HMEC-1 infectadas con el virus.

Otro fenómeno de nuestro estudio es el inflamasoma. Estudios realizados en nuestro laboratorio reportan activación de este complejo multiproteico en presencia del DENV-2. (Shrivastava et al., 2017). Se evaluó su activación al igual que la autofagia, desde tiempos tempranos hasta tiempos tardíos post-infección. Se caracterizó la expresión de componentes del inflamasoma, así como su activación, esto a través del análisis de NLRP3, ASC e IL-1 $\beta$ . Encontrando una mayor expresión de las 3 proteínas evaluadas en las etapas tardías post-infección de nuestra cinética. Es interesante el patrón que pudimos observar al analizar ambos eventos celulares, ya que la autofagia mostró una mayor actividad en las primeras etapas de infección, caso contrario a la activación del inflamasoma, donde mostró una mayor actividad en las etapas tardías post-infección. Con los datos obtenidos muestran que ambos eventos celulares están ocurriendo en diferentes momentos de la infección.

Como segunda parte de nuestro estudio, decidimos evaluar en nuestro modelo el papel que juega la autofagia sobre la replicación viral. Estudios realizados por otros grupos de trabajo han demostrado que este proceso participa de manera importante sobre la replicación viral, debido a que su inhibición disminuye la replicación viral (Randall, 2009, Jordan, 2017). Realizamos un análisis a 36 horas post-infección para evaluar de manera clara la producción viral, y en presencia del inhibidor wortmanina, los resultados muestran una clara disminución sobre la producción de partículas virales competentes, a diferencia de las células que fueron infectadas, pero no tratadas con el inhibidor, donde el título viral es mayor. Esto comprueba lo reportado previamente sobre el papel que juega la autofagia sobre la replicación de DENV-2.

Por otra parte, evaluamos el efecto la inhibición de la autofagia sobre la actividad del inflamasoma. Shi et al., 2011 reportaron un papel regular de la autofagia sobre el inflamasoma, primeramente, mostraron colocalización de ASC, con un adaptador autofágico encargado de degradar los componentes que reconoce. Posteriormente

a través de inhibidores de autofagia, demostraron en esta condición experimental se observa una mayor actividad del inflamasoma, sugiriendo que probablemente la autofagia esté regulando la activación del inflamasoma, a través de la degradación de alguno de sus componentes, el cómo ASC. Un estudio que realizamos para comprobar este fenómeno fue analizar componentes del inflamasoma en células HMEC-1 infectadas con el virus en presencia y ausencia de wortmanina. A través de la expresión de ASC, pudimos observar que existe un ligero incremento de esta proteína en ausencia de autofagia a las 12, 24 y 36 horas post-infección, pudiendo sugerir que probablemente la autofagia si está teniendo un efecto sobre la actividad del inflamasoma a estos tiempos.

Finalmente, el análisis realizado para evaluar la inhibición del inflamasoma sobre la autofagia, no se mostraron los datos, ya que los datos no fueron claros. Decidimos evaluar el efecto de la inhibición del inflamasoma sobre la replicación viral para completar el análisis. Interesantemente observamos que en ausencia del inflamasoma, la replicación viral ve disminuida, este dato fue completamente inesperado debido a que en teoría el inflamasoma por ser parte de la respuesta inmune, participaría en el control de las infecciones virales, Sin embargo, no somos el único grupo de trabajo que ha tenido este resultado, Wang et al, 2014 reportan un dato similar al nuestro, este grupo de trabajo observa una disminución de la replicación cuando se inhibió el inflamasoma. Recientemente en un modelo de infección viral por otro flavivirus, el VHC, se demostró que el inflamasoma si es capaz de participar de manera indirecta en la replicación viral. Primeramente, se demostró que el VHC necesita de la acumulación y procesamiento de las gotas de lípidos para una eficaz replicación. Se reportó que el virus es capaz de inducir la transcripción de genes asociado a lipogénesis, e interesantemente se comprobó que la actividad del inflamasoma es necesaria para que estos genes se transcriban, demostrando que el inflamasoma inducida por virus tiene la capacidad de favorecer la replicación viral (McRae et al., 2016).

A pesar de que el posible papel que tiene el inflamasoma sobre la replicación viral se demostró en otro virus, no descartamos la idea que DENV por ser también un



flavivirus sea capaz de manipular la activación del inflamasoma para su beneficio. Además, nuestro grupo de trabajo ha reportado que estructuras lipídicas (balsas lipídicas) juegan un papel importante en la replicación del virus (Garcia-Cordero et al., 2014). Y se ha reportado que las estructuras lipídicas participan de forma crucial en el ciclo de DENV-2.

## CONCLUSIONES

- Células HMEC-1 infectadas con DENV-2 presentan una mayor actividad de autofagia en las primeras horas post-infección y menor actividad en tiempos tardíos.
- La autofagia sugiere ser un proceso que favorece la replicación viral en células HMEC-1 infectadas con DENV.
- La actividad de la autofagia y la activación del inflamasoma son procesos que se presentan en diferentes etapas de la infección.

## PERSPECTIVAS

- Validar a través de otros inhibidores de autofagia o a través de sistemas *knock down* o *knock out* el efecto sobre la activación del inflamasoma en células HMEC-1 infectadas con DENV-2.
- Validar a través de otros inhibidores de inflamasoma o a través de sistemas *knock down* o *knock out* el efecto sobre replicación viral.
- Demostrar cuál de las proteínas virales de DENV-2 es capaz de inducir el proceso de autofagia en nuestro modelo de estudio.

