

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Estudio de la coinfección DENV-2 y CHIKV en
modelo celular (HMEC-1 y Fibroblasto)”**

TESIS

Que presenta

Q.F.B. Verónica López Perrusquía

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Dr. Moisés León Juárez

DIRECTORA

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Investigadora Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

CO-DIRECTOR

Dr. Moisés León Juárez

Investigador Ciencias Médicas C

Instituto Nacional de Perinatología

ASESORES

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Investigadora Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Investigador Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional, cariño y confianza en mí, las cuales constituyen una de las grandes razones por la cual he podido llegar hasta aquí y siga avanzando.

A mis amigos y maestros que la vida me ha dado, cuya amistad, experiencias y perspectivas únicas me han ampliado mi mundo.

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón por darme la oportunidad de ser parte de su increíble equipo, así como proporcionarme su apoyo y amistad durante este proyecto, y ver que lo importante es seguir avanzando y no darse por vencido.

A Julio, Gio, Alfredo, Karen, Joss, Paola, Sofía, Ramón, Isabel, Lyssuli, Idaira, Nadia, Maru por haber hecho de mi estancia una experiencia única. Por ayudarme y orientarme a lo largo de este proyecto; a darme ánimos y consejos para salir adelante.

A los investigadores del departamento que compartieron sus conocimientos y nos aconsejaron a lo largo de esta etapa.

Agradezco al CONACYT por otorgarme la beca con el número de apoyo 449580 que permitió realizar mis estudios de Maestría en el departamento de Biomedicina Molecular en el CINVESTAV.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	I
INDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Virus Chikungunya	2
1.1.1. Epidemiología de la enfermedad	2
1.1.2. Características del virus	3
1.1.3. Ciclo de replicación	5
1.2. Virus Dengue	7
1.2.1. Epidemiología de la enfermedad	7
1.2.2. Características del virus	7
1.2.3. Ciclo de replicación	10
1.3. Coinfecciones en la naturaleza	12
1.4. Epidemiología y patología de la coinfección DENV-CHIKV	13
1.5. Efecto de la coinfección sobre DENV y CHIKV	14
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1. Material Biológico	20
5.1.1. Cultivos celulares	20
5.1.2. Virus	20
5.2. Métodos experimentales	21
5.2.1. Obtención del suero policlonal contra la proteína E2	21

de CHIKV	
5.2.2. Propagación y purificación de virus	22
5.2.3. Cinética de monoinfección DENV/CHIKV y coinfección DENV-CHIKV	22
5.2.4. Inmunofluorescencia	23
5.2.5. Titulación viral	24
5.2.6. Cuantificación de IFN- β mediante ELISA	26
6. RESULTADOS	27
6.1. Obtención del suero hiperinmune contra CHKV	27
6.1.1. Expresión y purificación de la proteína recombinante E2	27
6.1.2. Inmunización y análisis de la inmunogenicidad de la proteína recombinante E2	28
6.2. Preparación del abasto viral CHIKV	29
6.3. Las células HMEC-1 son susceptibles a CHIKV y DENV	30
6.4. La infección productiva de DENV disminuye durante la coinfección DENV-CHIKV en células HMEC-1	31
6.5. Los fibroblastos también son susceptibles a DENV y CHIKV	32
6.6. La producción de partículas virales infectivas de DENV disminuye durante la coinfección DENV-CHIKV en fibroblastos	34
6.7. La infección productiva de DENV también disminuye bajo un contexto de superinfección en HMEC-1	35
6.8. La infección productiva de DENV disminuye en la superinfección en fibroblastos	37
6.9. Determinación de IFN- β	38
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES	45
9. PERSPECTIVAS	45
10. BIBLIOGRAFÍA	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Virus Chikungunya	4
Figura 2. Ciclo viral de CHIKV	6
Figura 3. Características del virus DENV	8
Figura 4. Ciclo viral de DENV	11
Figura 5. Distribución global de coinfección DENV-CHIKV	13
Figura 6. Modelos de coinfección	14
Figura 7. Activación de la respuesta de IFN	17
Figura 8. Diagrama de la estrategia experimental empleada	21
Figura 9. Esquemas representativos	23
Figura 10. Expresión de la proteína recombinante E2	27
Figura 11. Evaluación del nivel de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante E2 mediante ELISA.	28
Figura 12. Inmunofluorescencia de células VERO infectadas con el virus CHIKV	29
Figura 13. Detección de DENV y CHIKV en células HMEC-1	30
Figura 14. Titulación viral de la cinética productiva de DENV y CHIKV en células HMEC-1	32
Figura 15. Detección de DENV y CHIKV en fibroblastos	33
Figura 16. Cinética de la infección productiva de DENV y CHIKV en fibroblastos	35
Figura 17. Titulación de la infección productiva de la superinfección DENV y CHIKV en células HMEC-1	36
Figura 18. Infección productiva de la superinfección DENV y CHIKV en fibroblastos	37
Figura 19. Determinación de IFN- β	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas del virus CHIKV y sus funciones	4
Tabla 2. Proteínas y funciones de las proteínas virales de DENV	8
Tabla 3. Concentraciones y combinaciones de los anticuerpos empleados en inmunofluorescencia	24
Tabla 4. Concentraciones y combinaciones de los anticuerpos utilizados en titulación viral	25

ABREVIATURAS

°C	Centígrados
Ae.	Aedes
BSA	Albúmina de Suero Bovino
C	Proteína de Cápside
CD	Células dendríticas
CHIKV	Virus Chikungunya
CO ₂	Dióxido de Carbono
DENV	Virus Dengue
E	Proteína de Envoltura
EBS	Virus Epstein-Barr
ECSA	Este, Centro, Sur de África
ELISA	Inmunoensayo absorbente ligado a enzima
HBC	Virus Hepatitis B
HCV	Virus Hepatitis C
HDV	Virus Hepatitis D
HHV7	Virus del herpes 7
h	Hora
IFN	Interferón
IgM	Inmunoglobulina M
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
ISG	Gen estimulado por interferón
kDa	Kilodalton

K_2HPO_4	Fosfato de Sodio Dibásico
KH_2PO_4	Fosfato de Sodio Monobásico
M	Molar
MEM	Medio mínimo esencial Eagle's
mg	Miligramo
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de Infección
NaCl	Cloruro de Sodio
Na_2CO_3	Carbonato de Sodio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de Sodio
nm	Nanómetros
NS1	Proteína no estructural 1
NS2A	Proteína no estructural 2A
NS2B	Proteína no estructural 2B
NS3	Proteína no estructural 3
NS4A	Proteína no estructural 4A
NS4B	Proteína no estructural 4B
NS5	Proteína no estructural 5
nsP1	Proteína no estructural 1
nsP2	Proteína no estructural 2

nsP3	Proteína no estructural 3
nsP4	Proteína no estructural 4
nt	Nucleótidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGE	Gel de poliacrilamida
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Buffer Fosfato Salino
p.f.u.	Unidad formadora de placa
pg	Picogramo
RPMI	Medio Roswell Perk Memorial Institute
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
SFB	Suero Fetal Bovino
STAT1	Transductor de la señal y activador de la transcripción 1
VVI	Interacción virus-virus
WB	Western Blot

RESUMEN

Dengue (DENV) y Chikungunya (CHIKV) son considerados como amenazas de salud pública a nivel mundial. DENV causa un amplio espectro de formas clínicas, pero las formas severas pueden causar síndrome de choque por Dengue o hemorragia que puede llevar a la muerte, mientras que CHIKV causa dolor crónico e intenso en las articulaciones asociado, probablemente, a persistencia viral. Ambos virus son de RNA y se transmiten al huésped humano a través de la picadura de mosquitos *Aedes* que se encuentran infectados con un solo virus o coinfectados con más de un virus. Se ha reportado que estos mosquitos pueden transmitir ambos virus simultáneamente, dando como resultado coinfección en los humanos, pero también existe la posibilidad de coinfectarse bajo un esquema de superinfección. Las coinfecciones pueden facilitar o inhibir la replicación viral y transmisión, y también pueden afectar la severidad de la infección y la respuesta inmune del huésped. Aunque las coinfecciones DENV-CHIKV se han reportado en muchos países, incluyendo México, poco se conoce sobre las interacciones entre estos dos virus y su posible asociación a una clínica más severa. La coinfección tiene un efecto sobre estos dos virus, tanto en el vector como en el humano. En ambos escenarios se ha observado que la coinfección tiene un efecto positivo sobre DENV, pero contrario sobre CHIKV. Sin embargo, recientemente se reportó que pacientes pediátricos coinfectados con DENV-CHIKV sólo seroconvierten a CHIKV. Ante este fenómeno, este trabajo se centró en estudiar la dinámica viral de DENV y CHIKV bajo un contexto de coinfección (por infección simultánea o superinfección) empleando cultivos celulares de fibroblasto y HMEC-1.

Se observó que, bajo un contexto de coinfección, la producción de partículas infectivas de ambos virus disminuye, siendo más para DENV, y este efecto fue independiente de la línea celular empleada, y al parecer el IFN- β participa en este fenómeno en las primeras horas de infección.

ABSTRACT

Dengue (DENV) and Chikungunya (CHIKV) are global public health threats. Dengue causes a broad spectrum of clinical forms, but the severe forms may cause dengue shock syndrome or hemorrhage that can lead to death, while Chikungunya can cause intense chronic joint pain, probably related with viral persistence. DENV and CHIKV are RNA viruses transmitted to humans through the bites of infective female *Aedes* mosquito, that may be infected with only one virus or coinfecting with multiple viruses. Several studies have reported that *Aedes* mosquito is capable of transmitting both DENV and CHIKV simultaneously, and as a result, co-infecting humans. However, it is also possible to acquire a coinfection through superinfection. Coinfections can either facilitate or hinder viral replication and transmission and might also affect the severity of infection and the immune response of the host. Although DENV-CHIKV co-infection cases have been documented in many countries (including Mexico), little is known about DENV-CHIKV interactions and its possible association with severe clinical disease. Many reports have suggested that coinfection may have a positive effect on DENV, but no with CHIKV. On the other hand, DENV-CHIKV coinfecting pediatric patients only seroconverted to CHIKV. Therefore, this project focused in the analysis of DENV-CHIKV viral dynamic under a coinfection context (by simultaneous infection or superinfection) using fibroblast cell and HMEC-1 culture.

We observed that, in a coinfection context, the viral particles production is reduced for both viruses, being in DENV more pronounced this reduction; in both cell lines. And it seems that IFN- β could be playing a role in this effect at early times.

1. INTRODUCCIÓN

Nuestro país posee amplia zonas tropicales y subtropicales en donde habitan diferentes vectores, portadores de diversas infecciones parasitarias, bacterianas y virales. El mosquito del género *Aedes*, es el responsable de transmitir tres de los virus que han causado graves problemas de salud en los últimos años: Dengue, Chikungunya y Zika¹. La presencia del vector transmisor de cualquiera de estos tres virus ha condicionado la existencia de coinfecciones virales tanto en el vector, como en el huésped humano^{2,3}. Las interacciones virus-virus (VVI, virus-virus interaction) pueden ser críticas para entender la patogenia y evolución de la enfermedad. Se ha documentado que estas interacciones tienen un efecto significativo e inesperado en la severidad de la infección viral, tropismo, transmisibilidad, inmunopatología y efectividad a vacunas⁴.

Dapalma y colaboradores (2010) definen VVI como una diferencia medible en el transcurso de infección de un virus como el resultado de una infección concurrente o previa por una diferente especie o cepa viral. Estas diferencias medibles incluyen cambios en la permisividad del tejido, replicación viral, patrones en la producción de la progenie y liberación, latencia y patología (inmunopatología y respuesta inmunológica). Una infección concurrente (o coinfección) puede incluir infección en la misma célula de 2 o más especies de virus, o 2 virus infectando diferentes tipos celulares dentro del mismo organismo y producir una VVI medible⁴.

Se han reportado coinfecciones con virus de influenza, hepatitis, inmunodeficiencia humana, Epstein-Barr, entre otros, pero hay pocos estudios de coinfecciones dados con arbovirus, particularmente, coinfecciones con DENV-CHIKV⁵⁻⁷. DENV y CHIKV son arbovirus (**Arthropod-Borne-Virus**), ya que el mecanismo de transmisión es a través de la picadura de un mosquito del género *Aedes*. Ambas infecciones comparten varias manifestaciones clínicas, como fiebre alta, dolor de cabeza, náuseas, dolor en el cuerpo y sarpullido^{8,9}. El Dengue es una enfermedad que tiene diferentes formas clínicas las cuales pueden presentarse desde un refriado común, hasta formas severas. La enfermedad por

DENV se caracteriza por una fiebre alta que puede durar de 3 a 7 días, severo dolor de cabeza, y dolor en las articulaciones. Para dengue clásico, el título viral disminuye y los síntomas desaparecen después al ser una infección autolimitante. Sin embargo, en caso de una infección severa, los síntomas se agravan y pueden llevar a manifestaciones clínicas tales como hemorragias observadas en los pacientes con Dengue hemorrágico, o bien la presencia de fuga plasmática asociada al síndrome de choque por Dengue. La sintomatología de Chikungunya es similar a la de Dengue, siendo su característica distintiva la debilidad muscular severa, dolor severo en articulaciones y poliartralgia que perdura 3-12 meses, e incluso 1-3 años. Una infección severa de CHIKV puede causar manifestaciones neurológicas y ópticas, sin embargo, las infecciones con CHIKV usualmente no son fatales¹⁰.

A pesar de que varios trabajos han reportado casos de coinfección con estos arbovirus (tanto en humanos como en vectores^{3,11}), muy poco se conoce acerca de las manifestaciones clínicas y las consecuencias biológicas de este fenómeno. En algunos trabajos han reportado que la clínica es más severa durante la coinfección^{12,13}, en contraste con otros estudios donde no detectan diferencia en la sintomatología entre los pacientes mono infectados y los coinfectados^{2,14}. Por ende, diversos grupos de investigación han analizado esta dinámica empleando cultivos celulares, para empezar a comprender este panorama¹⁵. En este trabajo se aborda el análisis de la dinámica viral de DENV-CHIKV empleando un modelo celular.

1.1. Virus Chikungunya

1.1.1. Epidemiología de la enfermedad

El nombre Chikungunya proviene de la lengua Makonde (lugar donde se detectó por primera vez, 1952¹⁶), que significa “aquel que se dobla”, haciendo referencia al síntoma donde los pacientes caminan en una postura encorvada debido al dolor en las articulaciones¹⁷. Se han identificado 3 linajes del virus CHIKV, empleando las secuencias de genes de la proteína E1 de la envoltura: ECSA (Este, Central y Sur África), África Occidental y Asiático¹⁸.

Desde 1952, la enfermedad se ha diseminado a diversas partes del mundo, incluyendo América. En 2013, se reportaron casos de Chikungunya en las islas caribeñas de St. Martin y otras islas vecinas. A mediados del siguiente año, El Salvador, Estados Unidos, Costa Rica, Panamá y Venezuela reportaron casos de CHIKV. Posteriormente Guatemala, Brasil, Colombia, Nicaragua y México (principalmente en el sureste del estado de Chiapas) reportaron Chikungunya¹⁹. Hasta el momento en México se ha identificado el genotipo Asiático²⁰, y se encuentra presente en 26 de los estados de la república mexicana.

1.1.2. Características del virus

CHIKV es miembro del género alfavirus que pertenece a la familia *Togaviridae*. Es un virus de 60-70 nm de diámetro, icosaédrico, envuelto por una bicapa lipídica derivada de la célula infectada. La envoltura está compuesta por 240 copias de los heterodímeros de las glicoproteínas transmembranales E2 y E1 que forman espículas en su superficie. Su genoma está constituido por RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, de un tamaño aproximado de 11 800 nt. En el extremo 5', tiene un cap de 7-metilguanosa trifosfato, mientras que el extremo 3' tiene una cola de poli A. Tiene dos marcos de lectura abierta (ORF, open reading frame) que codifican para dos poliproteínas: la no estructural que consiste de 4 proteínas (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) y la poliproteína estructural que da origen a 6 proteínas (C (Cápside), E3, E2, 6k, TF y E1)²¹ (Figura 1).

