



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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**“Modulación del colesterol intracelular por DENV y la actividad antiviral
de fármacos inhibidores de la síntesis lipídica en la línea celular hepática
Huh7”**

Tesis de Doctorado que presenta:

M. en C. Rubén Soto Acosta.

Para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias
En Infectómica y Patogénesis Molecular**

Directora de tesis:

Dra. Rosa María Del Ángel Núñez de Cáceres

Ciudad de México, D.F.

Enero, 2015

Este trabajo se desarrolló en el departamento de Infectómica y Patogénesis del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca con número de registro 293216

Índice General

	Página
Lista de figuras y tablas	5
Abreviaturas	6
Resumen	7
Abstract	8
1. Introducción	9
1.1 Dengue	9
1.1.1 Generalidades	9
1.1.2 Transmisión	9
1.1.3 Manifestaciones clínicas	11
1.1.3.1 Daño hepático	11
1.1.4 Morfología viral	12
1.1.5 Ciclo replicativo de DENV	13
1.2 Colesterol	15
1.2.1 Entrada del colesterol circulante a la célula: papel del receptor a LDL	16
1.2.2 Biosíntesis del colesterol	16
1.2.3 Regulación de los niveles de colesterol intracelular	17
1.3 Importancia de las balsas lipídicas y el colesterol en el ciclo replicativo del DENV	18
1.3.1 Entrada viral	19
1.3.2 Replicación viral	19
1.3.3 Salida viral	21
2. Justificación	22
3. Hipótesis	22
4. Objetivo general	22
5. Objetivos específicos	23
6. Materiales y métodos	23
6.1 Cultivo celular y cepas virales	23
6.2 Inmunofluorescencia de balsas lipídicas, colesterol celular y niveles del LDLr	24
6.3 Ensayo de captación de partículas LDL	25
6.4 Determinación de colesterol total por colorimetría y citometría del flujo	25
6.5 Ensayos de Western Blot	26
6.6 Viabilidad celular	27
6.7 Medición de progenie viral y secreción de NS1	27
6.8 Medición de genoma viral y actividad de luciferasa	27
6.9 Inmunofluorescencia y citometría de flujo para evaluar cantidad y distribución de proteínas virales y celulares	28
6.10 Ensayo ezimático de la HMGCR, PP2A y AMPK	28
6.11 Anticuerpos empleados	30
7. Resultados	31

7.1 La infección con DENV induce un incremento en la formación de balsas lipídicas y en los niveles de colesterol total	31
7.2 Efecto de la infección por DENV sobre los niveles del LDLr	38
7.3 La infección con DENV disminuye la fosforilación de HMGCR e incrementa su actividad	42
7.4 El incremento en la actividad de la HMGCR es mediado por la modulación de la actividad de AMPK en las células infectadas y no por cambios en la actividad de PP2A	45
7.5 La infección con DENV no modula la actividad de PP2A pero su inhibición promueve un efecto antiviral	47
7.6 DENV induce la inactivación de AMPK mediante desfosforilación y su activación tiene un fuerte efecto antiviral contra la infección por DENV en la línea celular Huh7	49
7.7 La HMGCR está localizada en los complejos replicativos y su actividad es importante para la formación de dichas estructuras	50
7.8 El Ácido Nordihidroguaiarético (NDGA) inhibe la infección por DENV reduciendo la replicación y ensamblaje viral	55
8. Discusión	66
9. Conclusión	76
10. Perspectivas	77
11. Referencias	78
12. Anexo I. Producción	84

Índice de figuras y tablas

	Página
Figura 1. Distribución mundial del Dengue	10
Figura 2. Morfología del DENV y estructura del genoma viral	14
Figura 3. Ciclo replicativo DENV	15
Figura 4. Implicación de los receptores LDL en la captación y metabolismo del colesterol	17
Figura 5. Efecto de la infección por DENV en las células Huh7 sobre la formación de balsas lipídicas	32
Figura 6. Efecto de la infección por DENV sobre los niveles de colesterol total en las células Huh7	35
Figura 7. Niveles de colesterol total en células Huh7 infectadas determinado por citometría de flujo	36
Figura 8. Niveles de colesterol total en células Huh7 infectadas determinados por microscopía confocal	37
Figura 9. Efecto de la infección por DENV sobre los niveles proteicos de LDLr	39
Figura 10. Efecto de la infección por DENV en la cantidad de LDLR sobre la superficie celular	40
Figura 11. Efecto de la infección por DENV en la captación de partículas LDL en la línea celular Huh7	41
Figura 12. Efecto de la infección por DENV en los niveles de fosforilación de la HMGCR en las células Huh7	44
Figura 13. Actividad enzimática de HMGCR en respuesta a la infección	45
Figura 14. Actividad enzimática de la HMGCR de células huh7 infectadas en respuesta a la activación de AMPK, inhibición de PP2A y la inhibición de la HMGCR	46
Figura 15. Actividad enzimática de PP2A en respuesta a la infección por DENV en las células Huh7	48
Figura 16. Determinación de la fosforilación de AMPK en respuesta a la infección por DENV en las células Huh7	51
Figura 17. Presencia de HMGCR en los complejos replicativos	53
Figura 18. Distribución de proteínas virales y HMGCR en respuesta a inhibidores de la actividad de HMGCR	56
Figura 19. Distribución de colesterol en las células infectadas en respuesta a la inhibición de la HMGCR	57
Figura 20. Validación del tratamiento con NDGA y su efecto en la carga viral y la secreción de NS1 en células infectadas y tratadas	59
Figura 21. Efecto del NDGA sobre la replicación del genoma viral	60
Figura 22. Efecto del NDGA sobre los patrones de distribución de proteínas virales	61
Figura 23. Efecto del NDGA sobre los niveles y distribución de LDs y cápside viral	63
Figura 24. Propiedad antiviral del NDGA contra DENV en células Vero y U937-DC SIGN	65
Tabla 1. Anticuerpos empleados	20

Abreviaturas

Ab	Anticuerpo
ACAT	Acil CoA:colesterol acil transferasa
AcM	Anticuerpo monoclonal
DENV	Virus del dengue
HCV	Virus de la hepatitis C
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
Hs	Heparán sulfato
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IFN	Interferón
IL	interleucina
INSIG	Gen inducido por insulina
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLr	Receptor a LDL
MOI	Multiplicidad de infección
M β CD	Metil-beta-ciclodextrina
NDGA	Ácido nordihidroguayarático
NS1	Proteína no estructural 1
O.D.	Densidad óptica
PFU	Unidades formadoras de placas
FFU	Unidad formadora de focos
RE	Retículo endoplásmico
SREBPs	Proteínas de unión a SRE
SREs	Elementos reguladores de esteroides
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UTR	Región no traducida
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WHO	Organización mundial de la salud
CR	Complejo replicativo
Hpi	Horas post-infección

Resumen

El dengue, causado por el virus del dengue, es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial ya que presenta una elevada tasa de incidencia y un cuadro clínico leve, o fiebre por dengue, que puede evolucionar hacia dengue severo con un cuadro hemorrágico grave que puede causar la muerte. El colesterol y las balsas lipídicas han sido descritos como elementos importantes para la entrada viral y señalización en los macrófagos. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación e investigadores a nivel mundial, sugieren que el colesterol celular desempeña un papel importante en los procesos virales post-entrada (traducción, replicación o ensamblaje) en diferentes modelos celulares. Con base en estos datos, nos preguntamos si la infección por el virus del dengue modula los niveles de colesterol y balsas lipídicas y cuáles serían los mecanismos involucrados en esta modulación. Los resultados obtenidos sugieren que el proceso de infección induce un incremento de las balsas lipídicas membranales, del colesterol celular y del receptor LDL en la superficie celular, Además de un incremento en la actividad de la enzima limitante en la síntesis de colesterol o 3-hidroxi-3- metilglutaril-coenzima-A reductasa (HMGCR), mediada por una reducción en la fosforilación de la enzima AMP proteína cinasa, principal enzima involucrada en la fosforilación de la HMGCR. Por otro lado, Dada la importancia de los lípidos en la infección por dengue, decidimos evaluar el efecto antiviral del ácido nordihydroguaiaretico (NDGA), cuyo efecto hipolipidémico produjo la reducción de la replicación del genoma y ensamblaje viral en la infección por dengue en células hepáticas.

Abstract

Dengue fever caused by dengue virus, is the most important viral disease transmitted by arthropods in the world, and present a high incidence rate and a mild clinical dengue fever, which can progress to a severe form of dengue fever, called hemorrhagic fever that can cause severe bleeding and death. Several cellular molecules and components, specifically, cholesterol and lipid rafts have been described as necessary elements for dengue virus entry and signaling in several human cells. Thus, changes in lipid rafts formation and cholesterol levels were evaluated. Here we report that the amount of total cholesterol and lipid rafts formation increase early after infection of Huh-7 cells. This augment correlates with an increase in the amount of low density lipoprotein receptor (LDLr) on the surface of infected cells and also with a lower phosphorylation level of the 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCR). None of the changes were observed in Huh 7 cells infected with VSV used as a control. These results suggest that dengue virus infection increases intracellular cholesterol levels at early times post infection by triggering the modulation of LDL particles uptake and the increase in the enzymatic activity of HMG-CoA reductase mediated by the reduction of AMPK phosphorylation, main enzyme involved in the HMGCR activity. On the other hand, regarding the importance of lipids in the DENV infection, we decided to evaluate the antiviral effect of nordihidroguaiaretic acid (NDGA), which produced the reduction of viral genome replication and viral assembly in the DENV infected Huh7 cells.

1. Introducción.

1.1. Dengue.

1.1.1. Generalidades.

El dengue es la enfermedad viral más importante transmitida por artrópodos a nivel mundial. Se estima una tasa anual de infección de 50-100 millones de personas que viven en áreas urbanas, suburbanas y rurales (Gomez-Dantes and Willoquet, 2009; Leyssen et al., 2000; Weaver and Vasilakis, 2009) El virus del dengue (DENV) es el *flavivirus* más ampliamente distribuido mundialmente y los 4 serotipos existentes pueden ser encontrados en regiones tropicales y subtropicales del mundo donde la presencia de su vector, el mosquito *Aedes aegypti*, es abundante, poniendo en riesgo de infección a cerca de una tercera parte de la población mundial (2.5 billones de personas) (Tan and Alonso, 2009)(Figura 1). Las clínicas y los servicios de salud pública han sido incapaces de disminuir la prevalencia de esta enfermedad ya que aún no existe algún tratamiento médico que sea capaz de evitar el desarrollo de los síntomas severos e igualmente no se cuenta con las medidas de control contra el vector que garanticen protección a las poblaciones afectadas (Gomez-Dantes and Willoquet, 2009)

Datos de la Secretaría de Salud de nuestro país obtenidos a través del Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue, indican que en el 2014 se han reportado un total de 28,109 casos de fiebre por dengue de los cuales 7,610 casos se presentaron como dengue severo, estas cifras son aproximadamente la mitad de los casos reportados en el año anterior, sin embargo, la tasa de letalidad no presenta variación (0.43 por cada 100 casos). Los estados con la mayor incidencia son el estado de Baja California Sur (549.90 casos por cien mil habitantes), Sonora, Sinaloa y Colima (81.10 – 108.09 casos por cien mil habitantes).

1.1.2. Transmisión.

El DENV se transmite al humano a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes* infectados, algunas especies de este género como *A.aegypti*, *A.albopictus*, *A.polynesiensis*, entre otros, se han adaptado eficientemente a los ambientes domésticos en áreas urbanizadas de las regiones tropicales, sirviendo como vectores para la infección del DENV (Tolle, 2009; Weaver and Vasilakis, 2009). La alta tasa de variación génica que ha experimentado el virus, le ha permitido adaptarse completamente a su vector *A. aegypti*, uno de los más ampliamente distribuidos a nivel mundial y cuyos programas de control han fracasado, permitiendo al virus expandirse de una forma extraordinaria (Tolle, 2009).

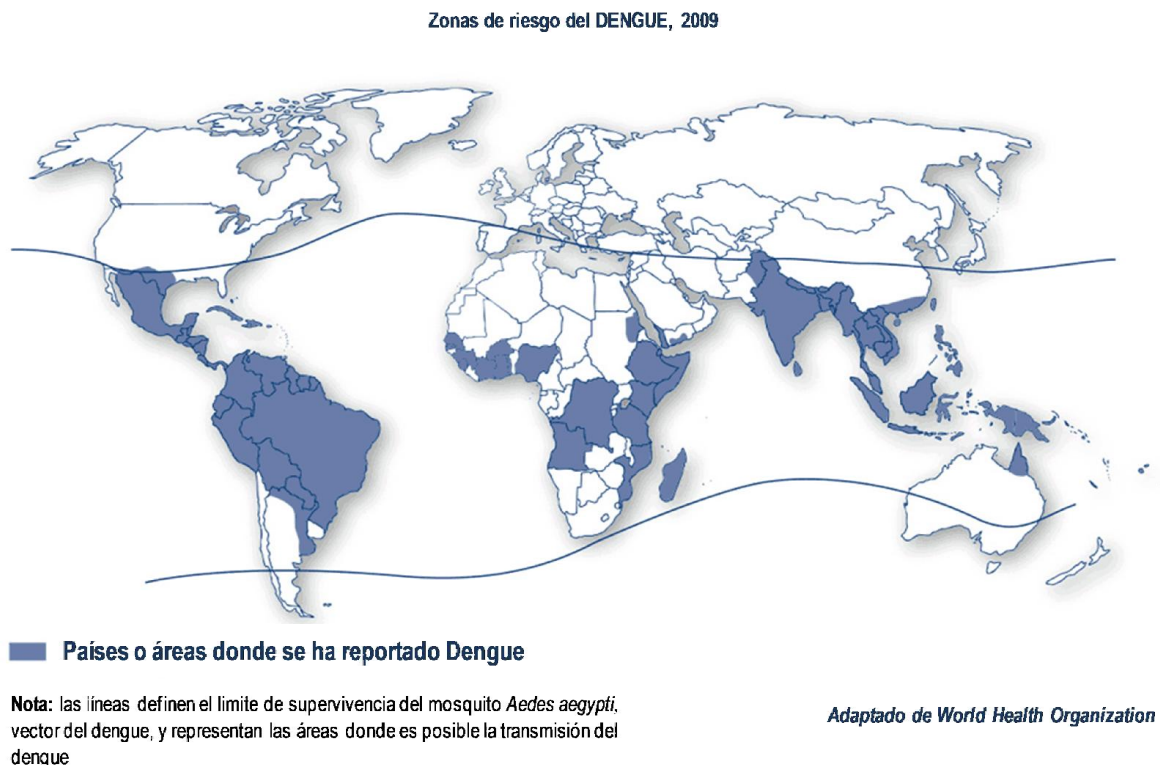


Figura 1. Distribución mundial DENV. Las zonas de color azul muestran los sitios en donde se encuentra el mosquito vector del dengue, el *Aedes aegypti* o se han presentado brotes de la enfermedad (tomado de *National Travel Health Network and Centre*. http://www.nathnac.org/ds/c_pages/country_page_in.htm. Consultado 17 de Octubre 2010).