## REFERENCIAS

Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet N.117 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

Wu et al., 2013. CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood*;121(1):95-106.

Whitehead et al., 2007. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 5 (7): 518-28.

Egloff et al., 2007. Structural and functional analysis of methylation and 5'- RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. *J Mol Biol*, 372 (3): p. 723-36.

Screaton et al., 2015. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews Immunology* 15, 745-759.

Aruna., 2014. Review on Dengue viral replication. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 3(11): 1025-1039.

Idrees-Ashfaq., 2012. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genet Vaccines Ther* 10 (1): 6.

Bäck-Lundkvist., 2013. Dengue viruses: an overview. *Infection Ecology & Epidemiology*; 3:10.

Chiramel et al., 2013. Divergent Roles of Autophagy in Virus Infection. *Cells* 2, 83-104

Diamond et al., 2015. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell* 162. Vol. 162, Issue 3. p488–492.

Panyasrivanit et al, 2009. Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *J Gen Virol*; 90(Pt 2):448-5.

McLean *et al.*, 2011. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *The journal of biological chemistry* Vol. 286, No.25, pp.22147-22159.

Yuk-Jo., 2013. Crosstalk between autophagy and inflammasomes. *Mol. Cell* 36, 393-399.

Jackson., (2015). Viruses and the autophagy pathway. *Virology Volumes* 479–480, Pages 450–456.

Kabeya et al., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in

autophagosome membranes after processing. *EMBO J*;19(21):5720-8.

Mizushima et al., (2011). The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Rev. Cell Dev. Biol.*27:107-132.

Shi et al., (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*; 13(3):255-63.

Hamasaki-Yoshimori, (2010). Where do they come from? Insights into autophagosome formation. *FEBS Lett* 2; 584 (7): 1296-301.

Hamasaki et al, (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 21; 495 (7441): 389-93

Randall et al., (2013). Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis. *Front Immunol* 2013 Sep 30;4:301.

Gallagher et al., (2016). Advances in autophagy regulatory mechanisms. *Cells*; 5(2).

Thirumala-Kanneganti, (2010). Central roles of NLR's and inflammasomes in viral infection. *Nature review immunology* 10, 688-698.

Chen-Ichinohe, (2015). Response of host inflammasomes to viral infection. *Trends Microbiol.* 2015 Jan;23(1):55-63.

Kuo et al., (2006). Class I and III Phosphatidylinositol 3-Kinase Play Distinct Roles in TLR Signaling Pathway. *J Immunol*; 176:5943-5949.

Guo et al (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutic. *Nature Medicine.* Vol. 21 | Number 7.

Abderrazak et al., (2015). NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*; 4:296-307.

Jo et al., (2015). Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & Molecular Immunology* 13, 148–159.

Latz, et al., (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature review immunology.* *Nat Rev Immunol*; 13(6):397-411.

Lupfer-Kanneganti, (2014). The Expanding Role of NLRs in Antiviral Immunity. *Immunol Rev.*; 255(1): 13–24.

Diehl-Schaal., 2013. Make Yourself at Home: Viral Hijacking of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Viruses*, 5; 3192-3212.

Liao et al., 2012. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate-mediated signal transduction in the regulation of NLRP3 protein expression a caspase-1-mediated interleukin-1B secretion. *Inflamm Res*; 62(1):89-96.

Deretic et al., 2013. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature review immunology*.

Liu et al., 2013. Dengue virus subgenomic RNA induces apoptosis through the Bcl-2-mediated PI3K/AKT signaling pathway. *Virology* 448, 15-25.

Liao et al., 2012. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate-mediated signal transduction in the regulation of NLRP3 protein expression an caspase-1-mediated interleukin-1B secretion. *Inflamm. Res.* 62:89-96.

Schroder-Tschopp., 2010. The inflammasomes. *Cell* 140, 821-832.

Jaber-Zong., 2013. Class III PI3K Vps34: essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1280. 48–51.

Diehl and Schaal., 2013. Make Yourself at Home: Viral Hijacking of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Viruses*, 5, 3192-3212.

Salminen et al., 2012. Inflamming: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *AGING*, Vol.4 No.3.

Ichinohe et al., (2010). Influenza virus activates inflammasomes through intracellular M2 channel. *Nat Immunol* ; 11(5): 404–410

Xing et al (2016). TLR and NLRP3 inflammasome-dependent innate immune responses to tumor-derived autophagosomes (Dribbles). *Cell Death and Disease*.

Lee-Iwasaki, (2008). Autophagy and antiviral immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20: 23–29.

Mazo et al, (2014). The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nature Immunology*. Vol 15 Number 8.

Lee et al, (2008). Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* 10;374(2):240-8.

Saitoh- Akira, (2016). Regulation of inflammasomes by autophagy. *J Allergy Clin Immunol*; 138(1):28-36.

Saitoh, T., Akira, S., 2016. Regulation of inflammasomes by autophagy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 28–36.

Virgin HW, Levine B. 2009. Autophagy genes in immunity. *Nat. Immunol*; 10:461–470

Zhang et al., 2014. The Regulation of Autophagy by Influenza A Virus. *Biomed Res Int.*; 2014:498083.