CHIKV puede replicarse en diversas células como fibroblastos, macrófagos, células epiteliales y endoteliales²². No se han identificado receptores específicos, sin embargo, los glucoaminoglicanos, que están expresados en varios tipos celulares susceptibles, podrían servir de factores de adhesión para incrementar la infectividad²¹. Recientemente se ha reportado que la molécula de adhesión Mxra8 funge como mediador de entrada para múltiples alfavirus, entre ellos, CHIKV²³.

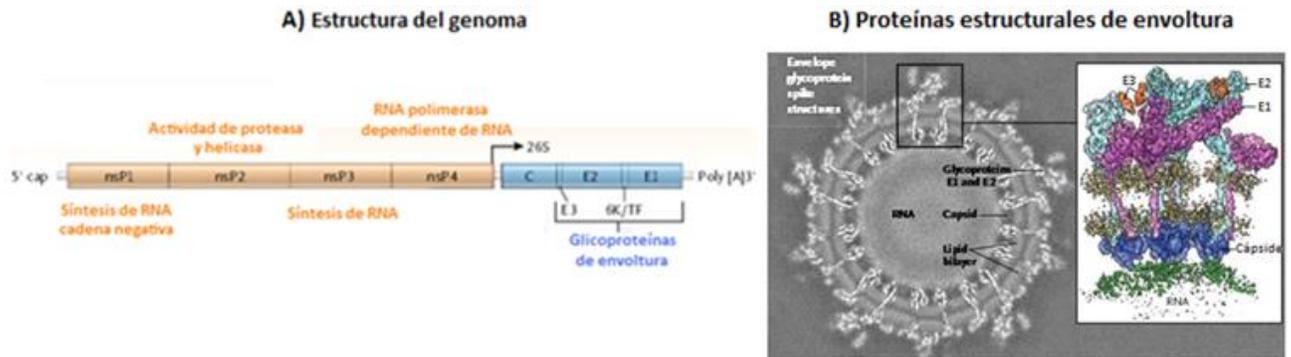


Figura 1. Virus Chikungunya. A) Organización del genoma viral que incluye las proteínas no estructurales (nsP1-nsP4) y las proteínas estructurales (C, E1-E3, 6K/TF). B) Modelo de la estructura y organización de las proteínas de envoltura del virus. Del lado izquierdo se muestra una fotografía electrónica de la conformación de la partícula viral, y en el lado derecho es un modelo computacional de la organización de las espículas del virus (Modificado de Weaver, S. C., 2015).

Con respecto a las proteínas virales, en la siguiente tabla se resume sus funciones:

Tabla 1. Proteínas del virus CHIKV y sus funciones

Proteínas no estructurales	Función
nsP1	Actividad de metiltransferasa y guanililtransferasa para el cap del RNA viral; media el anclaje a membrana del complejo de replicación viral ²¹ .
nsP2	Actividad de helicasa, NTPasa y trifosfatasa de RNA; proteasa de cisteína responsable del procesamiento de la poliproteína no estructural ²¹ .
nsP3	Fosfoproteína con actividad aún desconocida; contiene región de macro y SH3 dominio; probable interacción con proteínas del huésped ²¹ .
nsP4	Polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp: RNA-dependent RNA polymerase); actividad de transferasa ²¹ .

Proteínas estructurales	Función
Cápside (C)	Encapsula el RNA genómico para formar la nucleocápside; el dominio carboxil es un proteasa autocatalítica de serina ²¹ .
pE2	Intermediario constituido de E3 y E2; procesado por la proteasa furina.
E3	El dominio N-terminal sin procesar es el péptido líder para E2; funciona como chaperona que impide la exposición del péptido de fusión de E1 durante el egreso ²¹ .
E2	Media la unión a receptores y factores de adhesión en la membrana celular; principal antígeno de anticuerpos neutralizantes ²¹ .
6K	Péptido líder para E1; Canal iónico putativo; puede incrementar la salida del virión ²¹ .
TF	Proteína originada a partir del cambio de lectura por el ribosoma; canal iónico putativo; puede incrementar la salida del virión ²¹ .
E1	Proteína de fusión tipo II; media la fusión de la envoltura viral y celular ²¹ .

1.1.3. Ciclo de replicación

Las partículas virales adheridas a la célula, a través de la proteína E2, son internalizadas principalmente por endocitosis mediada por receptor vía clatrina. La acidificación del endosoma provoca cambios conformacionales en la proteína de envoltura viral, promoviendo la exposición e inserción de la proteína de fusión E1 a la membrana del huésped, la cual conlleva a la fusión de la envoltura viral y membrana del endosoma. Siguiendo con la liberación de la partícula viral al citoplasma, la nucleocápside se desensambla, liberando el RNA genómico viral (vRNA) al citosol para su traducción. Primero se traduce el precursor poliproteico no estructural P1234, el cual es procesado por la proteasa viral nsP2, dando como producto a P123 y nsP4. Estas dos proteínas, junto con otras proteínas del huésped, llevan a cabo la síntesis de la cadena negativa del vRNA. La

acumulación de P123, promueve el procesamiento proteolítico completo del polipéptido, resultando en el “switch” del complejo de replicación, empleando ya la cadena negativa de vRNA como molde para la amplificación del genoma de cadena viral positiva, así como la transcripción de la cadena subgenómica de vRNA, que codifica al polipéptido estructural. Una vez sintetizada la poliproteína estructural, la cápside es liberada de ésta mediante una actividad autocatalítica. La traducción de la poliproteína estructural continúa, generando una producción mayoritaria de E3-pE2-6k-E1 y, en menor cantidad, E3-pE2-TF; posteriormente ambas poliproteínas estructurales son transportadas a través del sistema secretor, donde son cortados por proteasas del huésped. Las glicoproteínas pE2 y E1 permanecen unidas formando un heterodímero, que es transportado hacia la membrana plasmática. Es en este paso cuando la maduración de pE2 se lleva a cabo a través de la furina, lo cual origina las glicoproteínas E3 y E2. Este proceso es imprescindible para la formación de virus maduros infecciosos. Finalmente, se lleva a cabo el reclutamiento de nucleocápside intactas a las glicoproteínas de envoltura asociadas a membrana, que conlleva a la gemación de partículas ensambladas en la membrana plasmática²¹ (Figura 2).

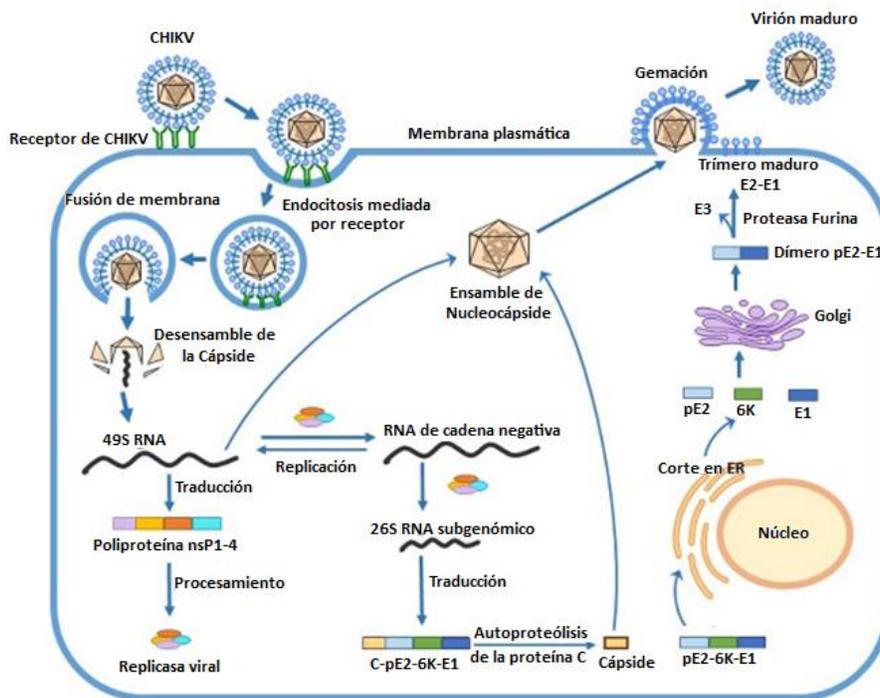


Figura 2. Ciclo viral CHIKV. La entrada del virus CHIKV a la célula esta mediada por endocitosis. Dentro del endosoma, el pH ácido promueve la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma, liberando la nucleocápside al citoplasma. La nucleocápside se desensambla, y el vRNA puede ser ya traducido para sintetizar las proteínas no estructurales nsP1-nsP4. Después de procesarse, las proteínas no estructurales forman el complejo de replicación viral, el cual cataliza la síntesis de la cadena negativa de RNA que sirve como molde para la síntesis de la cadena positiva del genoma viral y el RNA subgenómico (26s). El RNA subgenómico es traducido para la síntesis de la poliproteína estructural (C-E3-E2-6K-E1), la cual es procesada para obtener las proteínas estructurales individuales. Posteriormente los componentes virales se ensamblan, y las partículas virales ensambladas son liberadas mediante gemación a través de la membrana plasmática, y en donde adquieren la envoltura con las glicoproteínas virales (Modificado de Abdelnabi, R., *et al*, 2015).

1.2. Virus Dengue

1.2.1. Epidemiología de la enfermedad

Existen 4 serotipos de DENV, basado en sus propiedades antigénicas: 1, 2, 3 y 4²⁴. Estos serotipos circulan en la zona tropical y subtropical del mundo, y cualquiera de ellos son capaces de provocar la enfermedad. En América, las epidemias de Dengue (y Fiebre amarilla), fueron controladas por diversas campañas iniciadas en 1947 por la Organización Pan Americana de Salud (PAHO, Pan American Health Organization)²⁵. Aunque el Dengue en el continente americano se remonta a más de 200 años, fue hasta 1941 cuando se registraron los primeros casos en la república mexicana y actualmente encontramos los 4 serotipos, y en algunas entidades hay evidencia de la circulación simultánea de dos o más serotipos²⁶.

1.2.2. Características del virus

DENV pertenece a la familia *Flaviviridae*. Es un virus envuelto de aproximadamente 50 nm, con estructura icosaédrica. Posee un genoma de RNA monocatenario de cadena positiva, de aproximadamente 10.6kb de longitud, en donde su extremo 5' tiene un cap de 7-metilguanosa trifosfato, y en su extremo 3' carece de cola de poli A, pero posee una estructura de asa terminal conservada²⁷. Presenta un solo ORF que codifica para una sola poliproteína que da origen a 3

proteínas estructurales: Cápside (C), precursor de membrana (prM) y envoltura (E), siendo esta última esencial para la entrada del virus a la célula, y forman parte del virión; y 7 proteínas no estructurales, que están involucradas en la replicación viral: NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B y 5^{28,29}. En relación con su envoltura, posee dos proteínas de membrana externa que son la proteína E y M (previamente procesada), y su genoma está asociado con la proteína C. El único polipéptido obtenido de la traducción es procesado por una combinación de proteasas celulares y una serin proteasa conformada por NS2B y NS3²⁴ (Figura 3).

DENV se une a sus células blanco a través de diferentes factores de adhesión, incluyendo glicosaminoglicanos (heparan sulfato), lectinas tipo C (DC-SIGN (CD209), receptor de manosa (CD206)), y proteínas inmunomoduladores (receptores TIM/TAM). Existen diversas células blanco para la infección con el virus DENV *in vivo*, como monocitos, macrófagos, CDs, mastocitos, hepatocitos, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales³⁰.

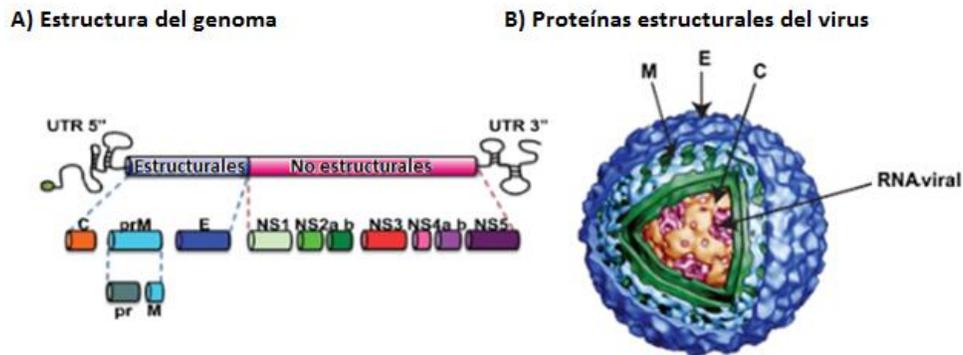


Figura 3. Características del virus DENV. A) Organización del genoma viral, incluyendo las proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) y las proteínas estructurales (C, prM, E). B) Estructura y organización de las proteínas estructurales del virus. M = membrana, C = Cápside, E = envoltura (Modificado de Angel RMd, *et al.*, 2013).

Con respecto a la función de las proteínas virales, se encuentran resumidas en la siguiente tabla:

Tabla 2. Proteínas y funciones de las proteínas virales de DENV

Proteínas no estructurales	Función
NS1	Forma dímeros o hexámeros asociados a balsas lipídicas y se encuentra soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular; puede estimular al sistema inmune ^{24,31} .
NS2A	<i>In vitro</i> promueve el ensamblaje y la replicación viral ^{24,31} .
NS2B	Posee una región hidrofóbica que ancla a la membrana del retículo endoplásmico el complejo NS2B/NS3, y luego de un procesamiento proteolítico, un pequeño dominio hidrofílico de NS2B recién liberado interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3 para actuar como cofactor de ésta ^{24,31} .
NS3	En su extremo N-terminal posee un dominio similar a la tripsina, que actúa hidrolizando los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 del polipéptido; y en el C-terminal otro dominio con distintas actividades enzimáticas: NTPasa, helicasa del RNA. También es la encargada de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del retículo endoplásmico (reclutando enzimas celulares de la vía de síntesis de lípidos), para garantizar el inicio del ensamblaje. Participa en el transporte intracelular ^{24,31} .
NS4A	Se cree que es cofactor de NS3; en su extremo C-terminal posee un fragmento llamado 2k que actúa como péptido señal de traslocación para NS4B al lumen del retículo endoplásmico. Capacidad de generar los rearrreglos membranales para la formación de los complejos de replicación viral ^{24,31} .
NS4B	Induce autofagia en células epiteliales; bloquea la fosforilación de STAT1; modulador negativo de NS3 ^{24,31} .
NS5	Es la más conservada entre la familia de los flavivirus. Su extremo N-terminal posee actividad de metiltransferasa y guanidiltransferasa; en el C-terminal está el dominio de RdRps. También posee una señal de localización nuclear ^{24,31} .

Proteínas estructurales	Función
Cápside (C)	Forma el complejo nucleocápside que protege al RNA viral de la degradación, y promueve la organización del RNA en el interior de la partícula viral en formación ^{24,31} .
prM/M	Participan en el proceso de maduración de la partícula viral. prM es procesada por la proteasa furina, generando pr y M. La proteína M puede inducir apoptosis y daño tisular ^{24,31} .
E	Posee 3 dominios denominados I, II, III y se distribuye sobre la superficie del virus. El dominio I está localizado en el centro; el dominio II contiene el péptido de fusión, y participa en la entrada del virus a la célula, también contiene el principal epítipo de reacción cruzada entre los miembros de la familia <i>Flaviviridae</i> ; y el dominio III que participa en la unión con el receptor celular. Es el principal inmunógeno productor de anticuerpos neutralizantes ^{24,31} .