Las hembras del mosquito *Aedes* se infectan después de tomar sangre de una persona durante la fase febril, es decir la fase de viremia. Una vez en el mosquito,

el DENV se replica en el cuerpo graso y tiene un período de incubación de 8 – 10 días, a partir de los cuales se convierte en transmisor del virus a través de la inyección del virus junto con el fluido salival durante su alimentación con sangre (Singhi et al., 2007).

1.1.3 Manifestaciones clínicas

Inicialmente, la infección con cualquier serotipo puede ser asintomática o desencadenar un amplio espectro de manifestaciones clínicas como son fiebre intensa, acompañada por dolor de cabeza, dolor retroocular, dolor de espalda, mialgias y artralgias, las cuales en pocas ocasiones persisten por más de 7 días. En el 50% de los pacientes, el dengue se presenta con problemas de la piel que se caracterizan por cara enrojecida dentro de las 24-48 h, mientras que en la fase de defervescencia se puede presentar un sarpullido petequial o máculopapular. Los resultados de laboratorio en pacientes con dengue involucran trombocitopenia, leucopenia y niveles incrementados de la aminotransferasa hepática (Oishi et al., 2007; Tan and Alonso, 2009).

En ocasiones el cuadro clínico puede evolucionar hacia dengue severo, principalmente en pacientes con una segunda infección heteróloga (con un serotipo diferente al causal de la primera infección). Las manifestaciones que caracterizan al dengue severo son trombocitopenia, que promueve diátesis hemorrágica y el aumento de la permeabilidad vascular, que conlleva a una fuga de plasma. Estos dos eventos pueden finalizar en un choque hipovolémico y colapso vascular que afectan la funcionalidad de órganos como el hígado, el bazo y el cerebro. La evolución a esta forma de la enfermedad ha sido objeto de diversos estudios que concluyen que es producida por la exacerbación de la respuesta inmune innata, debido a diferentes factores tanto del huésped como del virus (Tan and Alonso, 2009). El criterio de diagnóstico del dengue severo incluye un conteo plaquetario menor de 100,000 plaquetas/uL, manifestaciones hemorrágicas y un incremento del hematocrito por arriba del 20% del valor de referencia. (Singhi et al., 2007).

1.1.3.1 Daño hepático

El DENV es capaz de infectar varios tipos celulares y ocasionar diversos eventos patológicos, donde sus principales efectos son a nivel muscular, vascular, y del sistema hematológico. Sin embargo, existe suficiente evidencia tanto clínica como experimental que sugiere que el hígado se encuentra afectado en la infección. Esta disfunción hepática puede ser causada por un efecto directo del virus sobre las células o una consecuencia de la respuesta inmune desregulada contra el virus (Seneviratne et al., 2006). La evidencia clínica que soporta la afección hepática durante la infección por DENV es la hepatomegalia y los niveles séricos aumentados de las transaminasas. Ambos elementos son comúnmente observados en pacientes con dengue severo. Cambios histológicos como esteatosis, necrosis hepatocelular, hiperplasia y destrucción de las células de Kupffer también han sido reportados. Adicionalmente, existen varios reportes donde han logrado detectar el genoma y antígenos virales en necropsias de hígado de casos fatales, indicando que el virus es capaz de replicarse en hepatocitos, convirtiendo a éstas células en uno de las principales células blanco del DENV, junto con los monocitos/macrófagos y las células dendríticas (Povoa et al., 2014). Por otro lado, se ha reportado que los hepatocitos cuentan en su superficie con algunas de las moléculas que DENV utiliza para el proceso de entrada. Estas moléculas son el heparán sulfato, presente en las células HepG2 y Huh7, involucrado en la unión del DENV a la superficie celular (Hilgard and Stockert, 2000; Rosen et al., 1999; Thepparit and Smith, 2004), los receptores como la proteína GRP78, reportada específicamente para la infección por DENV-2 (Jindadamrongwech et al., 2004), y el receptor de laminina para DENV-1, ambos presentes en las células hepáticas (Thepparit and Smith, 2004).

1.1.4 Morfología viral

El DENV, es un virus esférico de aproximadamente de 40 nm de diámetro que contiene una bicapa lipídica que mide aproximadamente 10 nm de espesor. Dicha membrana tiene anclada a dos de las proteínas estructurales, la de la membrana (M) y la de la envoltura (E) y rodea la cápside icosaédrica (30 nm) que contiene el genoma viral cubierto por la proteína de la cápside (C) (figura 3A)

(Henchal and Putnak, 1990; Perera et al., 2008). El genoma es una cadena sencilla de RNA con sentido positivo (en el mismo sentido que el RNA mensajero) con una longitud de 11 Kb. En los extremos 5' y 3' tiene dos regiones no codificantes (UTRs) con estructuras de tallos y burbujas que participan en la traducción y replicación del genoma. Se ha descrito que la polimerasa viral se une a un elemento promotor, localizado en la UTR 5'. Esta región está aledaña a la UTR 3' después de la ciclización del RNA mediante interacciones RNA-RNA (Alvarez et al., 2008). Por otro lado, el genoma viral tiene un solo marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de 3411 aminoácidos que es posteriormente procesada en tres proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales (figura 3B) (Weaver and Vasilakis, 2009).

1.1.5 Ciclo replicativo de DENV

La entrada del virus a la célula ocurre a través de endocitosis mediada por receptor y se han descrito como receptores, diversas moléculas que pueden interactuar con el DENV. Estos receptores se dividen en receptores de primera línea (empleados por otros virus, por ejemplo heparán-sulfato y DC-SIGN) (Chen et al., 1997; Mukhopadhyay et al., 2005) y los de segunda línea (receptores específicos para el DENV, por ejemplo, las proteínas de choque térmico HSP 90 y HSP 70 (Reyes-Del Valle et al., 2005).

Una vez en el endosoma y como resultado del proceso de acidificación de estas estructuras, el virión sufre cambios estructurales que promueven su fusión con la membrana endosomal y la liberación del genoma viral al citoplasma. Posteriormente, en el citosol, el RNA viral actúa como un RNA mensajero (RNAm) para la síntesis de proteínas virales que son necesarias para la replicación del genoma viral. El genoma viral se replica a partir de una copia de RNA de sentido negativo que sirve como molde para la síntesis de RNA de polaridad positiva, el cual se asocia con las proteínas virales C, E y prM para formar viriones inmaduros que viajan en vesículas a través del aparato de Golgi, donde la proteína viral prM es procesada por la proteasa furina para generar viriones maduros los cuales son

liberados al medio extracelular a través de la ruta secretora (Mukhopadhyay et al., 2005; Stiasny and Heinz, 2006).

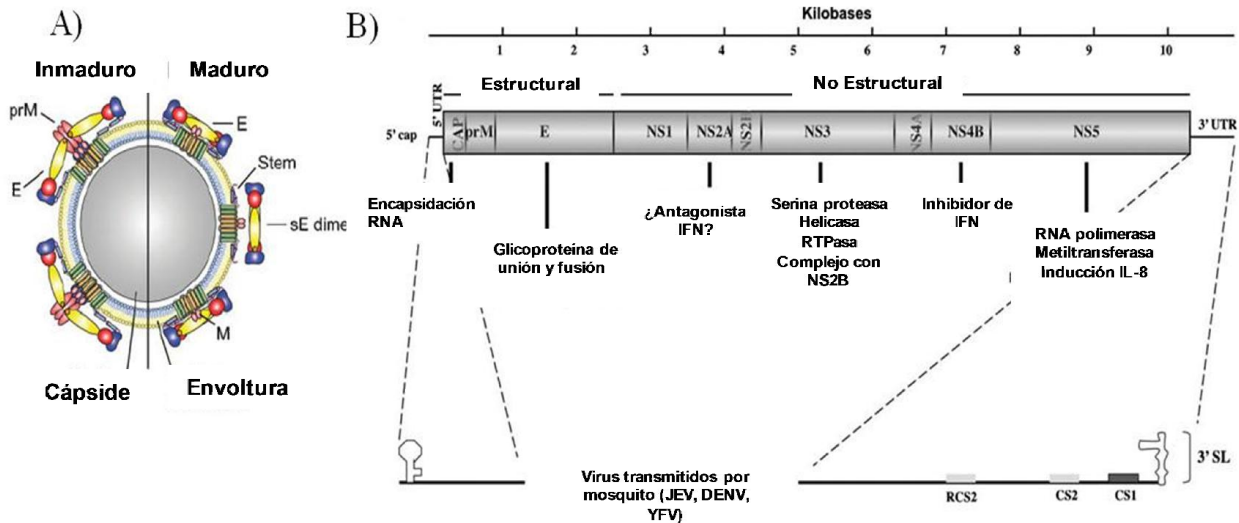


Figura 2. Esquema de la morfología del DENV y de la estructura del genoma viral. (A) La partícula viral madura e inmadura difieren en la conformación de las proteínas E y M sobre la superficie. En la partícula inmadura, con espículas sobre la superficie, la proteína M se encuentra en forma de precursor (prM) cubriendo a la proteína E. En la partícula madura prM se procesa y genera una partícula de superficie lisa (tomado de Heinz *et al.*, 2006); (B) El genoma de DENV de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva contiene un marco abierto de lectura que codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales, franqueado por dos regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5' y 3' (tomado de Weaver and Vasilakis, 2009).

La replicación del genoma ocurre en las membranas del retículo endoplásmico donde participan activamente las proteínas no estructurales maduras. El ensamblaje viral se lleva a cabo en el retículo endoplásmico (RE), cuando las proteínas estructurales y el RNA sintetizado se unen, geman a la luz del RE, dando como resultado la formación de partículas virales no infecciosas (inmaduras) que son transportadas a través de la vía secretora del aparato de Golgi donde la proteína prM es procesada para producir a la proteína M y formar de esta manera viriones maduros, los cuales son liberados de la célula por exocitosis (figura 4) (Mukhopadhyay et al., 2005; Perera et al., 2008; Stiasny and Heinz, 2006). Evidencias recientes sugieren que distintas clases de lípidos y su metabolismo, específicamente el del colesterol, participan de manera importante en los procesos de entrada, replicación y morfogénesis viral.

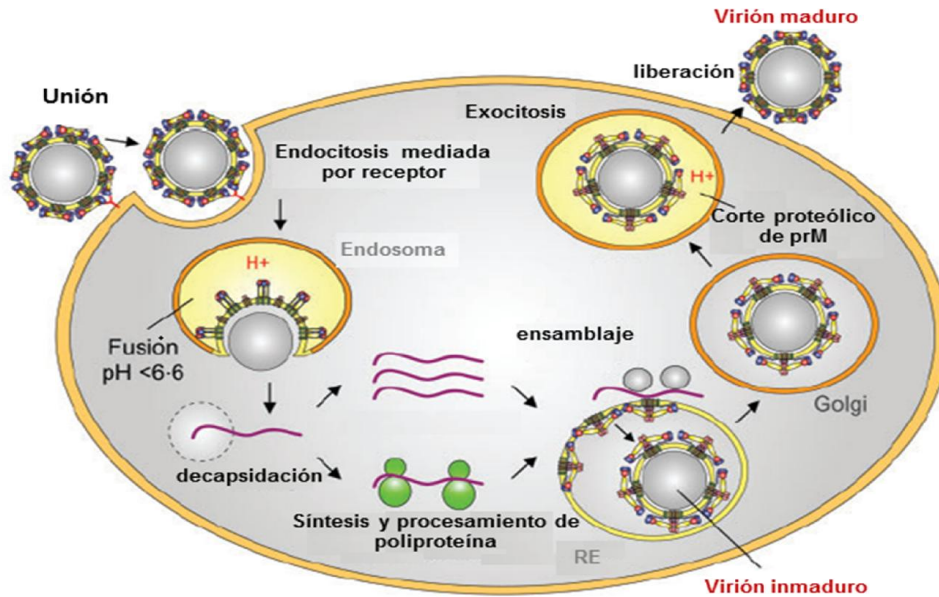


Figura 3. Ciclo replicativo del DENV. El DENV es internalizado mediante endocitosis mediada por receptor. Una vez fusionada la envoltura viral a la membrana endosomal se libera el RNA genómico al citosol, en donde es traducido para producir a las proteínas virales maduras. Las proteínas virales favorecen la replicación del RNA para generar múltiples cadenas de polaridad positiva que son el genoma de la progenie viral, y que son encapsuladas y posteriormente liberadas por exocitosis. (Tomado de Heinz *et al.*, 2006).