1.2.3. Ciclo de replicación

El primer paso en la infección requiere de la interacción entre la partícula viral y el receptor presente en la superficie de la célula huésped, siendo la glicoproteína E la que interacciona con el receptor a través de su dominio III. La internalización del virus es principalmente por endocitosis mediada por receptor vía clatrina. Una vez en el endosoma, el pH ácido provoca un cambio conformacional en la proteína E, exponiendo el dominio II y llevando a cabo la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma. La nucleocápside viral es liberada al citoplasma. El genoma viral es traducido como una sola poliproteína que subsecuentemente es procesada co- y postraduccionalmente por la proteasa viral NS3 y proteasas del huésped para dar lugar a 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales. Las NSs comienzan con la replicación viral. El vRNA recién sintetizado es empaquetado posteriormente por la proteína C para formar la nucleocápside. Las proteínas prM y E forman heterodímeros que son orientados en el lumen del retículo

endoplásmico. Luego los heterodímeros prM/E se asocian en trímeros. La partícula inmadura formada en el retículo endoplásmico madura a lo largo del viaje a través del sistema de secreción. El cambio de pH ácido del transgolgi activa la disociación del heterodímero prM/E y la molécula prM ahora protege el péptido de fusión de la proteína E. Posteriormente, la furina corta a la proteína prM que da lugar a las proteínas pr y M, quedando la pr asociada al virión hasta que el virus es secretado al medio extracelular. Después de la disociación de pr, los viriones maduros están formados y son capaces de infectar nuevas células³¹ (Figura 4).

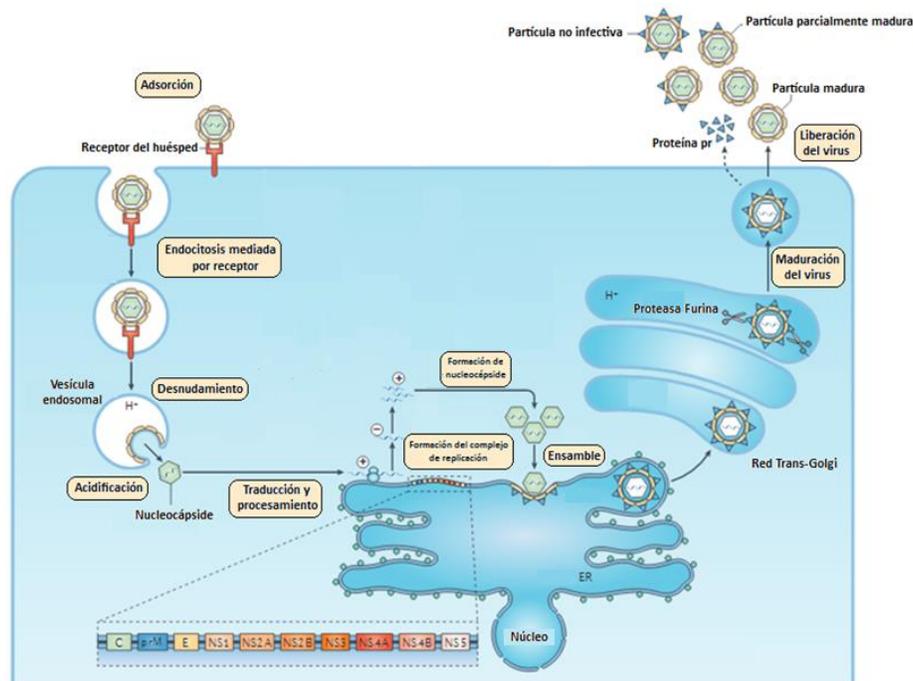


Figura 4. Ciclo viral DENV. La entrada del virus DENV a la célula esta mediada por endocitosis. Acidificación del endosoma produce un cambio conformacional en el virión, resultando en una trimerización irreversible de la proteína E, exponiendo el péptido de fusión. Este péptido media la fusión entre las membranas del endosoma y la viral, permitiendo la liberación de la nucleocápside al citoplasma. El vRNA es liberado y llevado a RE, en donde es traducido a una poliproteína que es procesada por proteasas virales y del huésped. Después de que el complejo de replicación es sintetizado, la traducción del vRNA se detiene y empieza la síntesis del RNA antisentido, el cual servirá de molde para la amplificación del vRNA. El vRNA recién sintetizado es empaquetado por la proteína C, formando la nucleocápside. El ensamblaje viral ocurre en la superficie del RE, resultando en partículas virales inmaduras, no infectivas. Estas partículas son transportadas a través de la red Trans-Golgi. La proteasa Furina corta entre pr y M, con la proteína pr asociada al virión hasta su liberación al medio extracelular (Modificado de Sreaton, G., *et al.*, 2015).

1.3. Coinfecciones en la naturaleza

Existe mucha información acerca de infecciones virales endógena en todos los dominios de los seres vivos, por lo que las coinfecciones virales son comunes en la naturaleza, sin embargo, rara vez se han estudiado en conjunto⁴. Hay ejemplos importantes del efecto deletéreo de coinfecciones en humanos, por lo que es fundamental comprender los factores que contribuyen a estas coinfecciones.

Una coinfección puede definirse como la presencia simultánea de dos o más infecciones, que pueden incrementar la severidad y duración de una o ambas enfermedades (Segen's Medical Dictionary, 2011). En clínica se reporta una coinfección si el paciente es serológicamente positivo para IgM y/o presencia de RNA viral a través de RT-PCR de dos o más virus al mismo tiempo³². La coinfección puede darse en la misma célula o en diferentes tipos celulares dentro del mismo organismo⁴. Cuando una célula u organismo esta coinfectado, un virus usualmente influye sobre la replicación del otro virus, dando como posible resultado una supresión competitiva de un virus sobre el otro. A este fenómeno se le conoce como interferencia viral. Además de la interferencia, también se puede promover la replicación viral de uno o ambos, o no tener efecto alguno sobre los virus que están coinfectando³³. Por ejemplo, se ha reportado que el virus de la hepatitis D (HDV) sólo puede establecer infección en personas que también están infectadas con el virus de la hepatitis B (HBV), dado que HDV requiere de la glicoproteína de HBV para producir partículas infecciosas³⁴. En otro estudio se ha observado que el virus de la hepatitis C (HCV) incrementa su producción de partículas infectivas bajo un contexto de coinfección con el virus Epstein-Barr (EBV), debido a la proteína EBNA1 de EBV que transactiva los genes de HCV⁷. Por otro lado, el virus del herpes 7 (HHV7) altera la expresión de los receptores de superficie de las células T, impidiendo que el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) pueda ingresar a esta célula, por lo que el HHV7 estaría compitiendo directamente con HIV por los sitios de unión, y controlando la infección de este virus³⁵.

Como puede observarse, las VVI con el huésped puede alterar las dinámicas de infección, modificar la evolución viral, además de cambiar la progresión de la enfermedad en el huésped. Sin embargo, con respecto a coinfecciones por DENV y CHIKV se conoce muy poco a pesar de que ya existen diversos reportes de este fenómeno a nivel global¹⁰.

1.4. Epidemiología y patología de la coinfección DENV-CHIKV

De acuerdo con estudios recientes y reportes de la OMS, CHIKV y DENV son transmitidos principalmente por 2 vectores: *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. El primero predomina en ambientes urbanos y se alimenta casi exclusivamente del humano. *Ae. albopictus* se ubica más a menudo en zonas periurbanas y rurales, y se mantiene de primates, roedores y aves. Estos mosquitos se localizan principalmente en zonas tropicales y subtropicales, y su presencia condiciona la prevalencia de DENV y CHIKV en esas regiones, favoreciendo la existencia de la coinfección DENV-CHIKV⁹.

Las primeras coinfecciones DENV-CHIKV fueron reportadas en 13 países, siendo Tailandia, en 1962, el primer país donde se reportaron 4 casos positivos de coinfección en 150 muestras analizadas³⁶. La figura 5 muestra el rastreo global de la incidencia de la coinfección DENV-CHIKV de 1962 hasta el 2016⁹.

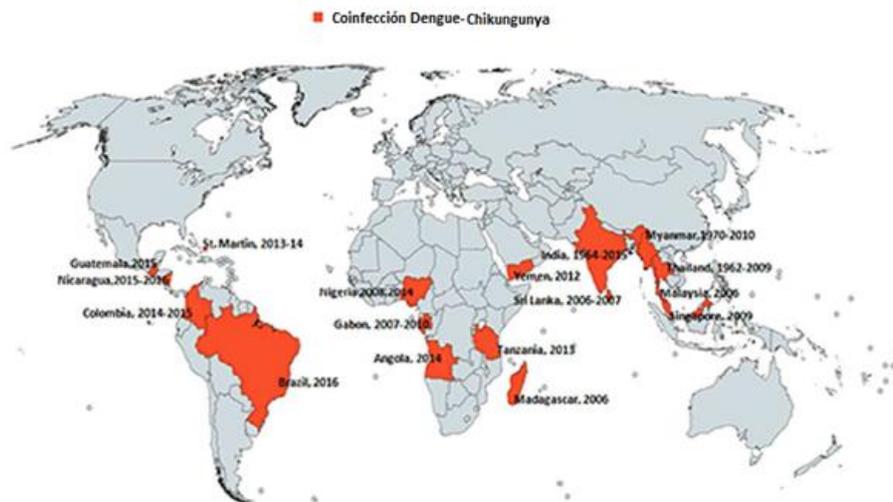


Figura 5. Distribución global de coinfección DENV-CHIKV (Modificado de Jain, J., et al., 2017).

Desde una perspectiva de salud pública, la preocupación de las coinfecciones reside en su posible impacto en la patogénesis y el desarrollo de las enfermedades graves de Dengue y Chikungunya, siendo la mayor preocupación de que la coinfección DENV-CHIKV pueda incrementar la incidencia de las manifestaciones clínicas severas del Dengue³.

Con respecto a la clínica y la coinfección con estos virus, se conoce muy poco y aún no es clara su asociación entre la severidad de las enfermedades y la presencia concomitante de ambos virus. En un estudio se observó que pacientes coinfectados con DENV-CHIKV presentaron una clínica severa con un alto índice de mortalidad a comparación de las mono infecciones¹². Las transfusiones sanguíneas, así como la respiración asistida fueron más altas para los pacientes con coinfección. Chahar y colegas también reportaron el sistema nervioso central comprometido y manifestaciones hemorrágicas¹³. Caso contrario con otro estudio, en donde no se encontró asociación entre determinada clínica y la coinfección^{2,14}.

1.5. Efecto de la coinfección sobre DENV y CHIKV

Existen dos formas de coinfectarse: la primera es que el mosquito está infectado con ambos virus previo a inocular al huésped (infección simultánea); y la otra es que un mosquito infectado con uno de los dos virus infecte al huésped, y posteriormente, otro mosquito infectado con el otro virus inocule a ese mismo huésped. A este último se le conoce como superinfección³³ (Figura 6).

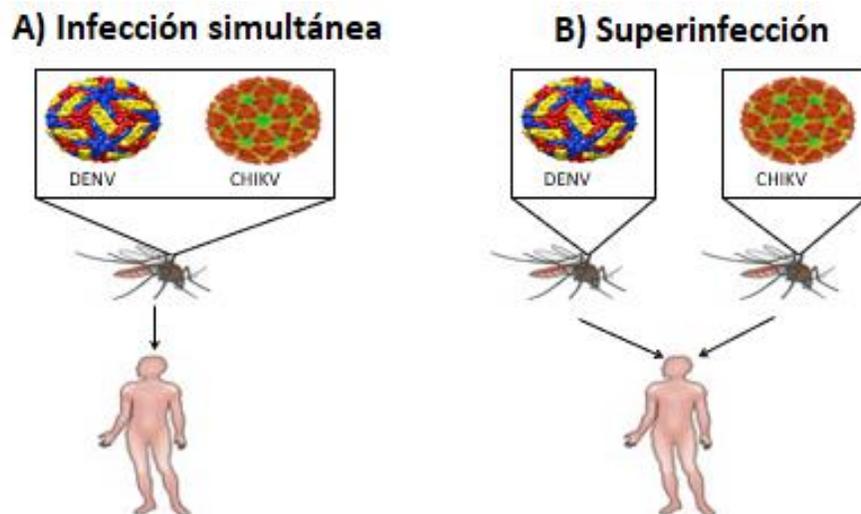


Figura 6. Modelos de coinfección. A) Infección simultánea: un mosquito coinfectado infecte al paciente con ambos virus. B) Superinfección: un mosquito mono infectado inocula al paciente, y posteriormente llega otro mosquito infectado solamente con el otro virus e inocula al paciente.

Estudios recientes han demostrado que *Ae. albopictus* puede coinfectarse con los virus DENV y CHIKV por vía oral, ambos virus pueden replicar simultáneamente en el mosquito, y que éste tiene la habilidad de liberar las partículas de ambos de manera concomitante en un solo piquete vía saliva^{37,38}. Otro estudio muestra que las glándulas salivales e intestino de *Ae. aegypti* pueden coinfectarse con DENV y CHIKV. Interesantemente, cuando analizaron los extractos de glándula salival observaron que la replicación de DENV aumentaba bajo un contexto de coinfección, y no así para CHIKV. Por lo que ellos concluyeron que la coinfección tiene un efecto positivo sobre DENV³⁹. En un ensayo con células de mosquito C6/36 también observaron que la coinfección DENV-CHIKV tenía un efecto sobre estos virus. Ellos demostraron que DENV-3 exhibe supresión competitiva sobre CHIKV cuando se infecta con un alto índice de multiplicidad (MOI=1.0), comparado con CHIKV (MOI=0.1). La coinfección se estableció cuando había más CHIKV (MOI=1.0) que DENV-3 (MOI=0.1). Sin embargo, la coinfección no pudo establecerse cuando ambos se infectaron individualmente en una superinfección¹⁵.

Con respecto al huésped mamífero, muy poco se conoce acerca de las interacciones que son establecidas por DENV, CHIKV y su célula huésped durante la coinfección. DENV y CHIKV comparten algunas células blanco, además de tener mecanismos similares de entrada, replicación y salida durante su infección, por lo que podría suponerse una interacción cooperativa o competitiva supresora entre ellos durante este fenómeno³. En un estudio realizado en Gabón, África central, se observó que los pacientes coinfectados con DENV-2 y CHIKV tenían una carga viral menor de ambos virus a diferencia de los pacientes mono infectados, sugiriendo que ambos ejercen un efecto supresor sobre cada uno². Por su parte, Silva Ruiz y colaboradores reportaron que la coinfección tiene un efecto positivo en DENV cuando se infectan simultáneamente con DENV y CHIKV células mononucleares de sangre periférica. Ellos observaron que la

replicación de DENV se ve incrementada bajo un contexto de coinfección, y viceversa para el caso de CHIKV⁴⁰.

Esta interferencia viral observada tanto en el vector como en el huésped puede estar mediada por factores como interferón⁴. La respuesta de interferón tipo I (IFN-I) es el principal mecanismo efector de la inmunidad innata. IFN-I activa la expresión de una serie de genes conocidos como genes estimulados por IFN (ISGs, *IFN-stimulated genes*) tanto en células infectadas como en las aledañas no infectadas. Los productos de la expresión de ISGs están involucrados en diversas vías de señalización, aunque las más importantes son las que generan un estado antiviral en la célula, afectando diferentes mecanismos de la replicación viral⁴¹. Por otro lado, se ha observado que DENV y CHIKV contribuyen al apagado de los mecanismos antivirales de la célula, creando un ambiente favorable para la replicación viral. En el caso de DENV, casi todas las NSs son capaces de alterar la respuesta de IFN-I. NS2A y NS4B inhiben la respuesta de IFN- α e IFN- β al bloquear la activación y traslocación de STAT 1 al núcleo y la subsiguiente transcripción de genes antivirales. También la actividad proteolítica de NS2B/NS3 está involucrada en la inhibición de IFN-I, al degradar la proteína STING (stimulator of interferon gene) en las células dendríticas. La proteína NS5 interactúa con STAT 2, promoviendo su degradación vía proteosoma^{42,43}. Para CHIKV se ha visto que nsP2 es un potente inhibidor de IFN-I mediante el bloqueo de la fosforilación de STAT 1 y su traslocación al núcleo⁴⁴ (Figura 7). Por lo tanto, puede suponerse que los efectos de las proteínas no estructurales de ambos virus son sinérgicos para crear un control más eficiente de la respuesta antiviral celular que puede beneficiar a uno o ambos virus.