1.2. Colesterol

El colesterol es una molécula esencial involucrada en el mantenimiento de la permeabilidad y fluidez de la membrana, como precursor en la síntesis de vitamina D y hormonas. En su mayoría, las células de los mamíferos son capaces de sintetizar y captar el colesterol del medio extracelular en forma de lipoproteínas y de secretarlo hacia el exterior, pero son escasas las células que pueden catabolizarlo, todos estos procesos que involucra la regulación de los niveles de colesterol intracelular ocurren al mismo tiempo y están perfectamente controlados (Daniels *et al.*, 2009). El colesterol es una molécula sumamente hidrófoba y por lo tanto, para ser transportada en el plasma, debe estar asociada a proteínas, las partículas que forman esta asociación se les denomina lipoproteínas. Las lipoproteínas se nombran de acuerdo a su densidad y se conocen 5 clases: quilomicrones, VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), LDL (proteínas de baja densidad) y HDL (proteínas de alta

densidad). De las anteriores, la partícula LDL es la que contiene una mayor cantidad de colesterol y la proteína que la forma es una sola molécula de apoproteína B-100 (Mathews et al., 2002).

1.2.1. Entrada del colesterol circulante a la célula: papel del receptor a LDL

La entrada del colesterol a las células de los distintos tejidos incluyendo a las células hepáticas ocurre principalmente por la internalización de las partículas LDL circulantes por medio del receptor a LDL (LDLR) presente en la superficie celular. Este receptor está agrupado en invaginaciones membranales, donde la proteína más abundante es la clatrina, involucrada en los procesos de endocitosis. El LDLR es capaz de reconocer a la apoproteína B-100 que forma parte de estas lipoproteínas, al unirse la partícula LDL al receptor de la membrana citoplásmica se fusiona en las cercanías del receptor y la invaginación recubierta de clatrina se convierte en una vesícula endocítica promoviendo la formación de un endosoma, que más tarde se fusiona con un lisosoma. Ahí, la apoproteína B-100 es hidrolizada a aminoácidos y los ésteres de colesterol hidrolizados para dar colesterol libre que se emplea principalmente en la formación de membranas. Por su parte, el receptor es reciclado a la membrana para captar más partículas. Este ciclo requiere aproximadamente de 10 minutos. El colesterol, una vez dentro de la célula, inhibe la síntesis de colesterol por parte de la HMGCR (hidroxi-metilglutaril-Coenzima A reductasa), activa a la acil CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT) con la finalidad de sintetizar ésteres de colesterol, de almacenar el exceso de colesterol y regula la síntesis del LDLR (Daniels et al., 2009; Mathews et al., 2002; Soccio and Breslow, 2004).

1.2.2. Biosíntesis del colesterol

La síntesis del colesterol se lleva a cabo en el RE en tres fases. La primera fase es la condensación de 2 moléculas de Acetil-CoA para generar acetoacetil-CoA, después este compuesto reacciona con otra molécula de Acetil-CoA lo que da como resultado 3-Hidroxi3-metilglutaril-CoA que es convertido a mevalonato por acción de la enzima más importante en este proceso, la HMGCR. Esta enzima es la limitante en la biosíntesis del colesterol y es el blanco farmacológico de las

estatinas, compuestos empleados para disminuir los niveles de colesterol plasmático. La segunda fase consiste en la conversión del mevalonato de 6 carbonos a escualeno (30 carbonos) por medio de la adición de intermediarios de 5 carbonos. Por último, el escualeno es ciclado y transformado a colesterol (27 carbonos) (Joven, 2001; Mathews et al., 2002).

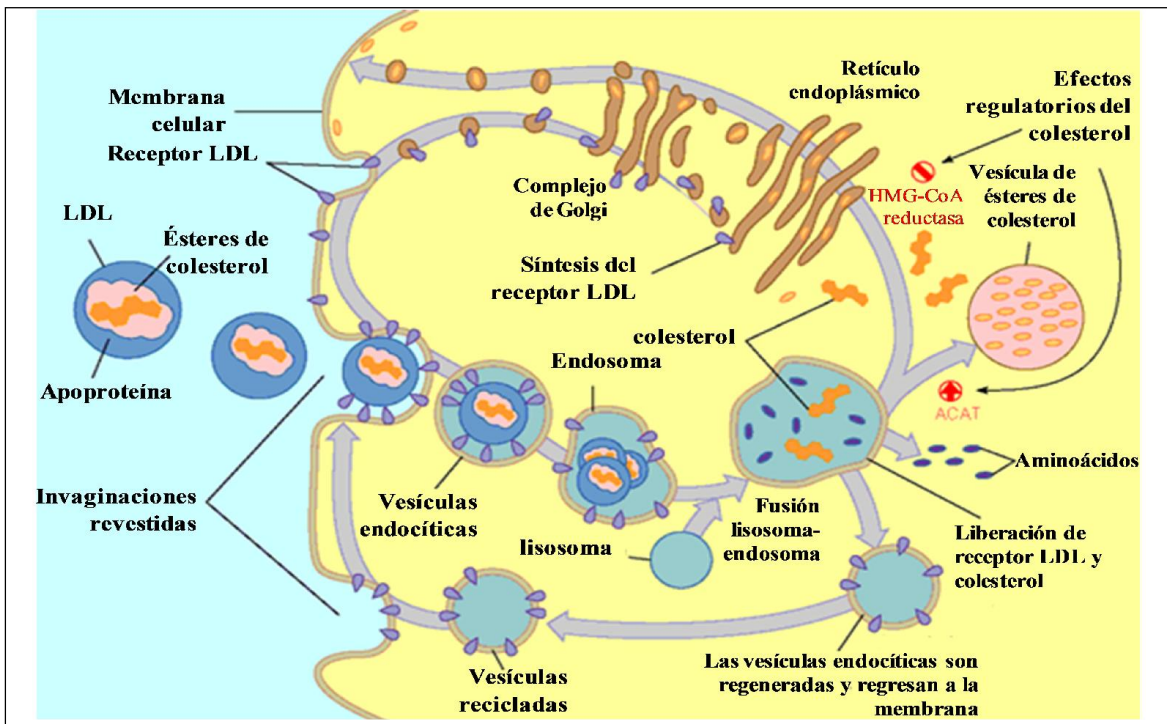


Figura 4. Implicación de los receptores LDL en la captación y metabolismo del colesterol. El receptor LDL (LDLR) capta partículas LDL a través de la endocitosis mediada por clatrina, la fusión de los endosomas con lisosomas permite la liberación de colesterol que regula a la HMG-CoA reductasa mientras el receptor se recicla (tomado de Mathews 3ª edición, 2002).

1.2.3. Regulación de los niveles de colesterol intracelular

El colesterol intracelular ejerce una retroalimentación negativa sobre los niveles de expresión del LDLR y de la enzima HMGCR. Los niveles de transcripción de los genes de estas dos proteínas, son controlados por SREs (del inglés: sterol regulatory elements) que en los genes de la enzima y homólogos. del receptor. En ambos promotores se unen factores de transcripción llamados SREBPs (del inglés: SRE binding proteins) y son requeridos para la transcripción efectiva de

ambos genes. Los SREBPs están insertados dentro de la membrana del RE asociados a SCAP (del inglés: SREBP cleavage activating protein), que también se encuentra unida a INSIG (insulin induced gene 1), otra proteína asociada al retículo endoplásmico. La interacción entre SCAP e INSIG es sensible a colesterol y mantiene al complejo proteico unido firmemente al RE funcionando como un sensor de colesterol. Cuando existe abundante colesterol intracelular, el colesterol se une a SCAP promoviendo un cambio estructural que finaliza en un incremento en la afinidad por INSIG y mantiene el complejo en la membrana, cuando existe ausencia de colesterol la proteína SCAP no es capaz de mantenerse unida a la proteína INSIG, liberando el complejo SREBP/SCAP donde el dominio N terminal que funciona como factor de transcripción es escindido del resto de la proteína por proteasas S1P y S2P, entonces la forma nuclear de SREBP migra hacia el núcleo y activa los genes que codifican para HMG-CoA reductasa y el LDLR llevando a un incremento en la concentración del colesterol celular (Daniels et al., 2009; Joven, 2001; Soccio and Breslow, 2004).

Otro mecanismo regulador importante en la síntesis del colesterol es la fosforilación de la HMGC. Se ha demostrado que la fosforilación en la serina 872 lleva a una inactivación de la enzima mientras que la desfosforilación aumenta su actividad. Las principales cinasas y fosfatasa que regulan la fosforilación de la HMGCR son AMPK (AMP-activated protein kinase) y PP2A (protein phosphatase-2) respectivamente (Wu et al., 2011).

1.3 Importancia de las balsas lipídicas y el colesterol en el ciclo replicativo del DENV

Los mecanismos virales de entrada, ensamblaje y salida de virus maduros son procesos importantes para la replicación viral. Se ha reportado que las balsas lipídicas, microdominios membranales ricos en colesterol y esfingolípidos, desempeñan un papel importante en estos procesos ya que concentran componentes celulares y virales necesarios para cada paso del ciclo replicativo de distintos virus (Chazal and Gerlier, 2003; Suzuki and Suzuki, 2006).

1.3.1 Entrada viral.

El DENV utiliza las balsas lipídicas para entrar en la célula huésped en algunas líneas celulares y en ellos, todos los receptores que interaccionan con el virus, y que han sido descritos hasta la fecha, se encuentran asociados a las balsas lipídicas o son reclutados a estas secciones de la membrana al momento de la infección (Puerta-Guardo et al., 2010). La importancia del colesterol y específicamente de las balsas lipídicas en el proceso de entrada de DENV ha sido reportado por varios autores, cuyos resultados sugieren que la integridad de las balsas lipídicas es necesaria durante el proceso infeccioso del DENV en monocitos/macrófagos en ausencia o presencia de anticuerpos facilitadores, así como también en células de neuroblastoma de ratón N18 (Lee et al., 2005; Puerta-Guardo et al., 2010; Reyes-Del Valle et al., 2005). De manera consistente, en nuestro laboratorio hemos obtenido una reducción significativa en la infección por DENV en la línea celular hepática Huh7 cuando se realiza un pre-tratamiento con fármacos capaces de impedir la formación de estos microdominios membranales (Soto-Acosta et al., 2013). En conjunto, estos resultados sugieren que el colesterol y las balsas lipídicas en membrana juegan un papel importante en el proceso de entrada del DENV. Uno de los mecanismos que posiblemente explique los resultados anteriores, es que la alteración de la integridad de las balsas lipídicas disminuye la unión del virus, ya que todos los receptores que se han identificado para el DENV son residentes de balsas lipídicas o son reclutados hacia estas estructuras al momento de la infección (Lee et al., 2008), de modo que, al alterar estas estructuras se reduciría la cantidad de receptores disponibles para la unión del DENV. Por otra parte, dado que las balsas lipídicas concentran moléculas asociadas a estos receptores que median la entrada viral, su disrupción impediría la asociación de dichas moléculas al receptor evitando así la coordinación de los procesos de unión y entrada viral.

1.3.2 Replicación viral.

El DENV y otros virus con genoma de RNA de polaridad positiva modifican las membranas del retículo endoplásmico con el fin de concentrar todos los factores

necesarios para la replicación del genoma viral (complejos replicativos) (Apte-Sengupta et al., 2014; Mukhopadhyay et al., 2005; Perera et al., 2008; Stiasny and Heinz, 2006). Perera et al., (2012) demostraron, en células derivadas de mosquito, diferencias significativas en el perfil lipídico intracelular de las células infectadas con DENV en comparación con células no infectadas. Los tipos de lípidos enriquecidos en las células infectadas tienen la capacidad de alterar la membrana estructural y funcionalmente, confirmando la idea que la infección con DENV promueve importantes rearrreglos membranales a través de la alteración en el metabolismo lipídico (Junjhon et al., 2014; Perera et al., 2012).

A este respecto, Heaton y colaboradores en el 2010, demostraron que la proteína NS3 de DENV es capaz de reclutar a la enzima necesaria para la síntesis de ácidos grasos hacia los complejos replicativos, incrementando su actividad. Dicho incremento en la síntesis de ácidos grasos podría estar coordinado con la síntesis del colesterol para incrementar la síntesis de membranas de los complejos replicativos (Heaton et al., 2010). Aunado a esto, se ha observado en la infección con distintos flavivirus que si la cantidad de colesterol presente en estos complejos se reduce, la replicación del genoma viral se ve afectada (Uchil and Satchidanandam, 2003). Específicamente, se sabe que el virus de la hepatitis C (HCV), promueve la formación de redes membranosas derivadas de las membranas del RE en las cuales el virus se replica, y según lo reportado por Lyn y colaboradores (2009), la replicación del HCV se ve afectada por el tratamiento con lovastatina, la cual es capaz de promover la dispersión del genoma viral de los complejos replicativos (Lyn et al., 2009). Todo esto sugiere que el colesterol puede tener la función de contener el genoma viral durante los procesos replicativos.

Además, se ha demostrado que si se inhibe la vía biosintética de colesterol (mediante el uso de estatinas o de siRNA contra proteínas de la vía de síntesis de colesterol), o si se impide la captura del colesterol del medio, la replicación viral en las líneas celulares A549 (de carcinoma de pulmón) y K562 (hematopoyéticas) disminuye considerablemente, demostrando que el colesterol participa de manera importante en este proceso (Rothwell et al., 2009).

Igualmente, se ha reportado que la infección con DENV induce un incremento de estructuras lipídicas formadas por esfingolípidos y ésteres de colesterol que se derivan del RE, denominadas “lipid droplets” (LD) a las que la maquinaria de ensamblaje viral se encuentra asociada, indicando que el proceso de ensamblaje requiere de estas estructuras (Carvalho et al., 2012; Faustino et al., 2014a; Faustino et al., 2014b; Martins et al., 2012; Samsa et al., 2009). Estos hallazgos son congruentes con el hecho de que la inhibición farmacológica de la sintasa de ácidos grasos (FASN) mediada por el fármaco C75 promueva una inhibición significativa de la morfogénesis del DENV (Poh et al., 2012; Samsa et al., 2009). Tomando en cuenta que estas estructuras están formadas por esfingolípidos y moléculas de colesterol esterificado se podría pensar que el colesterol se encuentra también involucrado en el proceso de ensamblaje.

En nuestro laboratorio, hemos observado que el tratamiento de células hepáticas Huh7 con fármacos capaces de reducir la concentración de colesterol (estatinas y NDGA) durante 24 y 48 horas reduce la cantidad de partículas virales y proteína NS1 secretadas al medio, sugiriendo una reducción en el proceso infeccioso. No obstante, estos resultados no dejan claro si la reducción del colesterol afecta específicamente la replicación, por inhibición de la formación de los complejos replicativos, o el ensamblaje viral por reducción en la cantidad de “lipid droplets”. Por lo anterior, un estudio más detallado de las distintas fases del ciclo replicativo sería importante para dilucidar en cuales de estos procesos es importante el colesterol.

1.3.3 Salida viral

Con la finalidad de definir si el colesterol es necesario para el proceso de salida del DENV, en nuestro laboratorio evaluamos el efecto del tratamiento con fármacos disruptores de balsas lipídicas en la salida viral. Así encontramos que el tratamiento con 2 de los 3 fármacos empleados (M β CD y filipina) reducen la salida del virus, sugiriendo que el proceso de salida del DENV es dependiente de colesterol. Recientemente, se ha reportado por otros autores que el colesterol es importante para el proceso de salida del DENV en la línea celular HMEC-1

(Martinez-Gutierrez et al., 2011; Martinez-Gutierrez et al., 2014). Estos datos indican que DENV emplea como puerta de salida estructuras ricas en colesterol; esta idea también está apoyada con la evidencia que existe de que el colesterol y las balsas lipídicas son importantes para el proceso de salida de otros virus envueltos como el virus de la Influenza, VIH y rotavirus (Cuadras et al., 2006; Simons and Ehehalt, 2002).

2 Justificación.

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial ya que presenta una elevada tasa de incidencia y un cuadro clínico que puede evolucionar hacia dengue severo. Dado que no existe tratamiento antiviral o vacuna y tomando en cuenta que algunas investigaciones sostienen que el colesterol y las balsas lipídicas juegan un papel importante en el ciclo replicativo del DENV, el definir la forma en que los mecanismos reguladores del colesterol celular participan en el proceso de infección será clave en el entendimiento de la patogenia del DENV y en la descripción de nuevos blancos terapéuticos. Por tanto, la manera en que el proceso de infección con DENV altera los principales mecanismos reguladores de los niveles de colesterol celular y su efecto en la de traducción, replicación o ensamblaje viral sentarán las bases para sustentar el uso de fármacos moduladores de colesterol en la infección por DENV.

3 Hipótesis.

La infección por DENV regula la síntesis y localización subcelular del colesterol y éste participa en los procesos de traducción, replicación y ensamblaje del DENV en las células Huh7.

4 Objetivo general

Analizar la modulación de los niveles de colesterol intracelular y los mecanismos que regulan su síntesis durante el proceso de infección por DENV en la línea celular hepática Huh7.

5 Objetivos específicos.

- 5.1** Determinar los niveles de balsas lipídicas y colesterol durante la infección por DENV.
- 5.2** Evaluar el efecto de la infección por DENV sobre los mecanismos reguladores de la biosíntesis de colesterol.
- 5.3** Analizar el efecto de la modulación de los niveles de colesterol sobre la formación de los complejos replicativos durante la infección por DENV.
- 5.4** Evaluar si el ácido nordihidroguaiaretico (NDGA), un fármaco hipolipemiante, presenta un efecto antiviral contra la infección por DENV y su mecanismo de acción.

6 Materiales y métodos.

6.1 Cultivo celular y cepas virales

Las células Huh7, una línea celular de hepatocitos diferenciados derivados de carcinoma celular (generosamente donadas por la Dra. Ana Rivas de la UANL) y las células Vero (células derivadas de riñón de mono verde africano) fueron cultivadas en medio "DMEM advanced" suplementado con 2 mM de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina y 5% de suero fetal bovino a 37°C y a una atmósfera de 5% CO₂. Las células Vero, establemente transfectadas con un replicón de DENV que expresa luciferasa como gen reportero, fueron crecidas en el mismo medio suplementado con G418 (Geneticina) como agente selectivo. Las células U937 que sobre expresan la principal molécula receptora para DENV (U937-DC SIGN) fueron cultivadas en medio RPMI Advanced suplementado de la misma forma que el DMEM Advanced empleado para las células Huh 7 y Vero.

La propagación del DENV serotipo 2 (New Guinea) y serotipo 4 (H241) fue hecha mediante inoculación en cerebro de ratón neonato y los títulos virales se determinaron mediante ensayos de plaqueo en células BHK-21 como se describió antes (Mosso et al., 2008). El título viral fue corroborado por ensayo de focos fluorescentes tal y como se describió previamente (Payne et al., 2006).

La propagación del Virus de la estomatitis vesicular (VSV) como control de virus envuelto no relacionado fue realizada en la línea celular MDCK (riñón de perro

Madin Darvin) durante 24 horas de infección. Posteriormente, las células se lisaron y el título viral se estimó mediante ensayos de plaqueo.

Para la inactivación del virus mediante luz ultravioleta, las preparaciones virales fueron tratadas con 20 µg/mL de psoralen e incubados en presencia de luz UV durante al menos 1 hora. Las preparaciones irradiadas con luz ultravioleta fueron tituladas por ensayos de plaqueo para confirmar la inactivación viral.

6.2 Inmunofluorescencia de balsas lipídicas, colesterol celular y niveles del receptor LDLr sobre la superficie celular.

La unión de la subunidad β de la toxina colérica al glicosfingolípido GM1, lípido residente de balsas lipídicas, se usó para detectar estas estructuras. Las células crecidas en portaobjetos se infectaron con DENV activo, UV DENV (virus inactivo) y VSV por 1, 6 y 12 hpi. Para teñir las balsas lipídicas, las células se lavaron 3 veces con PBS 1x y se fijaron con *p*-formaldehído al 1% durante 30 min a temperatura ambiente (TA). A continuación, se bloquearon con buffer de bloqueo (PBS 1x, SFB 10%, albúmina de suero bovino (BSA) 3%, glicina 10 mM) durante toda la noche y se tiñeron durante una hora a 37°C con toxina colérica acoplada a un fluorocromo (Vybrant® Alexa Fluor® 555 Lipid Raft Labeling Kit o cholera toxin subunit B recombinant, Alexa Fluor® 488 conjugate). La toxina colérica acoplada fue diluida 1:100 en búfer diluyente (PBS 1x, SFB 3%, BSA 1%, glicina 10 mM). Después las células se lavaron con PBS 1x NH₄Cl 50 mM durante 5 min ocho veces y una vez con PBS 1x. Finalmente, las laminillas se montaron en cubreobjetos con 4 µl de VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI y se observaron en el microscopio confocal Leyca. La intensidad de fluorescencia se calculó ajustando la fluorescencia correspondiente la toxina colérica con la fluorescencia de los núcleos. El resultado se expresó como Unidades Arbitrarias (A.U.).

Para teñir el colesterol intracelular, las células infectadas, fijadas y bloqueadas se incubaron con Filipin III complex (SIGMA) 50mg/ml durante 1 hora a RT. La fluorescencia se analizó como se mencionó anteriormente. Para determinar los niveles membranales del LDLr, las células infectadas como anteriormente se

describió se fijaron y sin paso previo de permeabilización se tiñeron con rabbit anti-LDLR antibody (Abcam ab30532) diluido 1:200 en solución de dilución y anti-rabbit IgG, Cy3-Linked (Amersham). La fluorescencia correspondiente al receptor en la membrana celular se analizó como anteriormente se describió.

6.3 Ensayo de captación de partículas LDL

Las células Huh7 se crecieron e infectaron con las condiciones experimentales mencionadas en resultados por 1, 6 y 12 hpi. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X frío y se incubaron durante 30 min a 4°C con 3 mg/mL de LDL acoplado a Dil (fluoróforo) (Dil-LDL particles, Molecular probes) diluido en solución A (medio DMEM sin rojo de fenol adicionado con Hepes 10 mM). Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se bloquearon durante 15 min a 4°C con solución B (medio Hank's con 2 mg/mL de BSA) y se fijaron con PFA 1%. La actina se tiñó con faloidina-Alexa 647 (Invitrogen) diluida 1:20 en solución diluyente durante 1 hora a 37°C. La fluorescencia fue analizada como se mencionó anteriormente para la tinción del LDLr membranal.

6.4 Determinación de colesterol total por colorimetría y por citometría de flujo.

Las células cultivadas en placas de 6 pozos se lavaron 3 veces con PBS 1x y se lisaron con 250 µl de buffer de lisis RSB-NP40 (MgCl₂ 1.5 mM, Tris-HCl pH 7.5 10 mM, NaCl 10 mM, IGEPAL 1%) aplicado directamente al pozo durante 15 min en agitación lenta. Una vez lisadas las células, se colocaron 50 µl del lisado en una placa de 96 pozos y se le añadieron 50 µl de solución para determinar colesterol (colesterol oxidasa, peroxidasa), se dejó reaccionar de 10 a 15 min a 37°C y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en el lector de placa de 96 pozos biotek ELx808 Absorbance Microplate Reader. Para medir la cantidad de colesterol intracelular por citometría de flujo, las células infectadas se recolectaron y se fijaron con PFA 1%, se bloquearon y se tiñeron con Filipin III complex (75mg/ml). Las células teñidas se resuspendieron en PBS y la fluorescencia se registró en el canal Violeta 1 en el citómetro Cyan ADP (Beckman Coulter) y los

datos se analizaron mediante el software FlowJo 7.6.5. En los ensayos, 20,000 células se contaron por muestra y los resultados se expresaron como la intensidad de fluorescencia normalizada con las células control.

6.5 Ensayos de Western Blot.

Para analizar los niveles proteicos del receptor LDL, las células crecidas en placas de cultivo p100 se infectaron con las condiciones experimentales mencionadas y se lisaron a 1, 6 y 12 hpi con la solución de lisis descrita para la determinación total de colesterol, los lisados totales se clarificaron por centrifugación (10,000 RPM) y 50 µg de proteína se sometieron a separación por geles SDS-PAGE e inmunoblot usando Rabbit polyclonal antibody anti-LDLR (ABCAM 30532) diluido 1:1000. La densitometría de las bandas se realizó mediante el software ImageJ (NIH) y ajustadas con la densitometría de su control de carga (β actina). Las densitometrías ajustadas para cada condición se normalizaron con la condición control y expresado como veces de cambio (Fold Change). Para estudiar la fosforilación de los niveles de HMGCR en las células infectadas se lisaron con una solución que contiene 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% desoxicolato de sodio; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1µg/ml de aprotinina, leupeptina, pepstatina; 1 mM Na₃VO₄; 1 mM NaF. Posteriormente, 50 µg de proteína se analizó por Western blot usando anticuerpos dirigidos contra la HMGCR total HMGCR (US Biological H6201-01B) y contra la HMGCR fosforilada (pHMGCR, Millipore 09-356). La densitometría de la HMGCR total se realizó como se describió para el receptor, posteriormente para la densitometría de la pHMGCR se ajustó con los valores de la enzima total para cada condición y se normalizó con las células control. Los testigos de infección de los ensayos de actividad y la cuantificación de proteína también se analizaron por ensayos de Western blot siguiendo las indicaciones mencionadas en este apartado.

6.6 Viabilidad celular.

La viabilidad celular de las células Huh7 y Vero se evaluó mediante la reducción de MTS de acuerdo a las especificaciones del fabricante (cell titer 96 Aqueous

One Solution Cell Proliferation Assay Promega). La viabilidad de las células U937-DC SIGN se evaluó por citometría de flujo mediante la incorporación de yoduro de propidio (PI uptake).

6.7 Medición de progenie viral y secreción de NS1.

Los sobrenadantes de células infectadas y tratadas con los distintos fármacos empleados en este trabajo se sometieron a ensayos de medición de progenie viral por titulación en placa o por ensayo de focos previamente descritos. Los sobrenadantes también se usaron para determinar los niveles de secreción de NS1 como indicador de infección, medida por absorbancia mediante ensayos de ELISA (Platelia, Biorad) (Ludert et al., 2008).

6.8 Medición de genoma viral y actividad de luciferasa.

Para determinar el genoma viral de células infectadas y tratadas con los distintos fármacos empleados en este trabajo el RNA total se obtuvo mediante el kit Zymo Research QuickRNA (MicroPrep). La RT-PCR cuantitativa se realizó por el método de SYBR Green usando como templados secuencias nucleotídicas correspondientes al gene de la proteína NS5, reportados por Chien et al. (2006) en el sistema ECO ILLUMINA. La cantidad de transcritos de RNA viral se calculó generando una curva estándar de diluciones en base 10 del RNA aislado de una preparación de DENV2 y DENV4 titulado por plaqueo y expresado como unidades formadoras de placa equivalentes por mililitro (PFU eq/ml) (Callahan et al., 2001; Chien et al., 2006; Johnson et al., 2005).

La actividad de luciferasa de células Vero que expresan el replicón de DENV4 se realizó mediante el protocolo indicado por el fabricante (Renilla luciferase assay system, Promega).

6.9 Inmunofluorescencia y citometría del flujo para evaluar cantidad y distribución de proteínas virales y celulares.

La tinción de proteínas virales y celulares para su posterior análisis por microscopía confocal se realizó de la siguiente manera. Las células infectadas y

tratadas con las condiciones específicas para cada ensayo se fijaron y se permeabilizaron siguiendo las especificaciones del protocolo del fabricante del kit Cytotfix/cytoperm (BD 554714). Posteriormente, la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente diluido en solución permeabilizadora del kit (para mayor información ver lista de anticuerpos en (tabla 1). La detección del anticuerpo primario se realizó usando un anticuerpo anti-conejo, anti-ratón o anti-chivo (según sea el caso) acoplado a un fluoróforo (tabla 1). Finalmente, los núcleos se tiñeron con Hoechst (Life Invitrogen) y las laminillas se analizaron usando el sistema de microscopía confocal Zeiss LSM700 laser confocal. La tinción de los Lipid droplets se realizó usando la tinción con el marcador de lípidos neutros Bodipy 495/505 (Life Invitrogen). La citometría de flujo la empleamos para conocer la cantidad de células infectadas en respuesta a algún tratamiento o para validar la capacidad infecciosa del stock viral. El protocolo empleado fue el mismo que se utilizó para la microscopía confocal con la diferencia que las células infectadas y tratadas se despegaron como se indicó anteriormente, como indicador de infección se utilizó el marcaje de la proteína viral E. Para esto, 10,000 células de cada condición se analizaron en el sistema LSR Fortessa (BD) y los datos se obtuvieron con el software FlowJo 7.6.5. (Ver tabla 1 para más información de los anticuerpos usados).