Otras formas de interferir la replicación viral durante la coinfección son a través de la producción de proteasas de *trans*-activación, factores celulares, producción de partículas virales defectuosas, RNA de interferencia, entre otras³³.

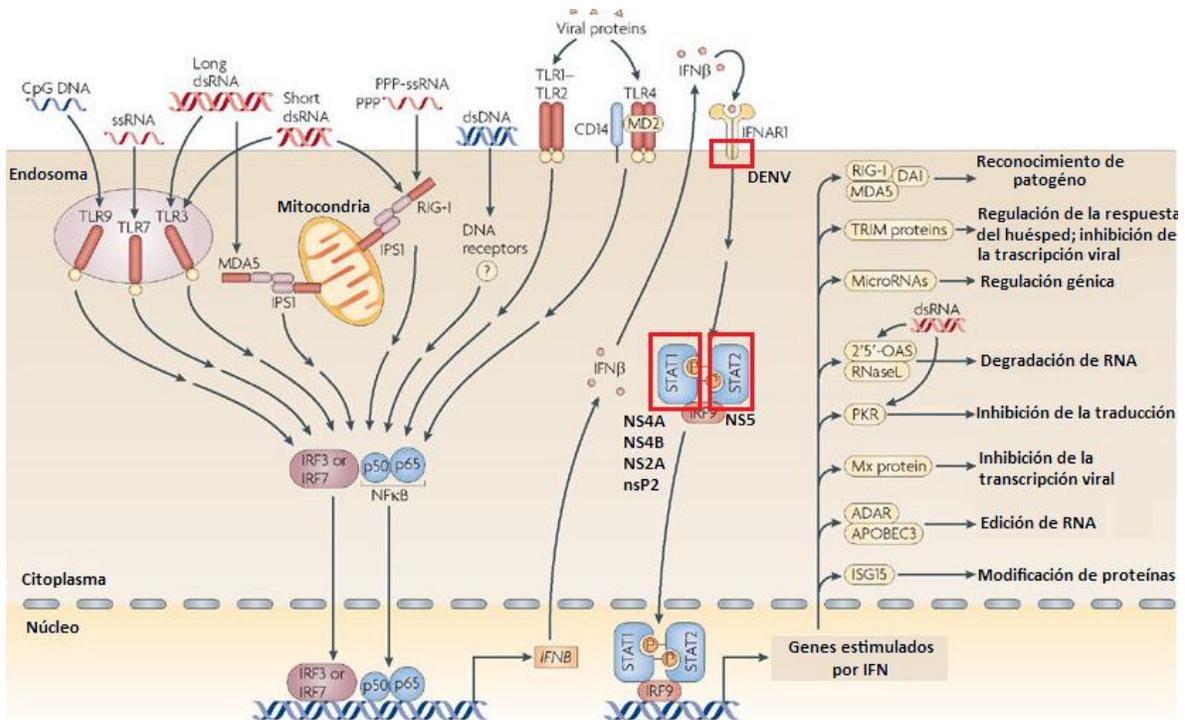


Figura 7 Activación de la respuesta de IFN iniciada por la detección de patrones moleculares virales, en donde se resaltan algunas de las proteínas que se ven afectadas durante una infección con DENV o CHIKV (cuadros rojos) (Modificado de Bowie A., *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

El abordaje empleado para el estudio de los virus ha sido principalmente de manera individual, sin embargo, en la naturaleza es común encontrar VVI en el huésped, y estas interacciones pueden ser críticas para entender mejor la patogénesis y evolución viral⁴.

Dengue y Chikungunya son transmitidos por el mismo vector y son considerados como un riesgo sanitario. En diferentes partes del mundo se ha encontrado coinfecciones (incluyendo México)¹⁰. Hay poca información con respecto a las coinfecciones por DENV y CHIKV, por lo que resulta importante estudiar esta dinámica viral para empezar a comprender este fenómeno y sus posibles implicaciones a nivel celular, y posteriormente, en el organismo.

Las células de la piel son las primeras células que entran en contacto con los virus cuando el mosquito se alimenta, por lo que es fundamental evaluar la interacción DENV-CHIKV en estas estirpes celulares.

3. HIPÓTESIS

En un modelo de coinfección DENV-CHIKV, el virus DENV tendrá un efecto supresor sobre el virus CHIKV, y la presencia de IFN-I influirá en este fenómeno.

4. OBJETIVOS

▪ OBJETIVO GENERAL

Evaluar la dinámica viral de DENV y CHIKV bajo un contexto de coinfección, analizando las tasas de replicación de cada virus, infección productiva y el papel que tiene el interferón de tipo I en las monoinfecciones y en la coinfección.

▪ OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una cinética de infección con los virus DENV, CHIKV y DENV-CHIKV a distintos tiempos (6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h).
 - ✓ Determinar si la infección es productiva (determinación de unidades formadoras de placas) para cada virus
 - ✓ Estimar el efecto de la coinfección en la replicación para cada virus.
- Evaluar la dinámica de infección en el contexto de una superinfección.
- Determinar la presencia de IFN-I bajo un ambiente de monoinfección y coinfección.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Biológico

5.1.1. Cultivos celulares

Todas las células se suplementaron con antibiótico-antimicótico al 1X (10 000 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomina y 25 µg/mL de anfoterina B Fingizone), L-glutamina a 2mM, SFB descomplementado al 10% (todos de GIBCO).

- Células HMEC-1

Las células HMEC-1 (células humanas de microvasculatura del tejido endotelial del prepucio) se crecieron en medio base MCDB 131 suplementado, más factor de crecimiento de célula endotelial al 0.1% y 0.4% Hidrocortisona 0.25X (ambos de SIGMA).

- Cultivo primario fibroblastos

Los fibroblastos se crecieron en MEM suplementado, más aminoácidos no esenciales al 1%, vitaminas al 1% y piruvato de sodio al 1% (todos de GIBCO).

- Células VERO

Las células VERO (células epiteliales de riñón del mono verde africano) crecieron en medio base RPMI suplementado.

- Células C6/36

Las células C6/36 (derivadas del mosquito *Ae. albopictus* en estado larvario) se crecieron en medio DMEM suplementado, más aminoácidos no esenciales al 1%, vitaminas al 1% y piruvato de sodio al 1% (todos de GIBCO).

5.1.2. Virus

- Virus DENV serotipo 2

La cepa DENV-2 proviene de un caso de dengue clásico de México, con alta homología con la cepa Nueva Guinea C. Este virus fue donado por el Dr.

Alejandro Escobar Gutiérrez del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de la Secretaría de Salud.

- Virus CHIKV

El virus se aisló de un caso clínico en el Hospital General Agustín O´Horán, localizado en Mérida, Yucatán.

5.2. Métodos experimentales

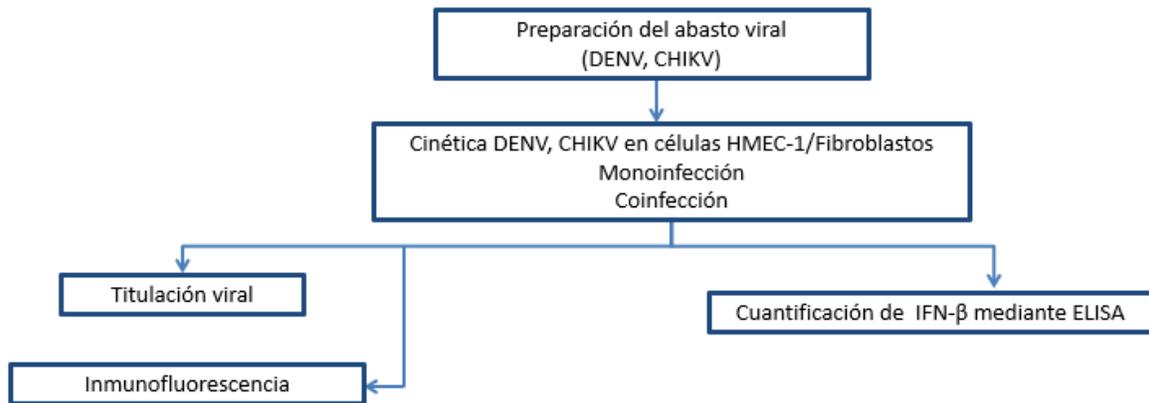


Figura 8. Diagrama de la estrategia experimental empleado

5.2.1. Obtención de suero policlonal contra la proteína E2 de CHIKV

El plásmido pET/E2 se usó para transformar bacterias. Estas bacterias se indujeron para producir la proteína E2. Posteriormente se purificó la proteína recombinante mediante una ronda de geles preparativos SDS-PAGE, de los cuales se cortaron 3 fracciones alrededor del peso molecular calculado para la proteína E2 (arriba, medio y abajo).

Con la proteína rE2 se retaron ratones BALB/c con 30 µg de proteína E2 intraperitonealmente cada 20 días. Se realizaron 4 retos. Antes de cada reto se obtuvo una muestra de 100 µL de suero para su evaluación por ELISA. Al terminar el esquema de inmunización, se recolectó la sangre en su totalidad por punción cardíaca. Se recuperó el suero por centrifugación a 13 000 rpm por 10 minutos y se realizaron alícuotas, las cuales se guardaron a -20 °C.

5.2.2. Propagación y purificación de virus

El virus DENV se propagó en cultivos confluentes de la línea celular C6/36 sin CO₂, y para CHIKV se usaron células VERO en una atmósfera de 5% CO₂; ambos se incubaron a 37°C.

Una vez que se observó efecto citopático (evidenciado por la formación de sincicios) en aproximadamente 60% de las células, se recuperó el sobrenadante y centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante obtenido se colocó en hielo, se concentró en unidades Amicon Ultra-15 (100 kDa; Millipore) a 3 000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, se filtró con un poro de 0.2 µm, y se agregó un décimo de SPG (glicina, polietilenglicol) para su crio-preservación. Se realizaron alícuotas de 30 µL y se almacenaron a -70°C.

5.2.3. Cinética de monoinfección DENV/CHIKV y coinfección DENV-CHIKV

Se plaquearon 80 000 células/0.5 mL por pozo en placas de 24 pozos, cada pozo contenía un cubreobjeto. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂. Posteriormente, se retiraron 300 µL de cada pozo y se infectaron a una multiplicidad de infección de 2 MOI con DENV, CHIKV y DENV-CHIKV (previamente mezclados en un Eppendorf) y se incubaron por 2 horas a 37°C (cada 15 minutos se agitaron). Después de la incubación, se lavaron 2 veces con 500 µL de PBS 1X (*NaCl* 0.5%, *K₂HPO₄* 10 mM, *KH₂PO₄* 2 mM), al final se añadió 500 µL de medio suplementado. Se incubaron a 37°C, con 5% CO₂ y se analizaron a las 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas.

Para la superinfección se plaquearon las células como ya se describió. Posteriormente se retiraron 300 µL de cada pozo y se infectaron a una MOI de 2 con DENV-2 ó CHIKV y se incubaron por 2 horas a 37°C (cada 15 minutos se agitaron). Después de la incubación, se lavaron 2 veces con 500 µL de PBS 1X y se añadió 500 µL de medio suplementado. A las 6 o 12 horas pos-infección se añadió el otro virus a la misma MOI. Las placas se incubaron por 2 horas más a 37°C, con agitación cada 15 minutos, y se lavaron 2 veces con 500 µL de PBS 1X

y se añadió 500 μL de medio suplementado. Finalmente, se incubaron a 37°C , con 5% CO_2 y se analizó el sobrenadante a las 48 horas.

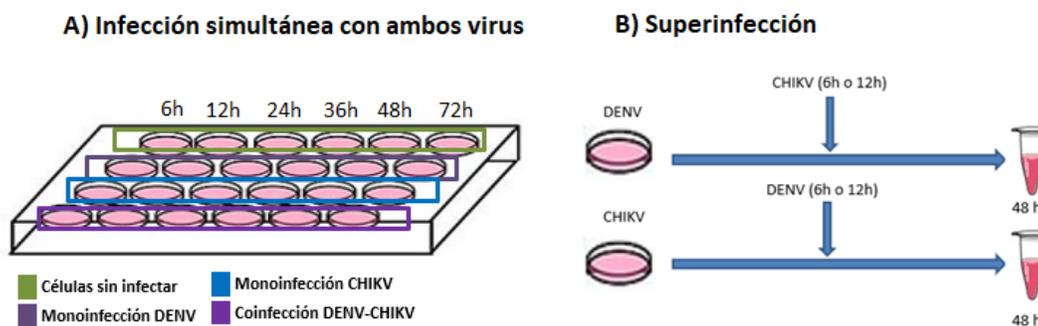


Figura 9. Esquemas representativos del procedimiento que se llevó a cabo para los experimentos de (A) coinfección o (B) Superinfección para analizar la dinámica de replicación viral DENV-CHIKV.

5.2.4. Inmunofluorescencia

A los tiempos indicados pos-infección, se recuperaron los sobrenadantes de cada pozo. Se centrifugaron a 13 000 rpm por 5 minutos y se dividieron en 3 alícuotas de 150 μL cada una a -70°C para su posterior análisis.

Las células de los cubreobjetos se fijaron con 300 μL de paraformaldehído (SIGMA) al 4% durante 20 minutos, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Posteriormente se lavaron con 500 μL de PBS 1X-Tritón 0.1%, para permeabilizarlas con 300 μL de PBS 1X-Tritón 0.1%-Gelatina 0.2% durante 30 minutos, a temperatura ambiente, agitación continua y protegido de la luz. Nuevamente se lavaron con PBS 1X-Tritón 0.1% y se bloquearon con 300 μL de PBS 1X-Tritón 0.1%-suero de chivo 1% por 1 hora, a temperatura ambiente, protegido de la luz y con agitación continua.

Por otro lado, se preparó una cámara húmeda. Se removieron los cubreobjetos de las placas de 24 pozos y se colocaron las células en contacto directo con el anticuerpo. Se dejaron incubando por 1 hora, a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Finalizada la incubación, los cubreobjetos se regresaron a las placas de 24 pozos (cara arriba las células) y se lavaron con PBS 1X-Tritón 0.1%. Se realizó el mismo

proceso, pero ahora con el anticuerpo secundario, y se finalizó con 3 lavados con agua. Las condiciones, así como los anticuerpos empleados se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 3. Concentraciones y combinaciones de los anticuerpos empleados en Inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Anti-NS5 (DENV)	Sobrenadante del hibridoma, se utilizó 20 µL	Cabra Anti-rata IgG- Aleza Fluor 488 (Invitrogen)	1:50
Anti-E2 (CHIKV)	De suero, 1:100	Cabra Anti-ratón IgG-Cy3 (Invitrogen)	1:500

En un portaobjeto, se colocaron 3 gotas (2.5 µL), separadas y a lo largo, de Vecta Shield H-1200 con DAPI (Vector), y sobre cada gota se montó un cubreobjeto. Finalmente se sellaron con barniz y se analizaron con un microscopio confocal espectral Leica (Leica TCS SP5).