6.10 Ensayo enzimático de la HMGCR, PP2A y AMPK.

La actividad enzimática de la HMGCR se evaluó mediante un ensayo de extinción del NADPH. Está bien descrito que cuando la enzima HMGCR convierte su sustrato en mevalonato oxida dos moléculas de NADPH a NADP⁺ así, la cantidad de NADPH puede ser medida por espectrometría y la reducción de este valor indica actividad enzimática de la HMGCR. Las células infectadas y tratadas se lisaron a los tiempos post-infección indicados con solución de lisado especificada para los ensayos de fosforilación de AMPK. Diez μ L de lisado celular previamente clarificado (10,000 RPM) se analizaron siguiendo las indicaciones del protocolo del fabricante (HMG-CoA reductase assay kit, SIGMA), como control positivo se utilizó

la enzima recombinante proporcionada por el kit. Como blanco se empleó el indicado en el protocolo adicionando 10 μ l de solución de lisis. La actividad se expresó como Unidades por mg de proteína donde 1 unidad es la cantidad de HMGCR que oxida un 1 μ mol de NADPH por minuto.

Para evaluar la actividad enzimática de PP2A se utilizó un kit de actividad basado en inmunoprecipitación (PP2A immunoprecipitation Phosphatase Assay Kit, MERCK MILLIPORE 17-313) siguiendo las indicaciones y cuidados mencionados en el protocolo del fabricante. Brevemente, las células infectadas y tratadas se lisaron con la solución de lisis especificada en la hoja técnica del kit y 100 μ g de proteína de cada muestra se sometieron a inmunoprecipitación usando un anticuerpo específico para PP2A total. Las perlas que contenían a la PP2A se incubaron con un fosfopéptido específico para la subunidad catalítica de PP2A y su actividad se midió a través de la liberación de fosfatos y su reacción con verde de malaquita. La actividad de PP2A se expresó como picomoles de fosfatos liberados.

La actividad de AMPK de las células infectadas y tratadas con los fármacos descritos se ensayó por ELISA mediante la cuantificación de la fosforilación de esta cinasa en la treonina 172 (AMPK[pT172] ELISA Kit, Life technologies KHO0651). Brevemente, las células se lisaron con solución de lisis especificada en la hoja técnica del producto y 100 μ g de proteína de cada muestra a analizar se sometieron al ensayo de ELISA siguiendo las indicaciones del protocolo del fabricante.

6.11 Anticuerpos empleados.

Anticuerpo	Casa comercial o fuente	Catálogo o clona	Ensayo y dilución de trabajo
Anti-proteína viral E	Purificado de Fluído ascítico de ratón	4G2	C.F. 1:200; M.F. 1:200
Anti-proteína viral prM	Sobrenadante de hibridoma	2H2	Focos 1:100
Anti-proteína viral cápside	GENETEX	GTX 103343	M.F. 1:200; W.B. 1:1000
Anti-proteína viral NS3	GENETEX	GTX 124252	M.F. 1:1000; W.B. 1:3000
Anti-proteína viral NS4A	GENETEX	GTX 124249	M.F. 1:1000; W.B. 1:1000; M.E.T. 1:30
Anti-LDLr	ABCAM	AB30532	W.B. 1:500; M.F. 1:200
Anti-HMGCR	USbiological	H6201-01B	W.B. 1:500
Anti-HMGCR	Santacruz	SC-27578	M.F. 1:100; M.E.T. 1:20
Anti-HMGCR	ABCAM	Ab174830	W.B. 1:500
Pollo anti-conejo Alexa 488	Invitrogen	A-21441	M.F. 1:300
Burro anti-conejo Alexa 647	Invitrogen	A-31573	M.F. 1:300
Chivo anti-ratón Alexa 405	Invitrogen	A-31553	C.F. 1:300
Burro anti-ratón Alexa 488	Invitrogen	A-21202	M.F. 1:200; C.F. 1:200
Burro anti-chivo Alexa 555	Invitrogen	A-21432	M.F. 1:100

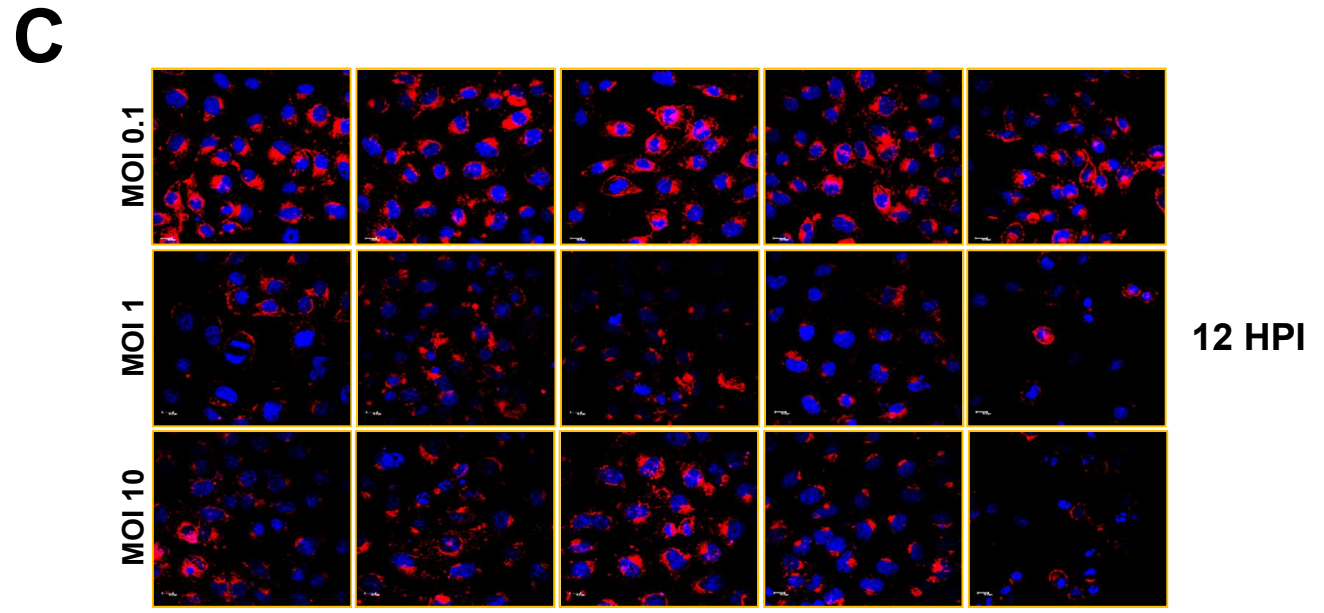
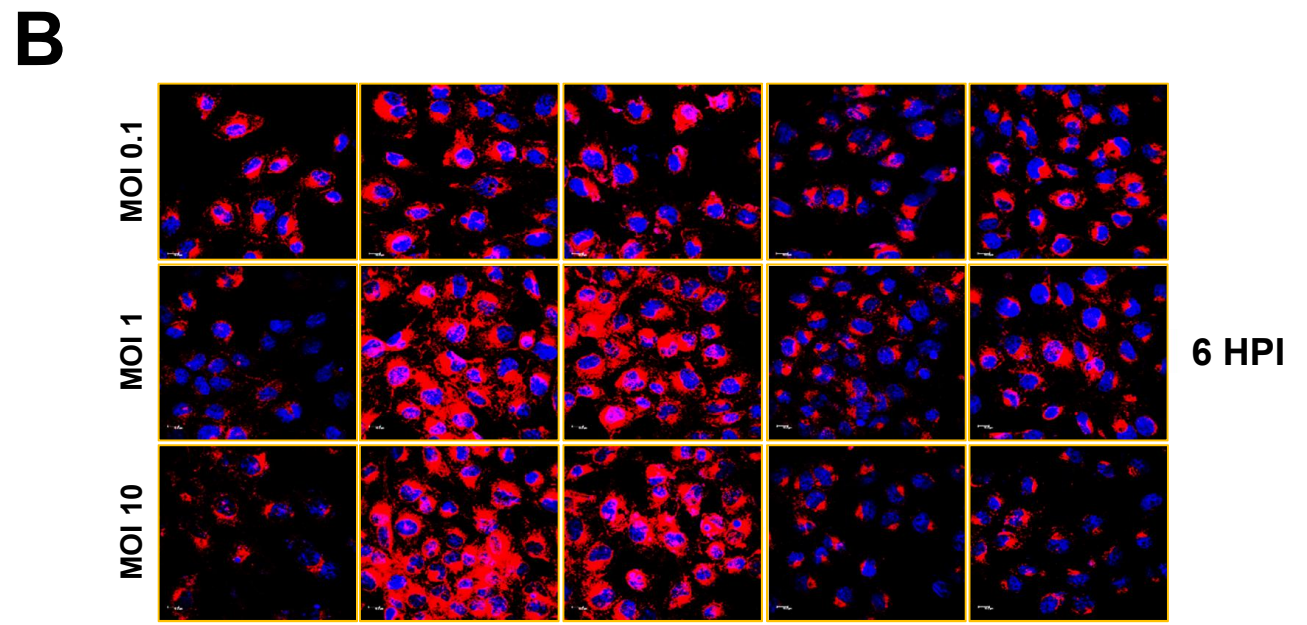
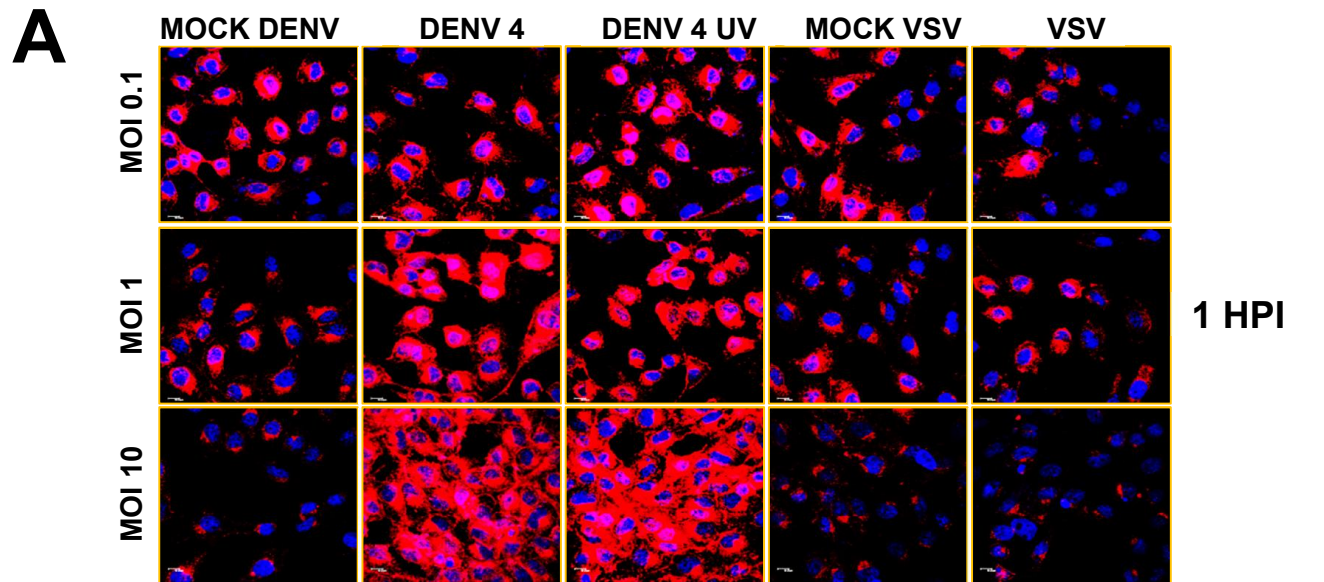
Tabla 1. Descripción de los anticuerpos empleados. W.B. western blot; M.F. Microscopía de fluorescencia confocal; C.F. citometría de flujo; M.E.T. microscopía electrónica de transmisión. InmEVia

7 Resultados.

7.1 La infección con DENV4 induce un incremento en la formación de balsas lipídicas y en los niveles de colesterol total.

Dada la importancia del colesterol en el ciclo replicativo del DENV y otros flavivirus, la posibilidad que la infección por DENV pudiera modular los niveles de colesterol y balsas lipídicas en las células hepáticas Huh7 fue investigada. Para analizar esta opción se evaluó la formación de balsas lipídicas y la cantidad de colesterol intracelular a distintos tiempos post-infección (1, 6 y 12 h.p.i.).

La cantidad de balsas lipídicas se determinó usando la tinción del GM1 con toxina colérica marcada con un fluoróforo (Alexa 555) mediante microscopía confocal (Figura 5). A 1 h.p.i, se observó un incremento de hasta 3 veces en la unión de la toxina colérica a las células infectadas con virus activo (DENV4) así como a las células incubadas con virus inactivado (UV-DENV44) a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. A una MOI de 10, este incremento fue de hasta 4 veces (Figura 5A). A las 6 hpi, la intensidad de fluorescencia correspondiente a la unión de la toxina colérica presentó un incremento de 2 (MOI 1) y 3 (MOI 10) veces en comparación con las células control. Este incremento fue menor que el observado durante la primera hpi. Interesantemente, a las 12 hpi la cantidad de balsas lipídicas sobre la membrana de las células infectadas fue muy similar al de células no infectadas. En conjunto, estos datos sugieren que la infección por DENV incrementa la cantidad de balsas lipídicas sobre la membrana celular a tiempos tempranos de la infección (1 y 6 hpi) y dicho efecto es dependiente de la multiplicidad de infección y no requiere que las partículas virales sean infectivas. Por tanto, es probable que tan solo el proceso de unión de DENV con su molécula receptor o el proceso de entrada viral sean los responsables en promover el incremento observado. Por otro lado, los resultados también nos permiten decir que este efecto de aumento de balsas lipídicas es específico de DENV ya que en las células Huh7 que fueron infectadas con VSV a MOI de 0.1, 1 y 10 no se observaron cambios en la cantidad de balsas lipídicas.