5.2.5. Titulación viral

Para la titulación de los virus se plaquearon 130 000 células VERO/0.5 mL por pozo en placa de 24 pozos. Éstas se incubaron a 37°C por 24h en ambiente de CO₂. Al finalizar la incubación, en una placa de 96 pozos se realizaron con un factor de dilución de 10 de los sobrenadantes recuperado. A todos los pozos se les adicionó 225 µL de la solución “Hanks” y al primer pozo 25 µL de la muestra. Para el segundo pozo, se tomaron 25 µL del primer pozo (previamente homogenizado) y se agregaron al segundo; y así sucesivamente hasta tener una dilución final de -6. Las placas de 24 pozos se decantaron y se agregó 100 µL de cada dilución seriada en cada pozo (por duplicado). Estas placas se incubaron a 37°C, en 5% de CO₂ por 1 hora. Finalizada la hora, se añadió a cada pozo (sin remover los 100 µL) 500 µL de medio semisólido “Overlay” y se incubaron a 37°C por 5 días.

Al término de los 5 días, se decantó el contenido de los pozos y se lavaron 2 veces con PBS 1X, esto con el fin de remover el medio semisólido. Posteriormente, las células se fijaron con 500 µL de MeOH al 80% frío, por 10 minutos y a temperatura ambiente. Concluido el tiempo, nuevamente se decantaron y lavaron los pozos con PBS 1X. Al finalizar el segundo lavado con PBS 1X, se le adicionó 1 mL de Solución de bloqueo (leche en polvo sin grasa 5% (Nestlé Carnation), PBS 1X) e incubó por 20 minutos. Posteriormente, se volvió a decantar los pozos y a cada uno se agregó 200 µL de la Solución con el 1er Anticuerpo (Anti-4G2 para DENV; Anti-E2 para CHIKV), y se incubó durante 1 hora, a 37°C con agitación constante. Terminado el tiempo de incubación, se retiró la solución y lavó con 1 mL de la Solución de bloqueo. Se removió la solución y se incubó con 200 µL de la Solución con el 2do Anticuerpo por 1 hora, a 37°C, en agitación continua. Nuevamente se decantaron las placas y se lavaron mínimo 2 veces con PBS 1X. Se dejaron escurriendo las placas por 2 minutos y se agregó a cada pozo 160 µL del reactivo True Blue. Finalmente se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, en agitación continua, para posteriormente decantarlas y contar las unidades formadoras de placas (PFU; plaque-forming units) empleando la siguiente fórmula:

$$PFU/mL = (P)10^{dilución+1}$$

Donde P es el promedio del número de placas líticas obtenido en la dilución que se contaron las placas.

Las condiciones, así como los anticuerpos empleados se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 4. Concentraciones y combinaciones de los anticuerpos utilizados en Titulación de virus

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Anti-4G2 (dirigido a proteína de envoltura de los flavivirus)	1:2000	Cabra Anti-ratón IgG-HRP (Invitrogen)	1:2000

Anti-E2 (dirigido a la proteína E2 de CHIKV)	1:500		
--	-------	--	--

5.2.6. Cuantificación de IFN-β mediante ELISA

La cuantificación de IFN-β se realizó de acuerdo a lo indicado por el Kit (Invivogen). En placa de 96 pozos, se sensibilizó con 100 μL de la solución del anticuerpo de IFN-β (1 μg/mL) en regulador de carbonatos (Na₂CO₃ 1 M y NaHCO₃ 1 M) a pH 9.6 durante 12 horas (o toda la noche) a 4°C. Posteriormente se bloquearon con 200 μL de PBS 1X-Tween 0.05%- BSA 2% durante 2 hora a 37°C.

Se tomaron los sobrenadantes de la cinética y se adicionaron a las placas sensibilizadas (100 μL), las cuales se incubaron a 37°C por 2 horas. Las placas se lavaron 3 veces con PBS 1X-Tween 0.05%, y se agregó 100 μg/mL de anticuerpo biotinilado de IFN- β (50 ng/mL), y se incubó por otras 2 horas. Se lavaron nuevamente con PBS 1X-Tween 0.05%, y se añadió 100 μL de Streptavidina acoplada a luciferasa y se incubó por 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron de nuevo y se adicionó 50 μL de sustrato para luciferasa, y se leyó la luminiscencia inmediatamente en un luminómetro (Synergy H4).

6. RESULTADOS

6.1. Obtención del suero hiperinmune contra CHIKV

6.1.1. Expresión y purificación de la proteína recombinante E2

Una de las herramientas fundamentales para este proyecto es el empleo de anticuerpos específicos contra los virus DENV y CHIKV. En este trabajo se preparó un suero policlonal específico contra CHIKV. Mediante la metodología que se utilizó para la purificación de la proteína (geles preparativos), a partir de las secciones escindidas del gel, se realizó una tinción de azul de Coomasie, donde se observa solamente proteínas alrededor del peso molecular esperado para la proteína rE2 (44kDa) (Figura 10A). Adicionalmente, el análisis por un Western Blot detectó, principalmente en las fracciones Arriba y Medio, una mayor cantidad de la proteína rE2 (Figura 10B). Por lo cual con este antígeno decidimos utilizarlo para generar el suero policlonal.

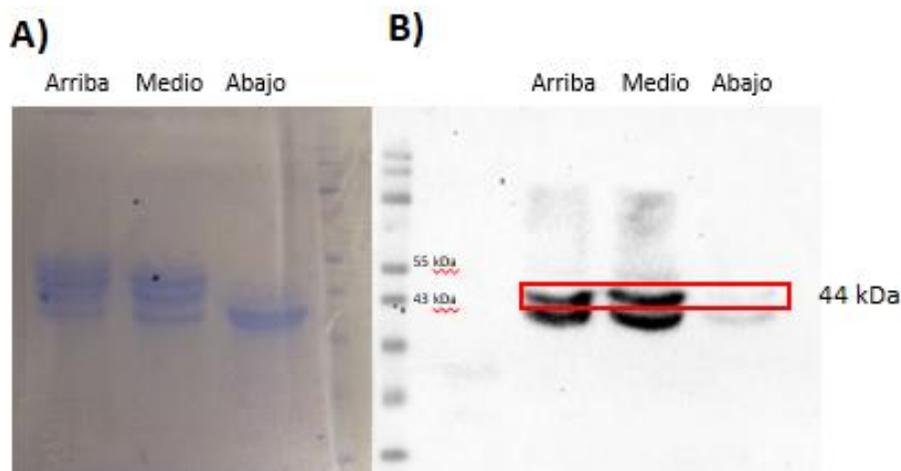


Figura 10. Expresión de la proteína recombinante E2. A) Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes, en donde se observa una mayor abundancia de proteínas del rango del peso de rE2 en las fracciones Arriba, Medio y Abajo. B) Western Blot donde se evidencia la presencia de la proteína recombinante E2 con un peso de 44 kDa, al emplear un anticuerpo contra Histidinas, siendo más abundante en las fracciones Arriba y Medio.

6.1.2. Inmunización y análisis de la inmunogenicidad de la proteína recombinante E2

La proteína rE2 se usó como antígeno para la inmunización de 11 ratones BALB/c. Se dieron 4 retos de 30 µg de proteína en intervalos de 20 días. Se tomaron muestras de suero de cada ratón antes de cada inmunización para evaluar la producción de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante E2, por ensayos de ELISA.

En la figura 11 se observa que en todos los ratones hubo inducción de anticuerpos específicos contra la proteína rE2. Una vez finalizado el esquema de inmunización, se recolectó la sangre de los ratones con de los ratones con mayor respuesta hacia la proteína E2, se recuperó el suero y se realizaron alícuotas para evaluarlo en ensayos de inmunofluorescencia con la finalidad de evidenciar si estos sueros hiperinmunes reconocen la proteína nativa.

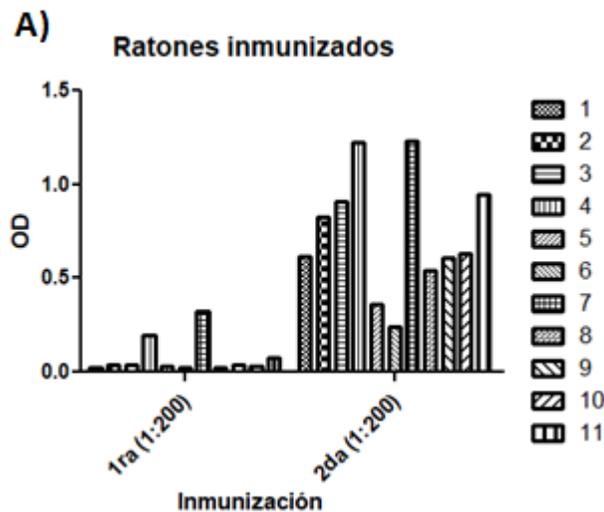


Figura 11. Evaluación del nivel de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante E2 mediante ELISA. Los datos observados en la gráfica son el resultado después de restarle el valor de los sueros preinmunes. La determinación de la densidad óptica se realizó a 450 nm.

6.2. Preparación del abasto viral CHIKV

Por otra parte, se preparó un abasto viral de CHIKV, obteniendo un título de 50 000 000 p.f.u./mL. Este abasto viral fue evaluado por ensayos de inmunofluorescencia en células VERO, las cuales fueron infectadas a 2 MOI por 24h. Se empleó el anticuerpo policlonal de ratón específico contra la proteína E2 del mismo virus generado en el apartado anterior.

La figura 12 muestra una clara señal de la proteína E2, la cual tiene una distribución citoplasmática en las células infectadas, así como un patrón de alargamiento o marañas, las cuales son características de la infección por CHIKV. Además, se determinó la especificidad del suero policlonal al no detectar señal en las células infectadas con el virus inactivado.

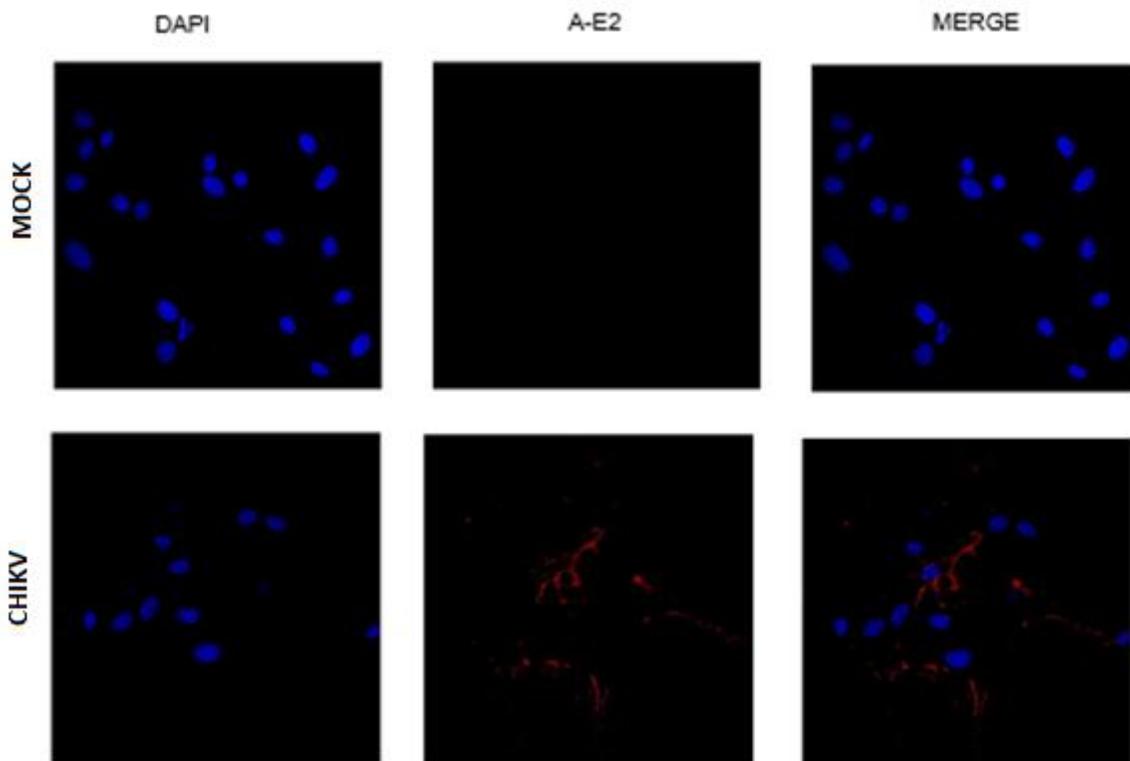
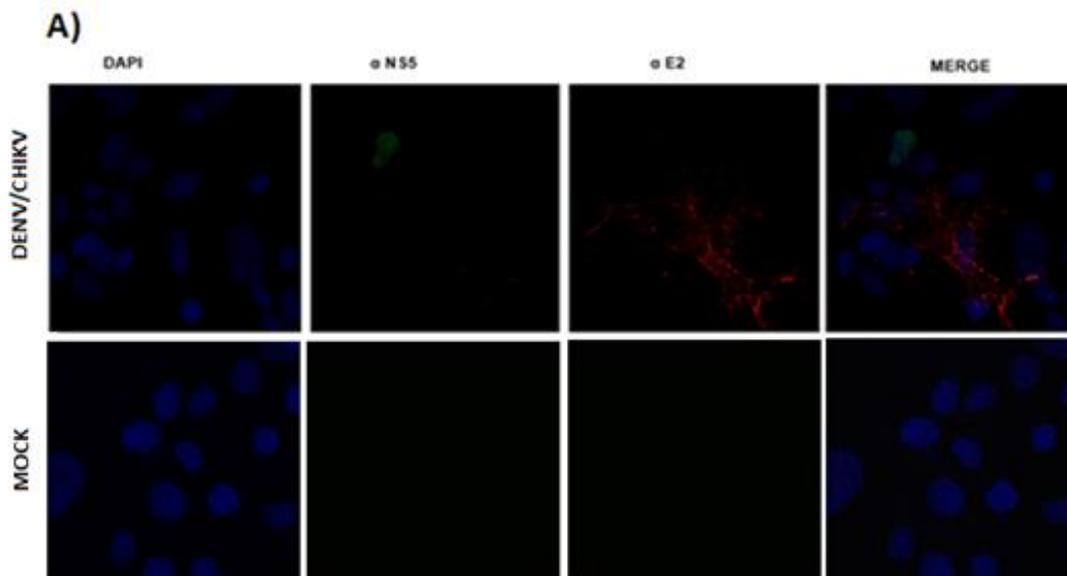


Figura 12. Inmunofluorescencia de células VERO infectadas con el virus CHIKV. Las células se infectaron con 2 MOI y se fijaron 24h después para analizarlas con el suero hiperinmune. En rojo se muestra E2 de CHIKV localizada en el citoplasma de las células infectadas. En azul se observa los núcleos de las células VERO. MOCK: Células infectadas con virus inactivado. CHIKV: Células infectadas con CHIKV.

6.3. Las células HMEC-1 son susceptibles a CHIKV y DENV

Para evaluar la dinámica viral de la coinfección DENV-CHIKV, se caracterizó primero el modelo de las células HMEC-1 infectadas con ambos virus. Las células HMEC-1 se infectaron simultáneamente con DENV y CHIKV a una MOI de 2, y a las 24h pos-infección se analizó la presencia de ambos virus por inmunofluorescencia. En la figura 13A se muestra que las células HMEC-1 están monoinfectadas con DENV (color verde), y con CHIKV (color rojo). Interesantemente, no sólo se observan células infectadas con un solo virus, también podemos observar que una misma célula (evidenciada por Nomarski) puede estar infectada con ambos virus, evidenciada por la presencia del color verde en núcleo (DENV) y rojo en citoplasma (CHIKV) (figura 13B).

Por lo tanto, podemos concluir que nuestro modelo celular es susceptible a la infección de DENV y CHIKV, y puede emplearse para el análisis de la coinfección DENV-CHIKV.



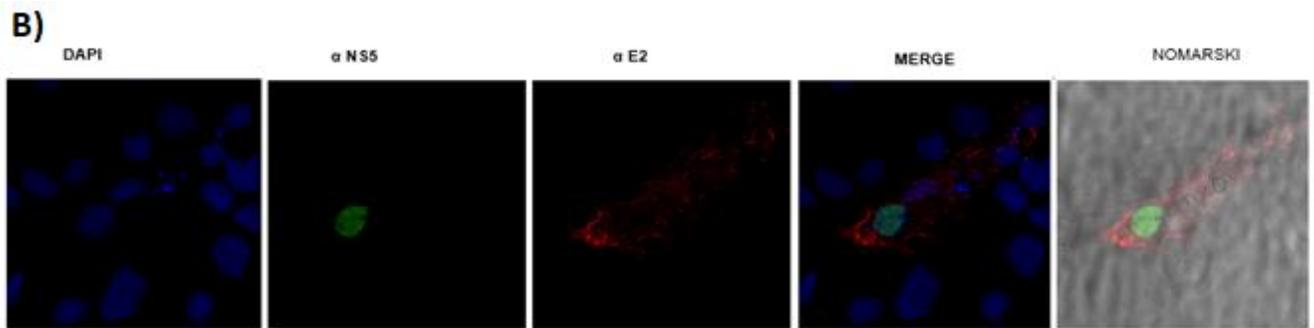


Figura 13. Detección de DENV y CHIKV en células HMEC-1. En la inmunofluorescencia se observa la presencia de DENV mediante la detección de la proteína NS5, que se localiza principalmente en el núcleo (verde), y la presencia del virus CHIKV al detectar la proteína E2, localizada en el citoplasma de la célula (rojo). En azul se muestran los núcleos de las células. A) DENV/CHIKV: Células mono infectadas con DENV y CHIKV; MOCK: Células infectadas con los virus inactivos. B) Célula coinfectada con DENV y CHIKV.

6.4. La infección productiva de DENV disminuye durante la coinfección DENV-CHIKV en células HMEC-1

Para evaluar la dinámica de coinfección, se realizó una cinética para cada virus (DENV y CHIKV) a la par con la coinfección DENV-CHIKV en células HMEC-1. En todos los casos se emplearon 2 MOI. Se tomaron los sobrenadantes obtenidos a las 6, 12, 24, 36, 48 y 72h y se titularon.

La figura 14 muestra las gráficas de la cinética de infección de cada virus y de la coinfección, todas ellas expresadas en unidades formadoras de placas (p.f.u.). Interesantemente se puede observar que las células HMEC-1 son más susceptibles al virus CHIKV que a DENV, ya que se observa una progenie superior en el caso de CHIKV (figura 14B) que en DENV (figura 14A). La producción de partículas de ambos virus aumenta conforme avanza el tiempo, teniendo un máximo a las 48h para DENV, y a las 72h para CHIKV.

Analizando los sobrenadantes de la coinfección, se observa que la infección productiva de ambos virus se ve disminuida. Este efecto es más evidente para DENV, que a las 48h sólo se detectan 1 000 p.f.u./mL, en contraste con su mono infección, en donde se detectaron 4 000 p.f.u./mL, lo que indica una reducción del 75%. Para CHIKV, la producción de partículas infectivas máxima

observada a 72h en la monoinfección fue de 450 000 p.f.u./mL, mientras que en la coinfección disminuyó hasta 150 000 p.f.u./mL, lo que representa un 66% de reducción.

Estos resultados nos indican que la coinfección DENV-CHIKV modifica la producción de partículas infectivas de ambos virus, aunque el efecto fue mayor en DENV.

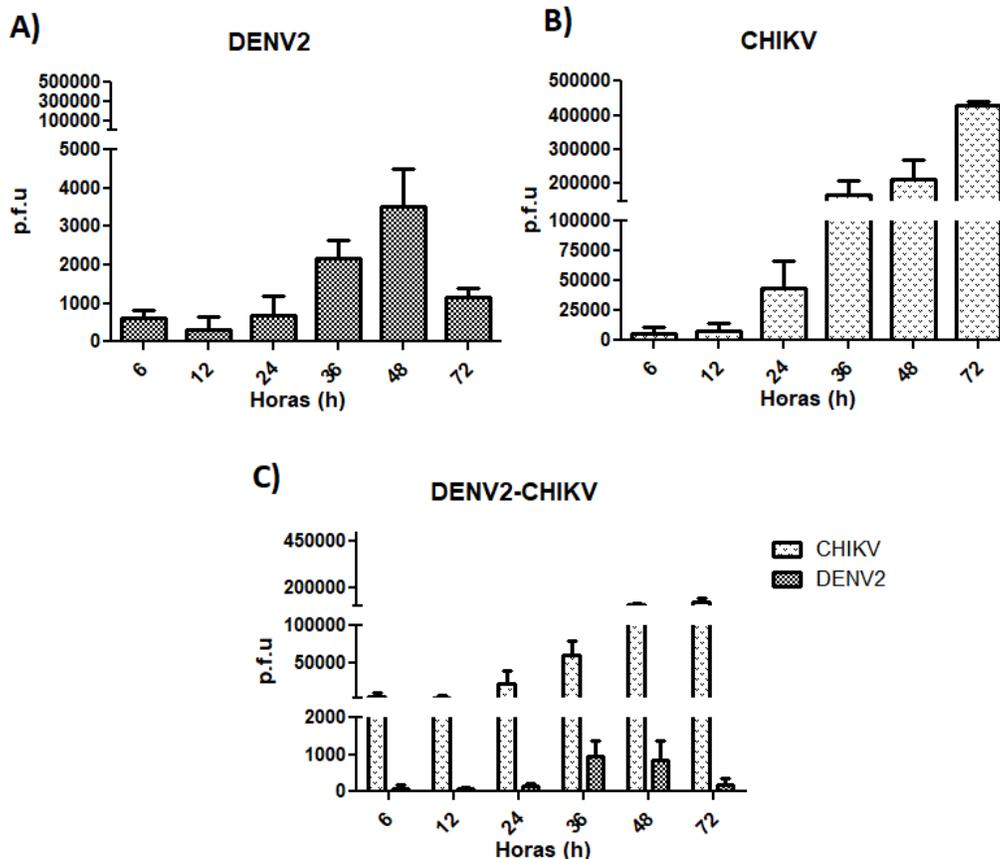


Figura 14. Titulación viral de la cinética de la infección productiva de DENV y CHIKV en células HMEC-1. A) Monoinfección DENV, B) Monoinfección CHIKV. C) Coinfección DENV-CHIKV. Los datos representan el promedio de dos ensayos independientes.p.f.u.: Unidades formadoras de placas.

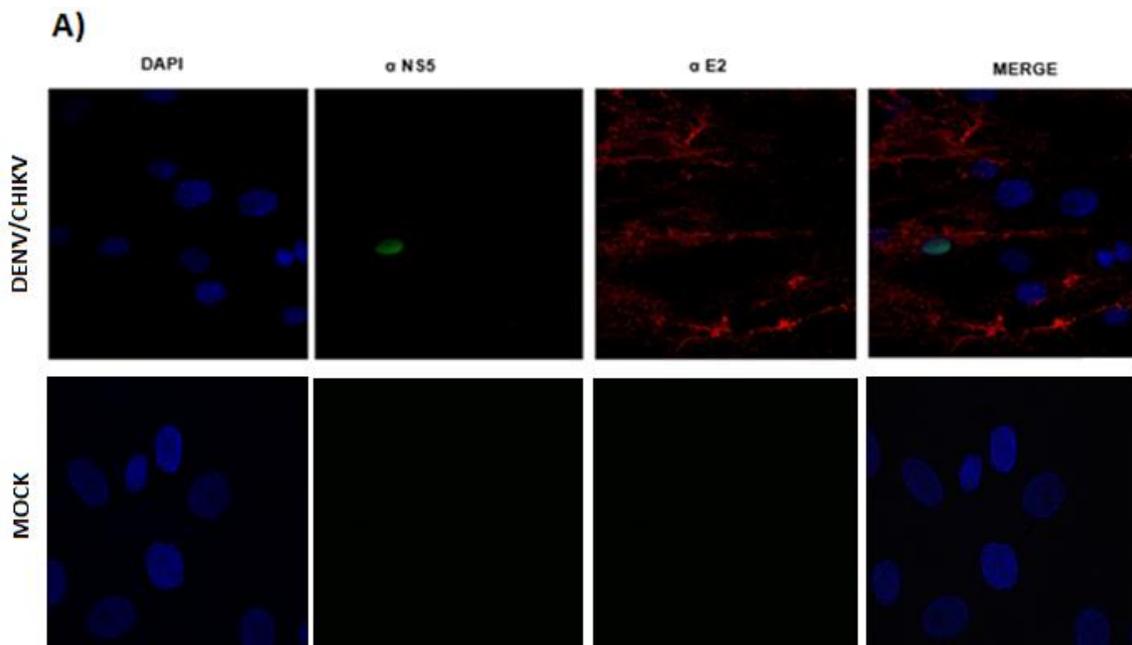
6.5. Los fibroblastos también son susceptibles a DENV y CHIKV

Trabajos previos muestran variaciones en los resultados de coinfección con otros virus cuando se usan células diferentes. Por esta razón se analizó la dinámica viral en un cultivo primario de fibroblastos. Este modelo es importante evaluarlo, dado

que es una de las primeras estirpes celulares de la piel que entran en contacto con el virus cuando el mosquito se alimenta del huésped. Para ello, los fibroblastos se infectaron simultáneamente con DENV y CHIKV a una MOI de 2, y a las 24h post-infección se analizó la infección con ambos virus por inmunofluorescencia.

En la figura 15A puede observarse que los fibroblastos, al igual que las HMEC-1, están infectados tanto con DENV (color verde), como con CHIKV (color rojo). Interesantemente, podemos observar también, por Nomarski e inmunofluorescencia, que una misma célula puede estar co-infectada (figura 15B).

En conclusión, los fibroblastos también son susceptibles a la infección de DENV y CHIKV, y pueden emplearse para la cinética de la mono y coinfección con DENV y CHIKV.



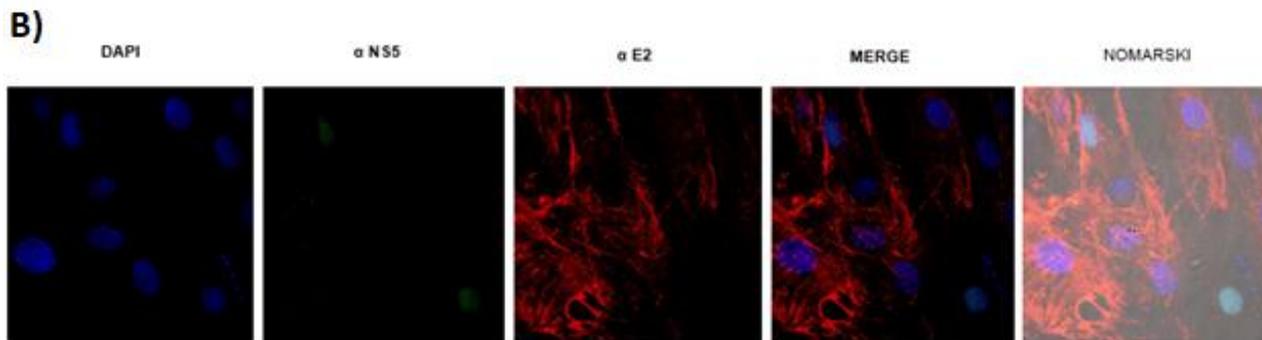


Figura 15. Detección de DENV y CHIKV en fibroblastos. En la inmunofluorescencia se observa la presencia de DENV mediante la detección de la proteína NS5, que se localiza principalmente en el núcleo (verde), y la presencia del virus CHIKV al detectar la proteína E2, localizada en el citoplasma de la célula (rojo). En azul se muestran los núcleos de los fibroblastos. A) DENV/CHIKV: Células mono infectadas con DENV y CHIKV; MOCK: Células infectadas con los virus inactivos. B) Célula coinfectada con DENV y CHIKV.

6.6. La producción de partículas virales infectivas de DENV disminuye durante la coinfección DENV-CHIKV en fibroblastos.

Los fibroblastos fueron infectados con DENV y con CHIKV de manera independiente y en la misma placa se infectaron pozos con ambos virus simultáneamente. En todos los ensayos se empleó una MOI de 2 y los sobrenadantes se recolectaron a distintos tiempos para analizar la infección productiva. De acuerdo con estos resultados se vuelve a observar que los fibroblastos también son más permisivos a CHIKV que a DENV, por los títulos que se observan para cada virus (Figura 16A y 16B).

Al igual que lo observado en las células HMEC-1, la producción de partículas infectivas de DENV aumenta conforme al tiempo, teniendo un máximo entre las 36h-48h, de 350 000 p.f.u./mL (figura 16A). CHIKV aumenta con respecto al tiempo, detectándose un máximo de 18 000 000 p.f.u./mL a las 36h (figura 16B). Con respecto a la coinfección, se observa una disminución en ambos virus, pero en DENV es tan drástica esta disminución, que a partir de las 24h ya no se pudo detectar partículas virales infectivas. Al analizar CHIKV, se observa ahora que a las 48h alcanza su máxima producción de partículas virales infectivas, y con una disminución del 58% de p.f.u. (figura 16C).

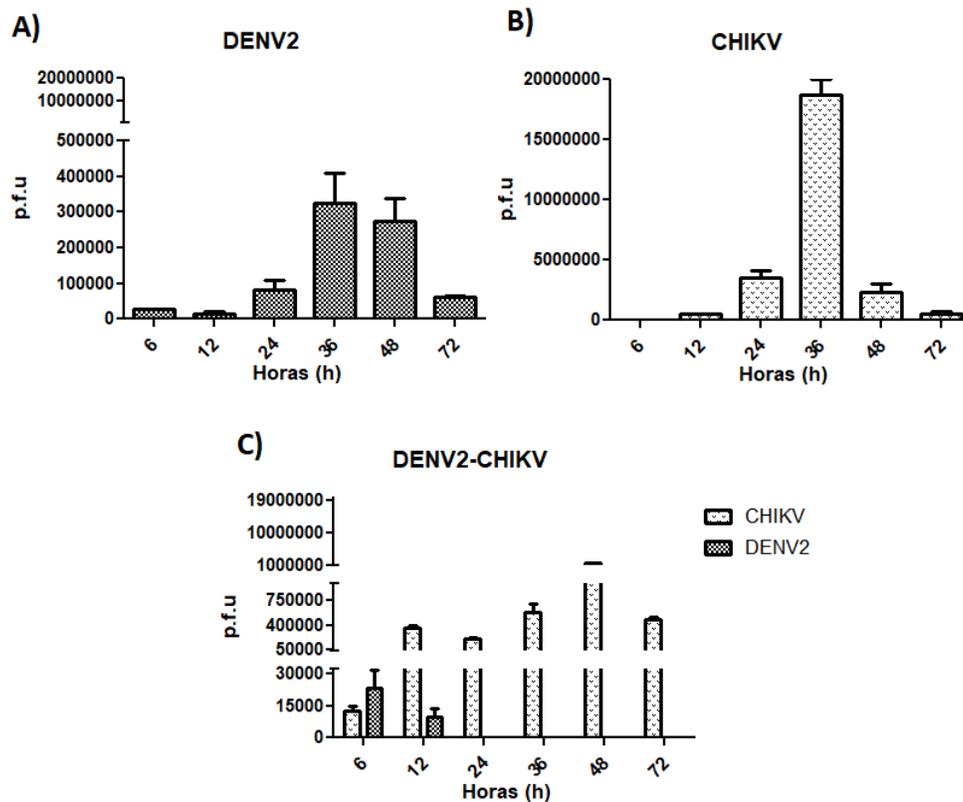


Figura 16. Cinética de la infección productiva de DENV y CHIKV en fibroblastos. A) Monoinfección DENV, B) Monoinfección CHIKV. C) Coinfección DENV-CHIKV. Los datos representan el promedio de dos ensayos independientes.