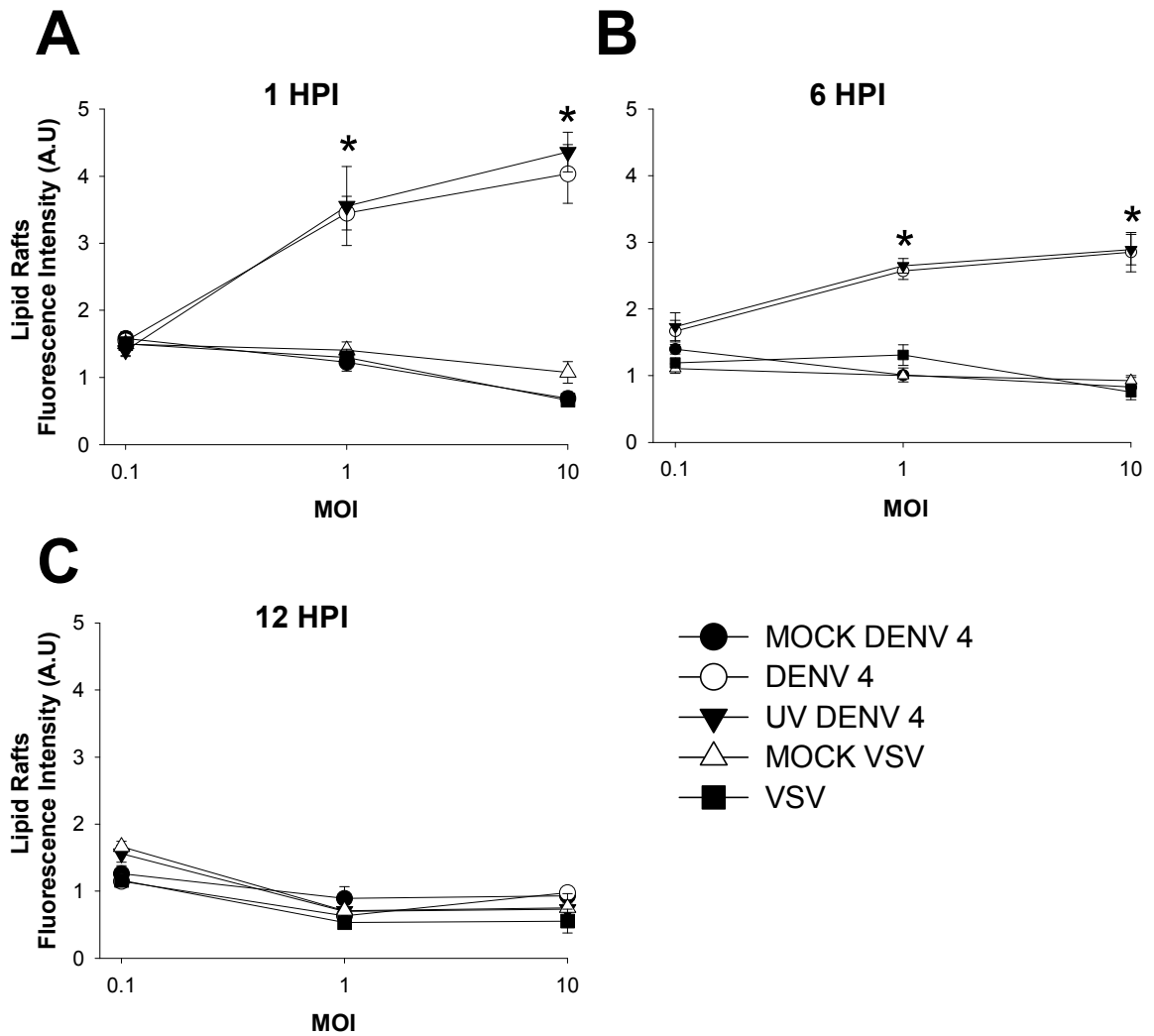


Figura 5. Efecto de la infección por DENV4 en las células Huh7 sobre la formación de balsas lipídicas. Las células infectadas a diferentes MOI con DENV4, UV DENV4, VSV o control se fijaron a 1 (A), 6 (B) y 12 (C) hpi. Las balsas lipídicas se tiñeron con toxina colérica acoplada a Alexa 555 (red) y se analizaron por microscopía confocal. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes por duplicado. Las gráficas representan la intensidad de fluorescencia de las balsas lipídicas expresada como unidades arbitrarias. *= $p < 0.05$

La formación de las balsas lipídicas comienza en el aparato de Golgi, donde el colesterol proveniente del RE es ensamblado a esfingolípidos y sigue la ruta secretora donde finalmente es anclado a la membrana celular (Simons and Sampaio, 2011). Para determinar si el incremento en la cantidad de balsas lipídicas corresponde a un incremento en la cantidad de colesterol intracelular, los niveles de colesterol se midieron por ensayos colorimétricos en células Huh7 infectadas a una MOI de 3, a 1, 6 12 y 18 hpi (Figura 6). Los resultados indican un incremento en la cantidad de colesterol a 1 hpi en células infectadas con DENV4 activo e inactivo; sin embargo, a 6 hpi solamente el virus activo (DENV4) fue capaz de mantener el incremento observado en los niveles de colesterol intracelular, el cual, a las 12 hpi, regresó a niveles basales. En las células infectadas con virus inactivo (UV-DENV4), a pesar del incremento en la cantidad de colesterol observado a 1 hpi, los niveles de retornaron a niveles basales a las 6 y 12 hpi. Estos datos sugieren que el proceso de entrada viral desencadena el incremento en la cantidad de colesterol intracelular, pero un evento post-entrada es necesario para mantener este efecto.

Con el fin de corroborar el incremento de colesterol total observado por espectrofotometría, las células fueron infectadas a distintas multiplicidades de infección (0.1, 1 y 10) y el colesterol fue marcado con el complejo Filipina III (molécula capaz de formar complejos fluorescentes con colesterol). Las células fueron analizadas por citometría de flujo (Figura 7) y microscopía confocal (Figura 8). Los resultados obtenidos con ambos métodos confirmaron nuestras observaciones previas. La infección con DENV induce un incremento en la tinción de filipina en una forma dependiente de la MOI. Además, se observó que mientras las infecciones con DENV4 y UV-DENV44 indujeron un incremento en la tinción de filipina a 1 hpi, solo el virus activo (DENV4) fue capaz de mantener el efecto hasta las 6 horas cuando las células fueron infectadas a MOI de 1 y 10.

Como previamente se observó, a las 12 hpi la intensidad de fluorescencia de filipina en las células infectadas retornó a niveles basales excepto en las células infectadas a MOI de 10. De nuevo, estos resultados sugieren que el incremento en la concentración de colesterol observado a 1 hpi es desencadenada por la

interacción entre DENV y sus receptores o por el proceso de entrada, pero es necesario que exista replicación viral para que éste incremento se mantenga a las 6 hpi. En contraste, y como habíamos observado con las balsas lipídicas, la infección con VSV no indujo ningún cambio en la tinción con filipina, confirmando que este efecto es inducido específicamente por la infección con DENV.

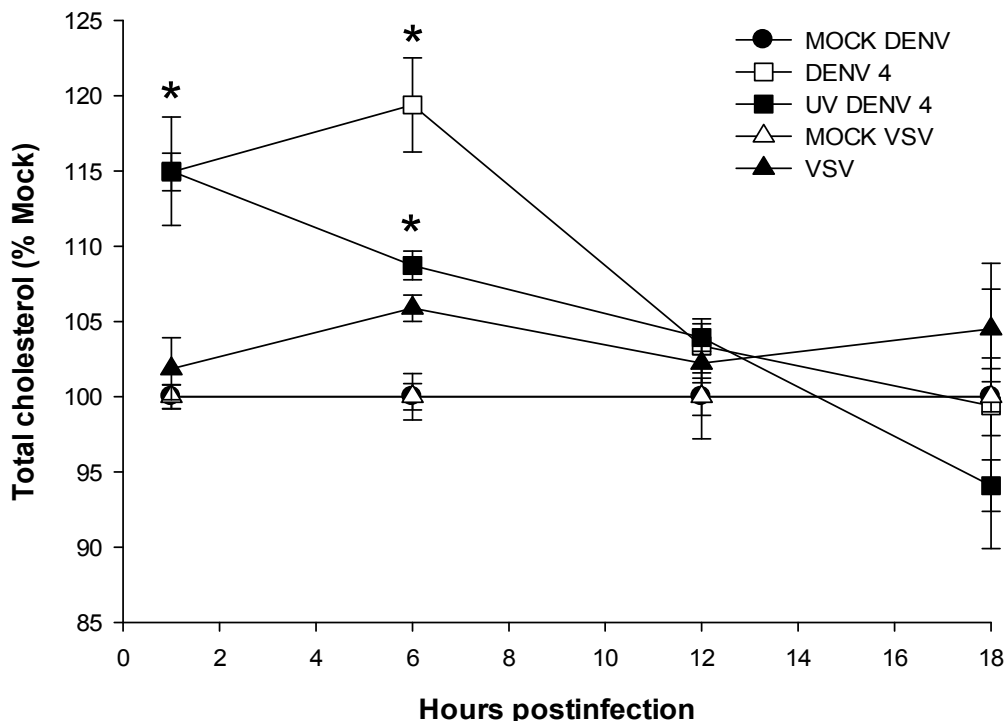


Figura 6. Efecto de la infección por DENV4 sobre los niveles de colesterol total en las células Huh7. Las células infectadas con DENV4, UV DENV4 y VSV se infectaron a MOI de 3, se lisaron a los tiempos indicados y la cantidad de colesterol intracelular se midió por ensayos colorimétricos. Los resultados se expresaron como la media normalizada \pm SEM de 3 experimentos independientes. *= $p < 0.05$

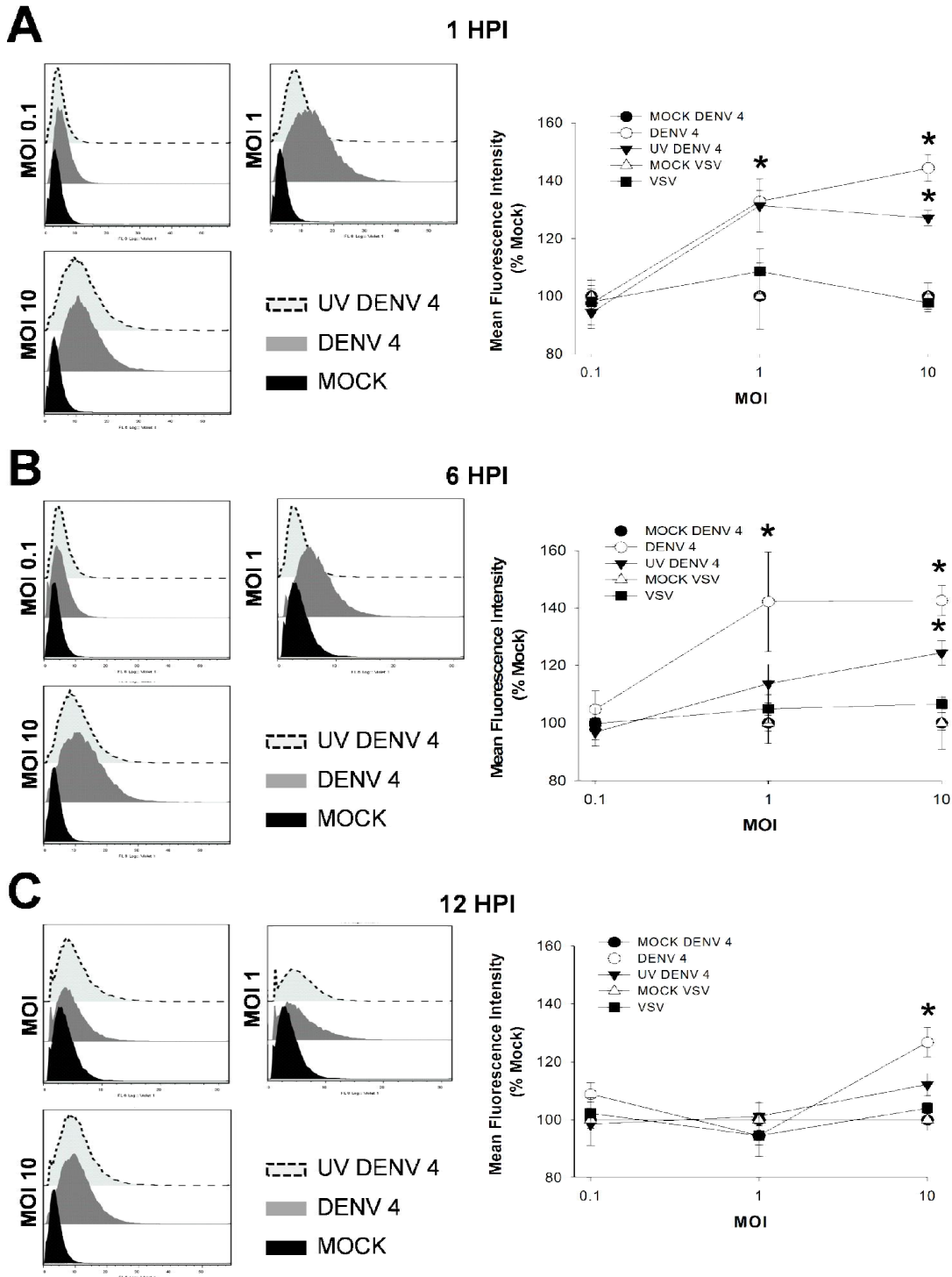


Figura 7. Niveles de colesterol total en células Huh7 infectadas con DENV4 determinado por citometría de flujo. Las células se infectaron con DENV 4, UV DENV 4 y VSV a MOI de 0.1, 1 y 10 se fijaron a 1 (A), 6 (B) y 12 (C) hpi. El colesterol intracelular se tiñó con filipin III complejo y se cuantificó por citometría de flujo. Resultados se expresan como la intensidad de fluorescencia media normalizada con las células Mock de 3 experimentos independientes por duplicado. $*=p<0.05$

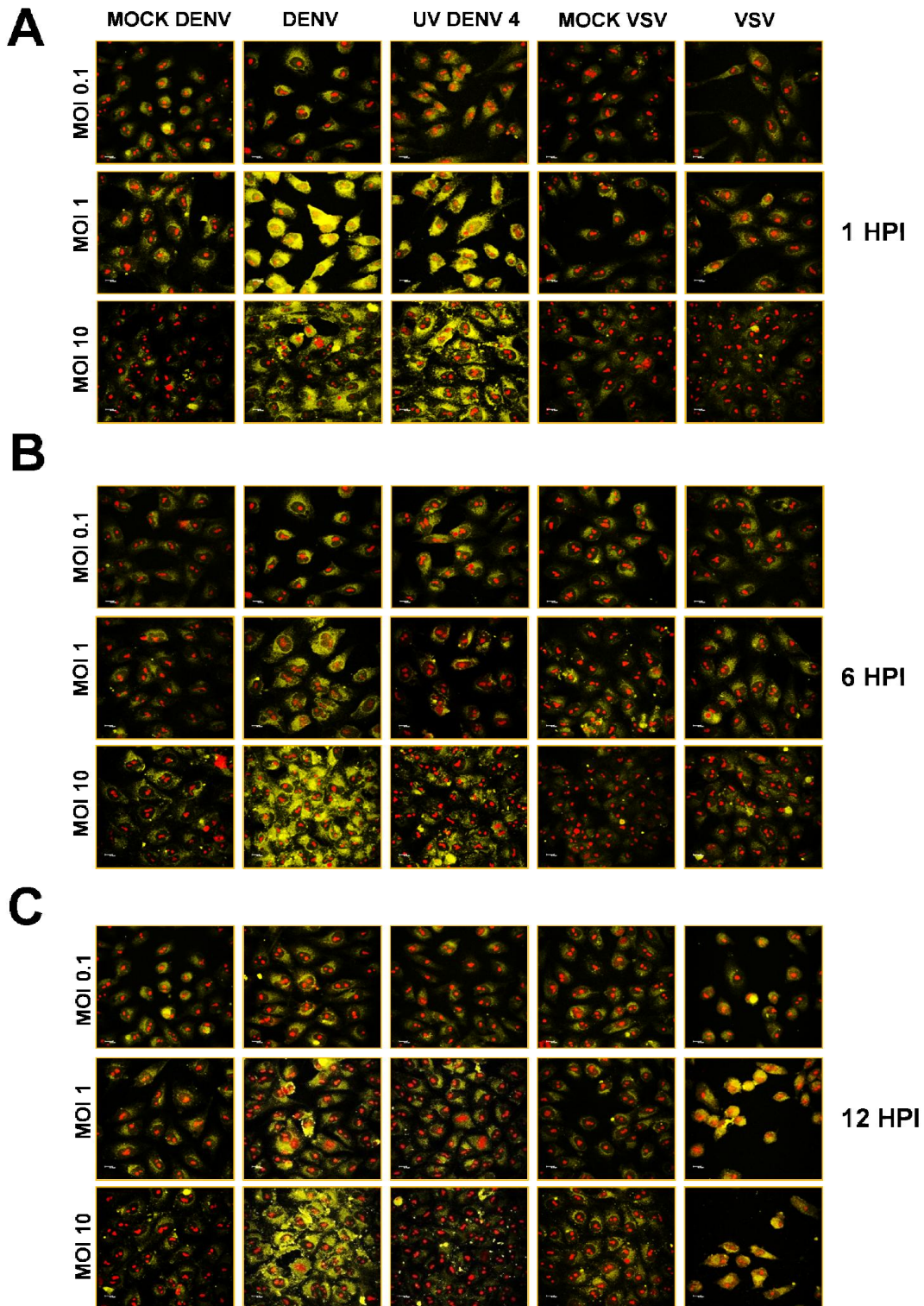


Figura 8. Niveles de colesterol total en células Huh7 infectadas con DENV4 determinados por microscopía confocal. Las células se infectaron con DENV 4, UV DENV 4 y VSV a MOI de 0.1, 1 y 10 se fijaron a 1 (A), 6 (B) y 12 (C) hpi. El colesterol intracelular se tiñó con filipin III complex y se analizó por microscopía confocal. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes por duplicado.

7.2. Efecto de la infección por DENV4 sobre los niveles del receptor LDLR.

El aumento en el contenido de colesterol intracelular puede ser mediado por el incremento en la captación de colesterol y/o por el incremento en su síntesis. El mecanismo de captación es principalmente facilitado por un incremento en la captura de partículas LDL mediante el LDLR. Como un primer acercamiento para analizar la cantidad de receptor glicosilado y sin glicosilar se llevaron a cabo ensayos de western blot en extractos totales de células infectadas con DENV, UV-DENV4 o células control a distintos tiempos post-infección (1, 6 y 12 hpi) (Figura 9). El LDLR contiene varios sitios de glicosilación que sirven como dominios de unión para numerosos carbohidratos. Se ha descrito que los glicanos unidos a los dominios extracelulares de algunas proteínas de membrana son importantes para su localización membranal (Delacour and Jacob, 2006; Vagin et al., 2009). Debido a que no se detectó ningún cambio en los niveles de proteína glicosilada (de 95 kDa) a ningún tiempo post-infección y solo se observó un ligero incremento en la proteína glicosilada a 1 hpi en las células infectadas con DENV4, era posible que ese incremento en la cantidad del receptor ocurriera en la membrana celular, por lo tanto, esta posibilidad se evaluó mediante microscopía confocal (Figura 10). El resultado obtenido indicó un incremento del LDLR en la superficie celular de hasta dos veces, medido como intensidad de fluorescencia a 1 y 6 hpi pero no a 12 hpi. Inesperadamente, las células infectadas con UV-DENV44 no incrementaron los niveles del receptor en la membrana a ningún tiempo post-infección, sugiriendo que un evento posterior a la unión y entrada del virus es necesario para promover el incremento o relocalización del LDLR a la superficie celular. Es interesante resaltar que en la superficie de las células no infectadas (MOCK) el LDLR tiene una distribución punteada, mientras que en las células infectadas el patrón de distribución del LDLR cambia a un patrón de grupos o parches. Este tipo de distribución del receptor ocurre en respuesta a la unión y endocitosis de su ligando, la partícula LDL (Zhang et al., 1997). Por lo tanto, el incremento y cambio de distribución del LDLR en la superficie celular sugiere un aumento en la captación de partículas LDL.

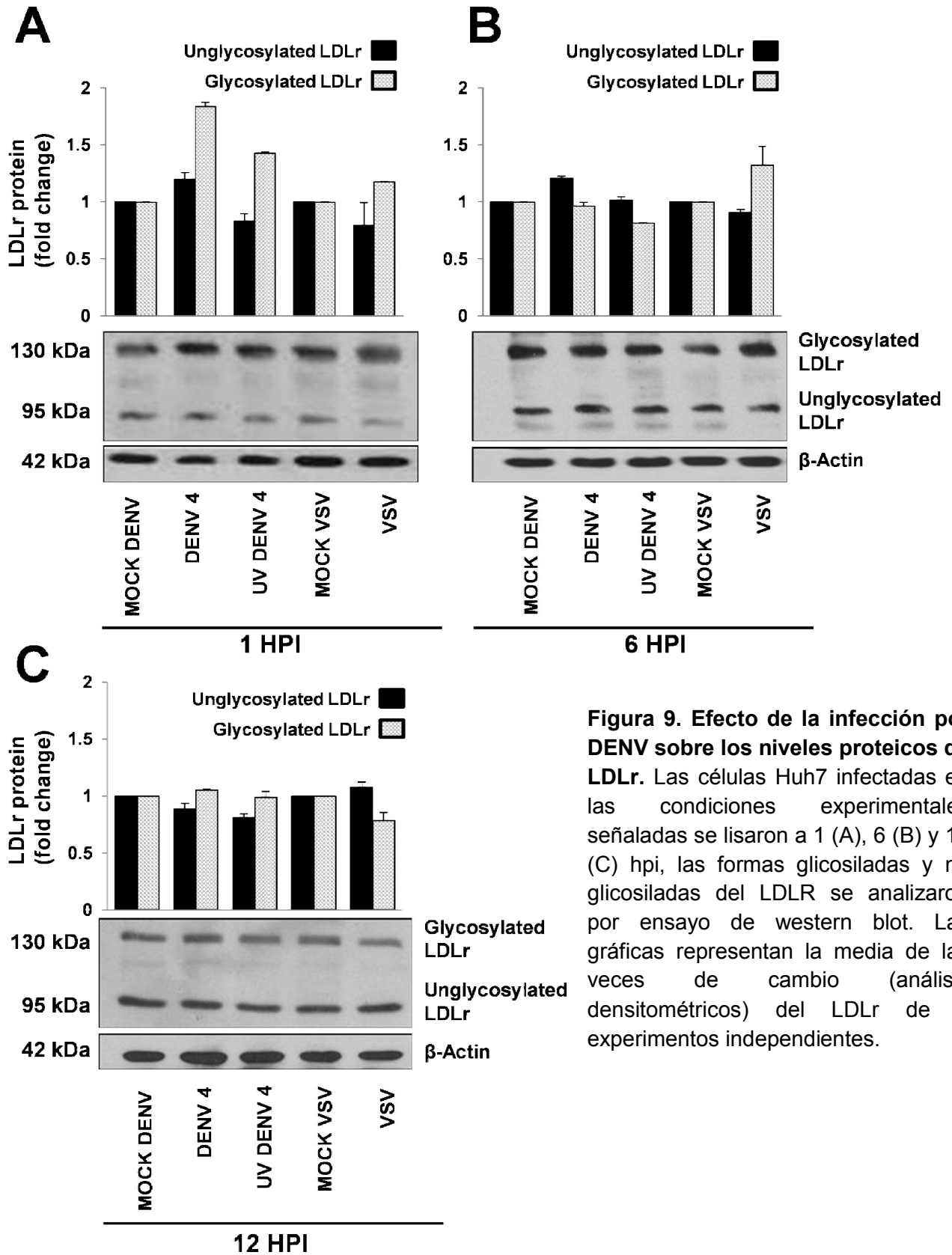


Figura 9. Efecto de la infección por DENV sobre los niveles proteicos de LDLr. Las células Huh7 infectadas en las condiciones experimentales señaladas se lisaron a 1 (A), 6 (B) y 12 (C) hpi, las formas glicosiladas y no glicosiladas del LDLr se analizaron por ensayo de western blot. Las gráficas representan la media de las veces de cambio (análisis densitométricos) del LDLr de 3 experimentos independientes.

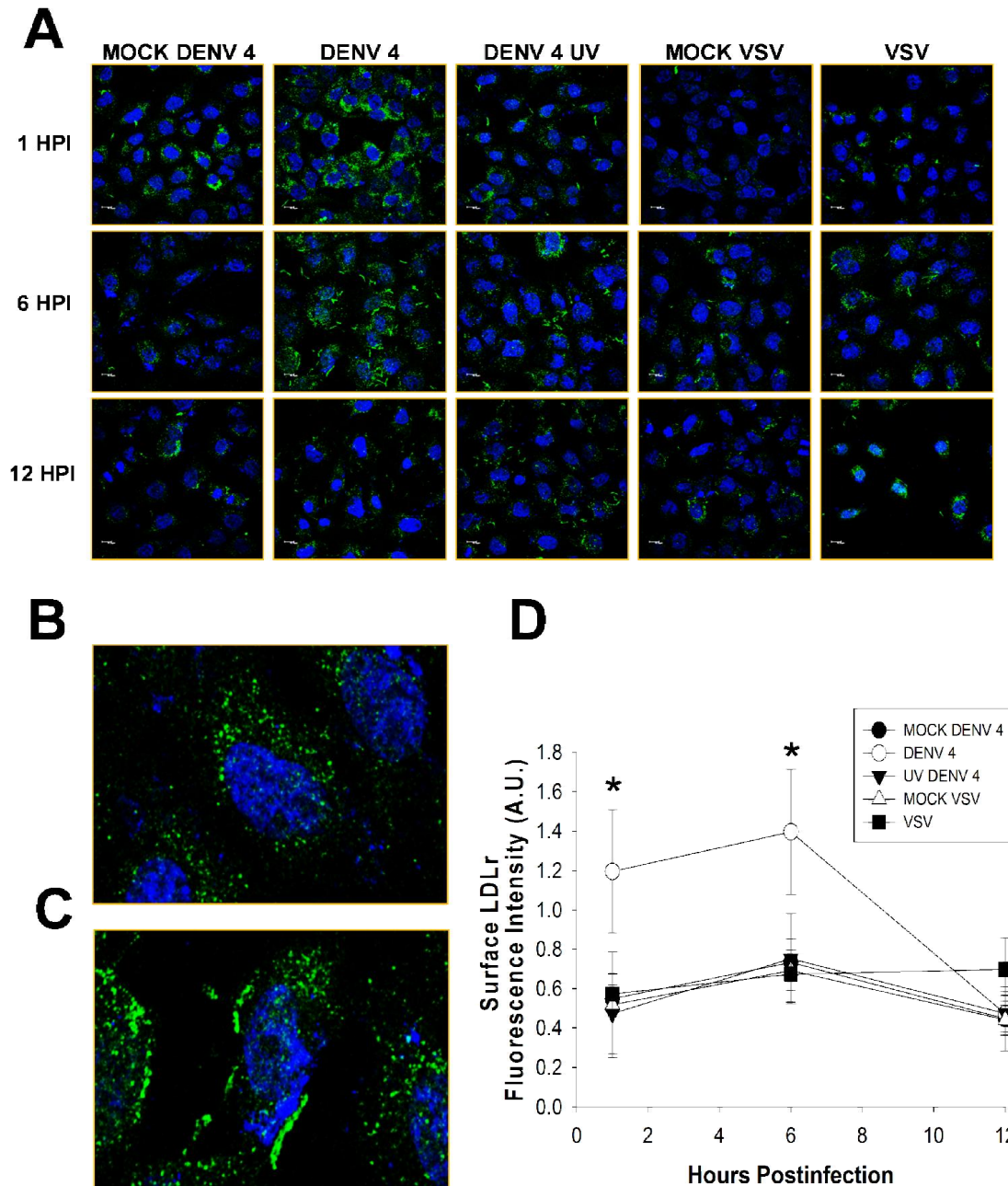


Figura 10. Efecto de la infección por DENV4 en la cantidad de LDLR sobre la superficie celular. (A) Células Huh-7 no permeabilizadas se infectaron con las condiciones experimentales descritas y a los tiempos indicados el receptor LDL presente en la membrana celular se tiñó usando un anti-LDLR y un anticuerpo anti-conejo-Alexa 488 (verde). Las células se analizaron por microscopía confocal. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes por duplicado. Imágenes de células mock (B) e infectadas con DENV4 (C) fueron agrandadas. (D) las gráficas representan la media de la intensidad de fluorescencia del receptor sobre la membrana expresado como unidades arbitrarias (A.U.). * $p < 0.05$