Por lo tanto, la coinfección DENV-CHIKV tiene un impacto negativo sobre la replicación de ambos virus, siendo en DENV más notorio este efecto. En HMEC-1 se observó una disminución del 75%, mientras que con los fibroblastos a partir de las 24h ya no se detectó DENV.

6.7. La infección productiva de DENV también disminuye bajo un contexto de superinfección en HMEC-1.

La otra posibilidad de adquirir una coinfección es mediante la picadura de un mosquito previamente infectado con un solo virus, y posteriormente, sea inoculado por otro mosquito infectado con el otro virus. A este fenómeno se le conoce como superinfección.

Para analizar la superinfección, se infectaron monocapas de células HMEC-1 con DENV a 2 MOI. Transcurridas 6h o 12h pos-infección se adicionó un segundo inóculo ahora con CHIKV a la misma MOI. A las 48h pos-infección de la adición del primer virus, se recuperó el sobrenadante para el análisis de la infección productiva de DENV y CHIKV. También se hicieron experimentos de superinfección con CHIKV, se realizó lo mismo, sólo que primero se infectó con este virus y a las 6h ó 12h después se inoculó DENV.

En la figura 17A se observa que la infección productiva de DENV disminuye hasta un 66% cuando se inocula CHIKV posteriormente. Cuando se infecta primero con CHIKV y después con DENV, la producción de partículas virales maduras de este último no se detecta, lo que sugiere que la presencia de CHIKV está inhibiendo la replicación de DENV (figura 17B). Con CHIKV, la producción de partículas infectivas disminuye un 36% cuando se inocula DENV a los distintos tiempos (figura 17B).

Estos resultados nos muestran que también la superinfección tiene un impacto negativo en ambos virus, pero de nuevo el efecto es más evidente con DENV.

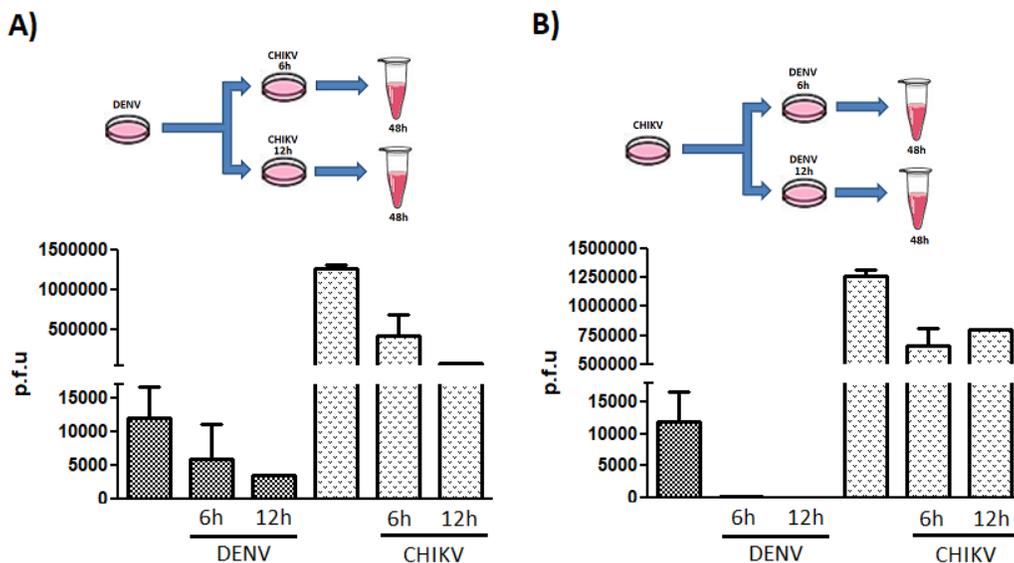


Figura 17. Titulación de la infección productiva de la superinfección de DENV y CHIKV en células HMEC-1. A) Células HMEC-1 se infectaron primero con DENV, y luego con CHIKV. B) Células HMEC-1 se infectaron primero con CHIKV, y posteriormente con DENV. Los datos representan el

promedio de dos ensayos independientes. Las barras que no tiene tiempo representan los títulos de las monoinfecciones a las 48h pos-infección.

6.8. La infección productiva de DENV disminuye en la superinfección en fibroblastos.

Al igual que en el ensayo con las células HMEC-1, los fibroblastos se infectaron con DENV a 2 MOI. Transcurridas 6 o 12 horas pos-infección se inoculó CHIKV a la misma MOI a esas mismas células. A las 48h pos-infección del primer virus se recuperó el sobrenadante para el análisis de la infección productiva de DENV y CHIKV. Un proceso similar se realizó con el otro virus, infectando primero con CHIKV, y después DENV.

Se observó un fenómeno similar a lo registrado para las células HMEC-1, la infección productiva de DENV disminuye cuando se agrega CHIKV a las 6h y 12h pos-infección con DENV. Interesantemente, a las 6h no se detecta infección productiva y a las 12h disminuye hasta una tercera parte. Lo que nos sugeriría que el efecto de CHIKV sobre DENV es más rápido en estas células, debido a que DENV a un tiempo corto no puede establecer una infección productiva, a diferencia de lo observado con las HMEC-1 (figura 18A y figura 17A). Cuando se infecta primero con CHIKV y después con DENV, la infección productiva de este último no se detecta, lo que semeja a lo observado con las HMEC-1 (figura 18B).

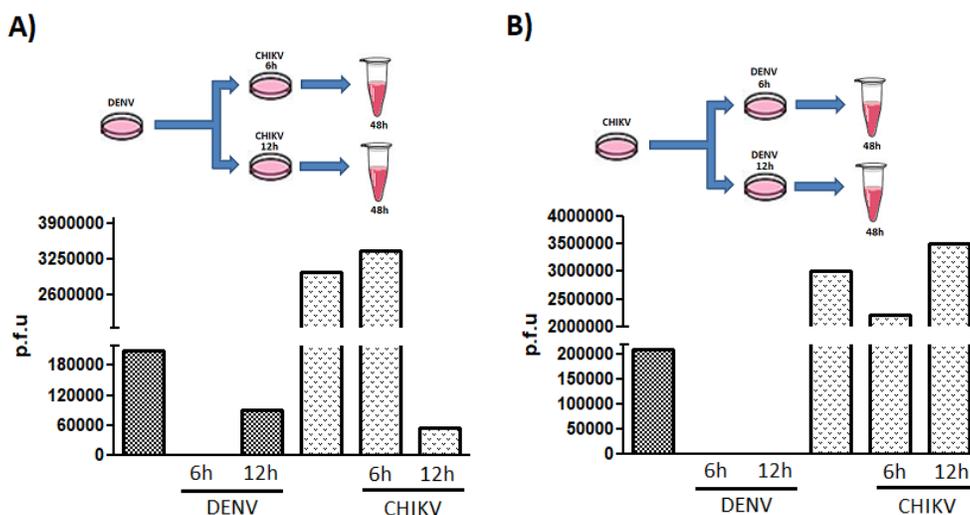


Figura 18. Infección productiva de la superinfección de DENV y CHIKV en fibroblastos. A) Fibroblastos se infectaron primero con DENV, y luego con CHIKV. B) Fibroblastos se infectaron primero con CHIKV, y posteriormente con DENV. Las barras que no tiene tiempo representan los títulos de las mono infecciones a las 48h pos-infección.

En conclusión, la coinfección DENV-CHIKV está afectando negativamente la producción de partículas infectivas de los virus, teniendo un mayor efecto en DENV, ya sea al inocular al mismo tiempo ambos virus o en una superinfección.

Estos resultados nos sugieren que CHIKV está interfiriendo con la producción de partículas infectivas de DENV, y esta interferencia puede ser a nivel celular o por modificación del microambiente. Para analizar este último, se determinó la presencia de IFN- β , el cual es el que se produce en mayor cantidad por las células epiteliales.

6.9. Determinación de IFN- β

Los sobrenadantes recuperados de la cinética con células HMEC-1 se analizaron por ELISA para determinar la presencia de IFN- β .

En la figura 19 puede observarse que a las 6h hay una mayor producción de IFN- β tanto en la mono infección de CHIKV como en la coinfección. A las 12h, se observa una disminución en la producción de esta proteína en la mono infección de CHIKV y coinfección, pero incrementa en la mono infección de DENV. A partir de las 24h, es baja la presencia de esta proteína en los 3 escenarios.

Este ensayo nos sugiere que posiblemente IFN- β esté afectando la replicación de ambos virus a tiempos tempranos, pero el efecto es más fuerte para el caso de DENV, debido a que hay una mayor cantidad a las 6h en la coinfección (900 pg/mL) a comparación de la mono infección de DENV, que es hasta las 12h donde se observa la mayor producción de IFN- β (240 pg/mL).

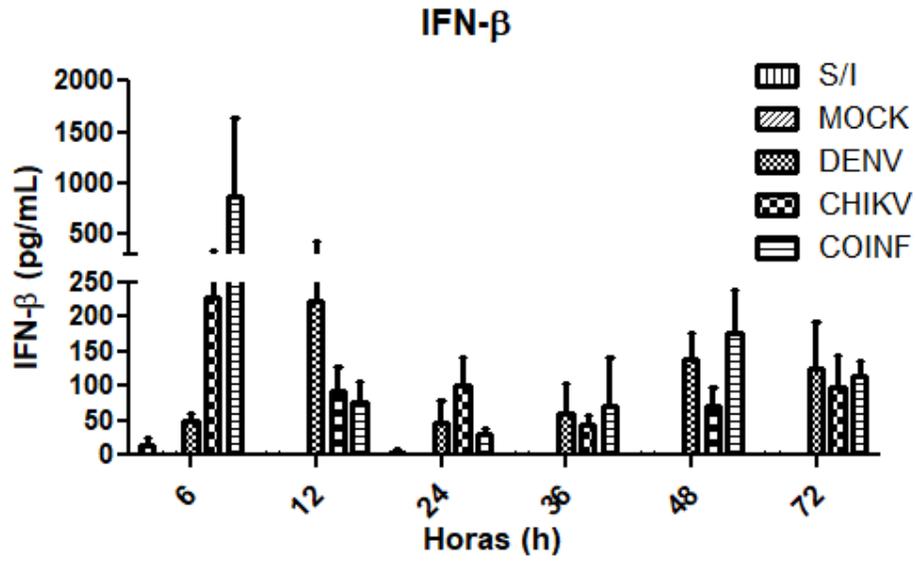


Figura 19. Determinación de IFN- β . Los sobrenadantes obtenidos de la cinética con células HMEC-1 se emplearon para analizar la presencia de IFN- β mediante ELISA. MOCK: virus inactivado. S/I: sin infectar. Los datos representan el promedio de 3 ensayos independientes.

7. DISCUSIÓN

Nuestro país es considerado un área endémica para el virus DENV, que es transmitido a través de la picadura del mosquito *Ae. aegypti* y *Ae. Albopictus*¹. Este vector se localiza principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, y es uno de los principales vectores que transmiten otras infecciones virales, entre ellas, el virus CHIKV, que ha tenido una gran dispersión en el mundo, y en nuestro país⁹. A finales del 2014 se detectó el primer caso autóctono en México. Considerando que este virus emplea el mismo vector de DENV para su transmisión, se ha propiciado la existencia de coinfección de diferentes arbovirus, y con mucha frecuencia de DENV-CHIKV, tanto en el huésped vertebrado como en el vector².

El término de coinfección se emplea para describir la presencia simultánea de dos o más virus, en una misma célula y/o en el organismo. Diversos modelos de coinfección se han estudiado en la naturaleza y han reportado que las coinfecciones pueden impactar en la infección viral, tropismo e inmunopatología de los virus involucrados⁴. Actualmente se conoce muy poco acerca de la coinfección DENV-CHIKV y su impacto en el vector y en el huésped, así como existen pocos trabajos en la literatura que aborden los efectos clínicos de esta coinfección. Recientemente Zaidi y colaboradores mostraron que niños a los cuales se les detecta ambos virus por RT-PCR, solo seroconvierten a uno de los dos, y no encontraron diferencias clínicas entre los mono infectados y coinfectados. En contraste, Lonndhey y colaboradores reportaron una clínica diferencial entre los mono infectados con DENV y los coinfectados con DENV-CHIKV y mono infectados con CHIKV. Como puede verse, es compleja la interpretación de estos resultados, y ante este panorama, resulta importante estudiar esta dinámica viral, para empezar a comprender este fenómeno y sus posibles implicaciones a nivel celular. Además de que no existe un reporte que aborde el estudio de la coinfección en células de la piel, que son las primeras células que entran en contacto con los virus cuando el mosquito se alimenta.

En este trabajo se decidió hacer un abordaje *in vitro*, planteando dos escenarios posibles. El primer escenario comprende un solo mosquito que contiene e infecta con los dos virus. La coinfección de estos cultivos celulares plantea dos posibilidades: las células se infecten con cualquiera de los dos virus inoculados o que una sola célula se infecte con los dos virus. El otro escenario que se propone se conoce como superinfección y consiste en que un virus infecte primero a un cultivo y algunas horas después se infecte con el segundo virus.

Se analizó la dinámica de DENV y CHIKV bajo un contexto de coinfección, empleando dos estirpes celulares: células endoteliales (HMEC-1) y fibroblastos. Con ambas estirpes se observó una mayor susceptibilidad a CHIKV (figura 14B, figura 16B). Analizando la infección productiva de ambos virus durante ambos modelos de coinfección, interesantemente se observa que la presencia de CHIKV tiene un impacto negativo sobre la producción de partículas infectivas de DENV (figura 14C, figura 16C, figura 17 y figura 18). En este sentido podríamos estar ante un fenómeno de interferencia heteróloga, dado que ambos virus provienen de distintas familias y se inhiben. Esta interferencia puede darse a nivel de entrada, replicación, ensamblaje y liberación del virus³³. Este fenómeno que se observa sugiere que ambos virus comparten mecanismos y factores celulares que regulan su ciclo de replicación, favoreciendo de esta manera la competencia entre ambos virus.

Es muy importante mencionar que la duración del ciclo de replicación de CHIKV es más corto que la de DENV (de 8h a 16h), en contraste, el ciclo de replicación de DENV dura aproximadamente 18-20h⁴⁰. En este sentido, ambos virus estarían podrían estar compitiendo por los recursos celulares de la misma célula que infectan. A este respecto, análisis de proteoma y de interacción proteína-proteína han mostrado, de manera independiente, que DENV y CHIKV comparten diversas proteínas del huésped durante el establecimiento de la infección en las células blancas. Por ejemplo, se ha determinado que la proteína de choque térmico Hsp90 regula positivamente la replicación de CHIKV, debido a que cuando se inhibe esta proteína, la infección productiva de CHIKV disminuye⁴⁵, y la interacción entre

Hsp90 y nsP2 observada mediante ensayos de inmunoprecipitación pudiera estar participando en este fenómeno⁴⁶. Interesantemente la misma proteína Hsp90 también interacciona con diversas proteínas del virus DENV; y al inhibirla, se observa una disminución en la producción de la proteína E, aunque la replicación del virus no se ve afectada⁴⁷. De la misma manera, análisis de mapas de interactomas independientes de DENV y CHIKV, muestran que ambos virus interactúan con ribonucleoproteínas que participan en la traducción y splicing celular durante su ciclo replicativo^{48,49}. Por otra parte, se ha reportado que la vimentina juega un papel importante en la replicación, tanto de DENV como de CHIKV. La vimentina participa en la organización y mantenimiento de los complejos de replicación, a través de su interacción con la proteína NS4A de DENV⁵⁰, y con la proteína nsP3 de CHIKV⁵¹.

Otra forma de competencia puede sugerirse por la posible alteración del citoesqueleto observado en las inmunofluorescencias que provoca CHIKV en las células infectadas (figura 13 y figura 15). Al no estar en óptimas condiciones el citoesqueleto de la célula, la replicación de DENV estaría comprometida. Además, se ha reportado que CHIKV apaga la maquinaria de traducción de la célula e induce apoptosis, de manera que también estaría condicionando la infección por DENV en estas células⁴⁹.

También la alteración del microambiente puede impactar de manera diferencial en el establecimiento de la infección de los virus. Cada virus tiene su propia huella durante la activación de la respuesta inmune, entre las cuales se encuentra la respuesta de interferón tipo I, particularmente los genes estimulados por interferón (ISGs). Estudios de microarreglos independientes, han reportado que DENV y CHIKV regulan ISGs en común, pero también hay ISGs que son regulados exclusivamente durante la infección de un virus en particular. Entre los ISGs en común se ha encontrado que la viperina es inducida durante la infección por DENV y CHIKV, y en ambos casos tiene un efecto antiviral. En DENV, por ensayos de inmunoprecipitación se ha encontrado interacción entre la viperina y la proteína NS3, sugiriendo que esta interacción tiene un efecto inhibitorio sobre la

producción del RNA viral⁵². Para CHIKV se ha propuesto que la viperina inhibe a este virus a través del bloqueo traduccional, debido a que esta proteína genera un estrés en el retículo endoplásmico, activando la proteína PKR, que es un regulador importante en la repuesta de proteínas mal plegadas y traducción celular⁵³. ISG15, que es una proteína similar a la ubiquitina, también tiene un efecto antiviral sobre ambos virus, en donde esta proteína ejerce un efecto directo en DENV mediante su interacción con las proteínas NS3 y NS5⁵⁴; o indirecto como en el caso de CHIKV, que se propone que sea a través de la modulación de la respuesta inmune, debido a que la ausencia de esta proteína induce la expresión de diversas proteínas inflamatorias⁵⁵. Por otro lado, análisis de la expresión de genes estimulados por interferón, se observó que la desaminasa de adenosina específica de RNA de doble cadena (ADAR) tiene un efecto proviral durante la infección de CHIKV, incrementando la replicación del RNA viral, posiblemente al estimular la edición del RNA o suprimir la función de PKR⁵⁶. Interesantemente, esta proteína también es expresada en la infección por DENV, aunque para este último aún no se ha reportado que tenga un efecto⁵⁷.

Los resultados obtenidos en este trabajo son contrastantes a los reportados por Potiwat y colaboradores, quienes demostraron en un modelo de C6/36 que DENV-3 presenta una supresión competitiva sobre CHIKV cuando se infecta con un alto índice de multiplicidad (MOI=1.0), comparado con CHIKV (MOI=0.1), y no así cuando se infecta CHIKV con una mayor MOI (MOI=1.0) a comparación de DENV (MOI= 0.1). Adicional a esto, Le Coupanec y colaboradores reportaron que DENV incrementa su replicación cuando CHIKV está presente en las glándulas salivales de *Ae. aegypti* que fueron infectados simultáneamente con estos virus. Con respecto al huésped mamífero, hasta la fecha sólo existe un trabajo publicado, en donde reportan que en PBMCs la replicación de DENV se incrementa bajo un contexto de coinfección, y sucede lo contrario con CHIKV⁴⁰. Hay que considerar que el aislado de CHIKV empleado en este trabajo pertenece al linaje asiático, mientras que las cepas empleadas por Potiwat, Le Coupanec y Ruiz Silva son del linaje africano. Y en diversos trabajos se ha sugerido que el fenómeno observado

en una coinfección depende de varios factores, entre ellos, la cepa del virus empleada³⁷.

Estos hallazgos, son apenas el inicio del abordaje de un fenómeno tan complejo, debido a que la coinfección se define como la presencia simultánea de 2 o más virus en el organismo y/o en la misma célula⁴. Nosotros estamos analizando un modelo que comprende células coinfectadas y células mono infectadas, sin embargo, para comprender mejor este fenómeno, sería necesario analizar solamente las células coinfectadas, para entender mejor la dinámica que se lleva a cabo a nivel celular.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se observó que la coinfección DENV-CHIKV tiene un impacto negativo sobre el virus DENV, disminuyendo la infección productiva de este último, tanto en células HMEC-1 y fibroblastos, bajo condiciones de superinfección o coinfección.

9. PERSPECTIVAS

- Analizar proteínas de la maquinaria celular que sean usadas en común por los dos virus para observar la competencia por diferentes factores celulares.
- Emplear otro serotipo/ aislado para analizar si el fenómeno que estamos observando se debe al serotipo viral.
- Analizar otras proteínas que participan en la respuesta inmune innata (como péptidos antimicrobianos, interferones) para tener información de otras moléculas que pudieran modificar el microambiente.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Arredondo-García, J., Méndez-Herrera, A. & Medina-Cortina, H. Arbovirus en Latinoamérica. *Acta Pediatría de México* **37** (2016).
- 2 Caron, M. *et al.* Recent introduction and rapid dissemination of Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in Gabon, central Africa. *Clin Infect Dis* **55**, e45-53, doi:10.1093/cid/cis530 (2012).
- 3 Perera-Lecoin, M. *et al.* Dengue and Chikungunya Coinfection – The Emergence of an Underestimated Threat. doi:10.5772/64426 (2016).
- 4 DaPalma, T., Doonan, B. P., Trager, N. M. & Kasman, L. M. A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus Res* **149**, 1-9, doi:10.1016/j.virusres.2010.01.002 (2010).
- 5 Sulkowski, M. S. Viral hepatitis and HIV coinfection. *J Hepatol* **48**, 353-367, doi:10.1016/j.jhep.2007.11.009 (2008).
- 6 Pando, R. *et al.* Influenza A(H1N1)pdm 2009 and influenza B virus co-infection in hospitalized and non-hospitalized patients during the 2015-2016 epidemic season in Israel. *J Clin Virol* **88**, 12-16, doi:10.1016/j.jcv.2017.01.002 (2017).
- 7 Sugawara, Y., Makuuchi, M., Kato, N., Shimotohno, K. & Takada, K. Enhancement of hepatitis C virus replication by Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1. *The EMBO Journal* **18**, doi:10.1093/emboj/18.20.5755 (1990).
- 8 Kalawat, U., Sharma, K. K., Reddy, S. G. Prevalence of dengue and chikungunya fever and their co-infection. *Indian J Pathol Microbiol* **54**, 844-846, doi:10.4103/0377-4929.91518 (2011).
- 9 Deeba, F. *et al.* Co-infection with Dengue and Chikungunya Viruses. doi:10.5772/64308 (2016).
- 10 Jain, J., Dubey, S. K., Shrinet, J. & Sunil, S. Dengue Chikungunya co-infection: A live-in relationship?? *Biochem Biophys Res Commun* **492**, 608-616, doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.008 (2017).

- 11 Deeba, F. *et al.* Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. *Pathog Dis* **74**, doi:10.1093/femspd/ftv119 (2016).
- 12 Gandhi BS, K. K., Godbole M, Dole SS, Kapur S, Satpathy P, Khatri AM, Deshpande PS, Azad F, Gupte N, Bharadwaj R, Bollinger RC and Gupta A. Dengue and Chikungunya co-infection associated with more severe clinical disease than mono-infection. *International J. of Healthcare and Biomedical Research* **3**, 117-123 (2015).
- 13 Chahar, H. S. *et al.* Co-infections with chikungunya virus and dengue virus in Delhi, India. *Emerg Infect Dis* **15**, 1077-1080, doi:10.3201/eid1507.080638 (2009).
- 14 Zaidi, M. B. *et al.* Competitive suppression of dengue virus replication occurs in chikungunya and dengue co-infected Mexican infants. *Parasit Vectors* **11**, 378, doi:10.1186/s13071-018-2942-1 (2018).
- 15 Potiwat R, K. N., Thavara U, Tawatsin A, Siriyasatien P. Competitive suppression between chikungunya and dengue virus in *Aedes albopictus* c6/36 cell line. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **42**, 1388-1394 (2011).
- 16 Carey, D. E. Chikungunya and Dengue: A case of mistaken identity? *J. Hist. Med. Allied Sci.* **26**, 243-262, doi: <https://doi.org/10.1093/jhmas/XXVI.3.243>
- 17 Ross, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond)* **54**, 177-191 (1956).
- 18 Volk, S. M. *et al.* Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol* **84**, 6497-6504, doi:10.1128/JVI.01603-09 (2010).
- 19 Guani-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O. & Teran, L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* **135**, 1-11, doi:10.1016/j.clim.2009.12.004 (2010).

- 20 Diaz-Quinonez, J. A. *et al.* Complete genome sequences of chikungunya virus strains isolated in Mexico: first detection of imported and autochthonous cases. *Genome Announc* **3**, doi:10.1128/genomeA.00300-15 (2015).
- 21 Laurie A. Silva, T. S. D. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest* **127**, 737-749, doi:doi: 10.1172/JCI84417 (2017).
- 22 Weaver, S. C., Osorio, J. E., Livengood, J. A., Chen, R. & Stinchcomb, D. T. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Rev Vaccines* **11**, 1087-1101, doi:10.1586/erv.12.84 (2012).
- 23 Zhang, R. *et al.* Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature* **557**, 570-574, doi:10.1038/s41586-018-0121-3 (2018).
- 24 Hitesh A. Solanki, S. S. S., and Himanshu A. Pandya. Dengue as a Druggable Disease: A Review. *J Fever* **1** (2017).
- 25 Mayer, S. V., Tesh, R. B. & Vasilakis, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop* **166**, 155-163, doi:10.1016/j.actatropica.2016.11.020 (2017).
- 26 Fajardo-Dolci G., M.-M. J., Vicente-González E., Venegas-Páez F. V., Mazón-González B., Aguirre-Gas H. G. El dengue en México: Conocer para mejorar la calidad de la atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* **50**, 631-639 (2012).
- 27 Back, A. T. & Lundkvist, A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol* **3**, doi:10.3402/iee.v3i0.19839 (2013).
- 28 E.A. Henchal, P. J. R. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* **3**, 376-396 (1990).
- 29 Putnak R, F. J., VanderZanden L, Innis BL, Vaughn DW. Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *Am J Trop Med Hyg* **68**, 469-476 (2003).

- 30 Diamond, M. S. & Pierson, T. C. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell* **162**, 488-492, doi:10.1016/j.cell.2015.07.005 (2015).
- 31 Aruna, R. Review on Dengue viral Replication, assembly and entry into the host cells. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* **3**, 1025-1039 (2014).
- 32 Deeba, F. *et al.* Co-infection with Dengue and Chikungunya Viruses. *Curr Top Chikungunya*, doi:10.5772/64308 (2016).
- 33 Kumar, N., Sharma, S., Barua, S., Tripathi, B. N. & Rousec, B. T. Virological and Immunological Outcomes of Coinfections. *Clin Microbiol Rev* **31**, doi:10.1128/CMR.00111-17 (2018).
- 34 Freitas, N., Cunha, C., Menne, S. & Gudima, S. O. Envelope proteins derived from naturally integrated hepatitis B virus DNA support assembly and release of infectious hepatitis delta virus particles. *J Virol* **88**, 5742-5754, doi:10.1128/JVI.00430-14 (2014).
- 35 Lisco, A. *et al.* Viral interactions in human lymphoid tissue: Human herpesvirus 7 suppresses the replication of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 via CD4 modulation. *J Virol* **81**, 708-717, doi:10.1128/JVI.01367-06 (2007).
- 36 Suchitra Nimmannitya, S. B. H., Sanford N. Cohen, Mark R. Margiotta. Dengue and Chikungunya Virus Infection in Man in Thailand, 1962–1964 *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* **18**, 954-971 (1969).
- 37 Nuckols, J. T. *et al.* Evaluation of Simultaneous Transmission of Chikungunya Virus and Dengue Virus Type 2 in Infected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **52**, 447-451, doi:10.1093/jme/tjv017 (2015).
- 38 Vazeille, M., Mousson, L., Martin, E. & Failloux, A. B. Orally co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e706, doi:10.1371/journal.pntd.0000706 (2010).

- 39 Le Coupanec, A. *et al.* Co-Infection of Mosquitoes with Chikungunya and Dengue Viruses Reveals Modulation of the Replication of Both Viruses in Midguts and Salivary Glands of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18081708 (2017).
- 40 Ruiz Silva, M. *et al.* Suppression of chikungunya virus replication and differential innate responses of human peripheral blood mononuclear cells during co-infection with dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0005712, doi:10.1371/journal.pntd.0005712 (2017).
- 41 Bowie, A. G. & Unterholzner, L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **8**, 911-922, doi:10.1038/nri2436 (2008).
- 42 María Eugenia Castro-Mussot, C. M.-W., María Alba Loroño-Pino and Ma Isabel Salazar. Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones con el virus del dengue. *Gaceta Médica de México* **149**, 531-540 (2013).
- 43 Pagni, S. & Fernandez-Sesma, A. Evasion of the human innate immune system by dengue virus. *Immunol Res* **54**, 152-159, doi:10.1007/s12026-012-8334-2 (2012).
- 44 Fros, J. J. *et al.* Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J Virol* **84**, 10877-10887, doi:10.1128/JVI.00949-10 (2010).
- 45 Rathore, A. P. *et al.* Chikungunya virus nsP3 & nsP4 interacts with HSP-90 to promote virus replication: HSP-90 inhibitors reduce CHIKV infection and inflammation in vivo. *Antiviral Res* **103**, 7-16, doi:10.1016/j.antiviral.2013.12.010 (2014).
- 46 Das, I. *et al.* Heat shock protein 90 positively regulates Chikungunya virus replication by stabilizing viral non-structural protein nsP2 during infection. *PLoS One* **9**, e100531, doi:10.1371/journal.pone.0100531 (2014).
- 47 Srisutthisamphan, K. *et al.* Hsp90 interacts with multiple dengue virus 2 proteins. *Sci Rep* **8**, 4308, doi:10.1038/s41598-018-22639-5 (2018).

- 48 Doolittle, J. M. & Gomez, S. M. Mapping protein interactions between Dengue virus and its human and insect hosts. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e954, doi:10.1371/journal.pntd.0000954 (2011).
- 49 Bourai, M. *et al.* Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. *J Virol* **86**, 3121-3134, doi:10.1128/JVI.06390-11 (2012).
- 50 Teo, C. S. H. & Chu, J. J. H. Cellular Vimentin Regulates Construction of Dengue Virus. *Journal of Virology*, doi:10.1128/JVI.01249-13. (2014).
- 51 Issac, T. H., Tan, E. L. & Chu, J. J. Proteomic profiling of chikungunya virus-infected human muscle cells: reveal the role of cytoskeleton network in CHIKV replication. *J Proteomics* **108**, 445-464, doi:10.1016/j.jprot.2014.06.003 (2014).
- 52 Helbig, K. J. *et al.* Viperin is induced following dengue virus type-2 (DENV-2) infection and has anti-viral actions requiring the C-terminal end of viperin. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2178, doi:10.1371/journal.pntd.0002178 (2013).
- 53 Fox, J. M. & Diamond, M. S. Immune-Mediated Protection and Pathogenesis of Chikungunya Virus. *J Immunol* **197**, 4210-4218, doi:10.4049/jimmunol.1601426 (2016).
- 54 Hishiki, T. *et al.* Interferon-mediated ISG15 conjugation restricts dengue virus 2 replication. *Biochem Biophys Res Commun* **448**, 95-100, doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.081 (2014).
- 55 Werneke, S. W. *et al.* ISG15 is critical in the control of Chikungunya virus infection independent of UbE1L mediated conjugation. *PLoS Pathog* **7**, e1002322, doi:10.1371/journal.ppat.1002322 (2011).
- 56 Schoggins, J. W. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* **1**, 519-525, doi:10.1016/j.coviro.2011.10.008 (2011).
- 57 Jiang, D. *et al.* Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections. *J Virol* **84**, 8332-8341, doi:10.1128/JVI.02199-09 (2010).