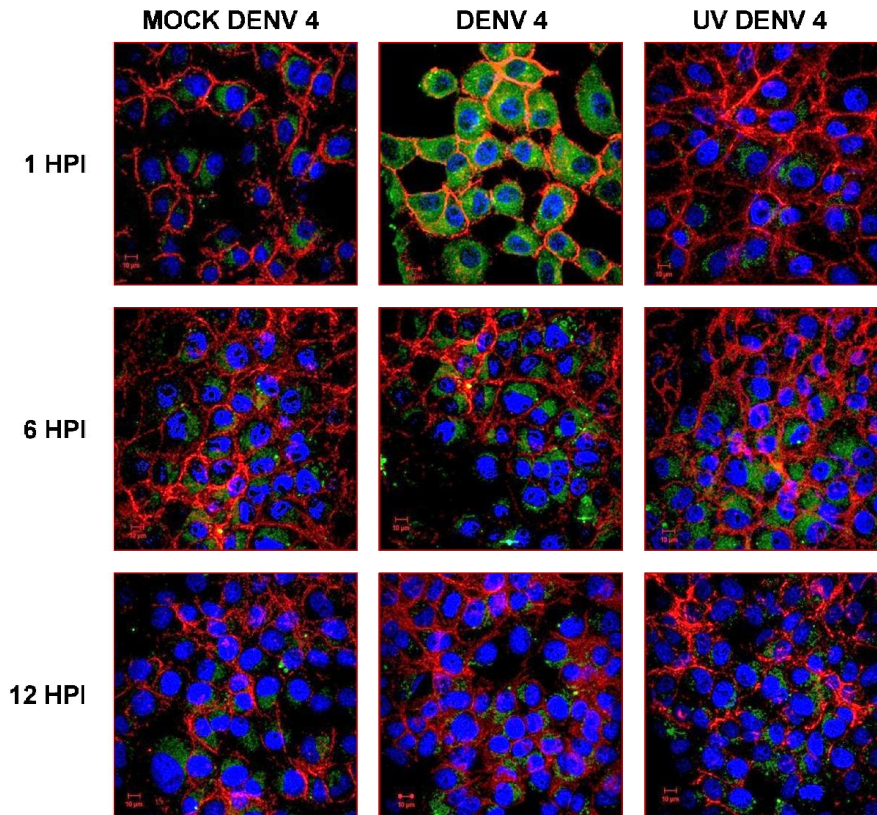
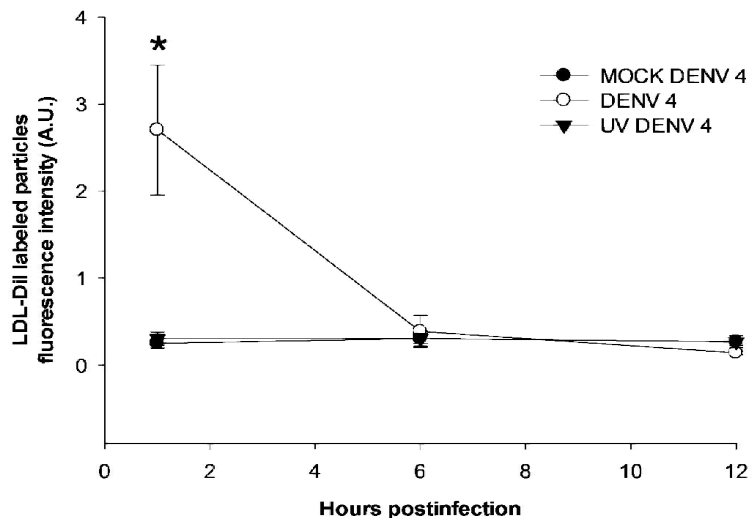
A**B**

Figura 11. Efecto de la infección por DENV4 en la captación de partículas LDL en la línea celular Huh7. (A) Las células infectadas se incubaron con partículas LDL marcadas con Dil (verde) a 1, 6 y 12 hpi. La actina (rojo) y los núcleos (azul) se tiñeron con faloidina-alexa 647 y DAPI respectivamente. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. **(B)** las gráficas representan la media de la intensidad de fluorescencia del LDL-Dil complejo y se indica como unidades arbitrarias (U.A.). * $p < 0.05$

Posteriormente, las células infectadas durante 1, 6 y 12 hrs con DENV, UV-DENV44 o células control (MOCK) se incubaron con partículas LDL marcadas con Dil y las partículas internalizadas fueron visualizadas por microscopía confocal (Figura 11). Un fuerte incremento en la señal de las partículas LDL-Dil se observó en el citoplasma (verde) de las células infectadas con DENV4 a 1 hpi, mientras que las 6 y 12 hpi los niveles de partículas LDL-Dil incorporadas por las células infectadas fue similar a las partículas incorporadas en las células control no infectadas. Interesantemente, al igual que como ocurrió con el LDLR el nivel de captación de partículas LDL en las células infectadas con UV-DENV44 no presentó cambio alguno a ninguno de los tiempos de infección medidos. Estos resultados confirman que el incremento en la cantidad de LDLR sobre la superficie celular de las células infectadas tiene como consecuencia el incremento en la captación de partículas LDL y podrían explicar el incremento en la cantidad de colesterol intracelular observado en las células infectadas.

7.3. La infección con DENV disminuye la fosforilación de HMGCR e incrementa su actividad.

El segundo mecanismo usado por las células hepáticas para incrementar el contenido de colesterol es mediante un incremento en la expresión o actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de colesterol, principalmente la HMGCR. Debido a que se ha descrito que no hay ningún cambio en los niveles de expresión de la HMGCR a tiempos tempranos de infección con DENV (Pena and Harris, 2012), decidimos evaluar la actividad de esta enzima. Uno de los principales mecanismos que modulan la actividad de HMGCR es la fosforilación. Ha sido bien establecido que la forma fosforilada es menos activa que la forma desfosforilada (Friesen and Rodwell, 2004; Omkumar et al., 1994). Entonces, los niveles de la forma fosforilada y enzima total fueron analizados mediante ensayos de Western blot en lisados totales de células infectadas con DENV4, UV-DENV44, y células control a distintos tiempos post-infección (0.5, 1, 6, 9, 12 y 18 hpi) (Figura 12). Los análisis de ambas formas de la enzima nos permitieron observar una reducción de

más del 70% de la forma fosforilada de la enzima a 1 hpi en las células infectadas con DENV y UV-DENV4 comparada con las células no infectadas sugiriendo que la entrada viral o la unión del virus con su receptor indujeron un incremento en la actividad de la HMGCR. El nivel de fosforilación de la enzima regresó a niveles basales a las 6 hpi. De manera interesante, el nivel de fosforilación de la enzima en las células infectadas con DENV4, pero no en las células infectadas con UV-DENV4 se redujo de nuevo a las 9, 12 y 18 hpi, sugiriendo que algún evento post-entrada desencadena una nueva activación de la enzima y este efecto se mantiene constante hasta las 18 horas. Estos resultados indican que la actividad de la HMGCR incrementa durante la infección por DENV.

Considerando que la fosforilación de la enzima HMGCR se reduce durante la infección con DENV4 y que esto podría indicar un incremento de actividad de la enzima limitante en la síntesis del colesterol, el siguiente paso fue medir directamente la actividad de la HMGCR en células infectadas con DENV2 y DENV4 durante 24 hpi. La figura 13 muestra una gráfica representativa de tres experimentos independientes en donde se muestra la disminución de NADPH medida a longitud de onda de 340 nm. Si consideramos que la conversión del HMG-CoA a mevalonato, mediado por la HMGCR, consume moléculas de NADPH, entonces una mayor disminución de la concentración de NADPH indica un incremento en la actividad de la enzima. La curva que representa la condición del blanco o control negativo muestra la disminución basal de NADPH. Al analizar la concentración de NADPH del control positivo (HMGCR recombinante) se observó una disminución mucho mayor en la concentración de NADPH indicando la alta actividad de la enzima pura. Al analizar las curvas que corresponden a las células infectadas con DENV2 y DENV4 se observó una mayor reducción en la concentración de NADPH que en las células control (MOCK) indicando que durante la infección se presenta un incremento en la actividad de la HMGCR. Este incremento en la actividad de la enzima pudo apreciarse más claramente cuando la actividad de HMGCR se expresó en unidades/mgP. Así, encontramos que la enzima incrementó su actividad en más de 2 veces en las células infectadas con respecto a las no infectadas. Este hecho confirma que la infección de células Huh7

con DENV incrementa la actividad de la HMGCR. Los ensayos de Western Blot indican el testigo de infección, la presencia de la enzima y el control de carga.

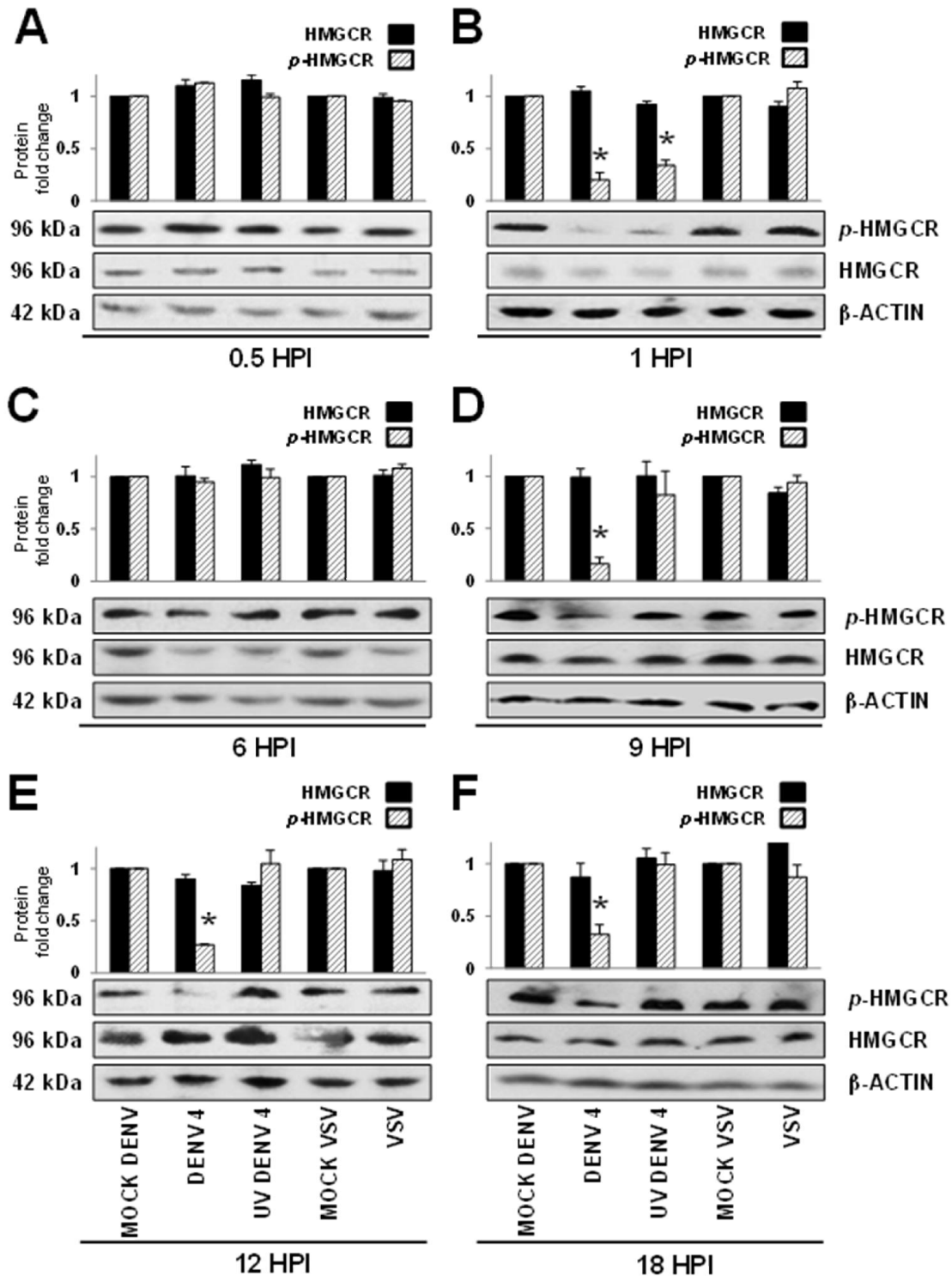


Figura 12. Efecto de la infección por DENV4 en los niveles de fosforilación de la HMGCR en las células Huh7. Las células fueron infectadas con las condiciones experimentales mencionadas, lisadas a las 0.5 (A), 1 (B), 6 (C), 9 (D), 12 (E) y 18 (F) hpi y analizadas por WB contra la HMGCR total y su forma fosforilada. Las gráficas representan la media de las veces de cambio de la enzima total y fosforilada obtenida por análisis densitométricos de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$

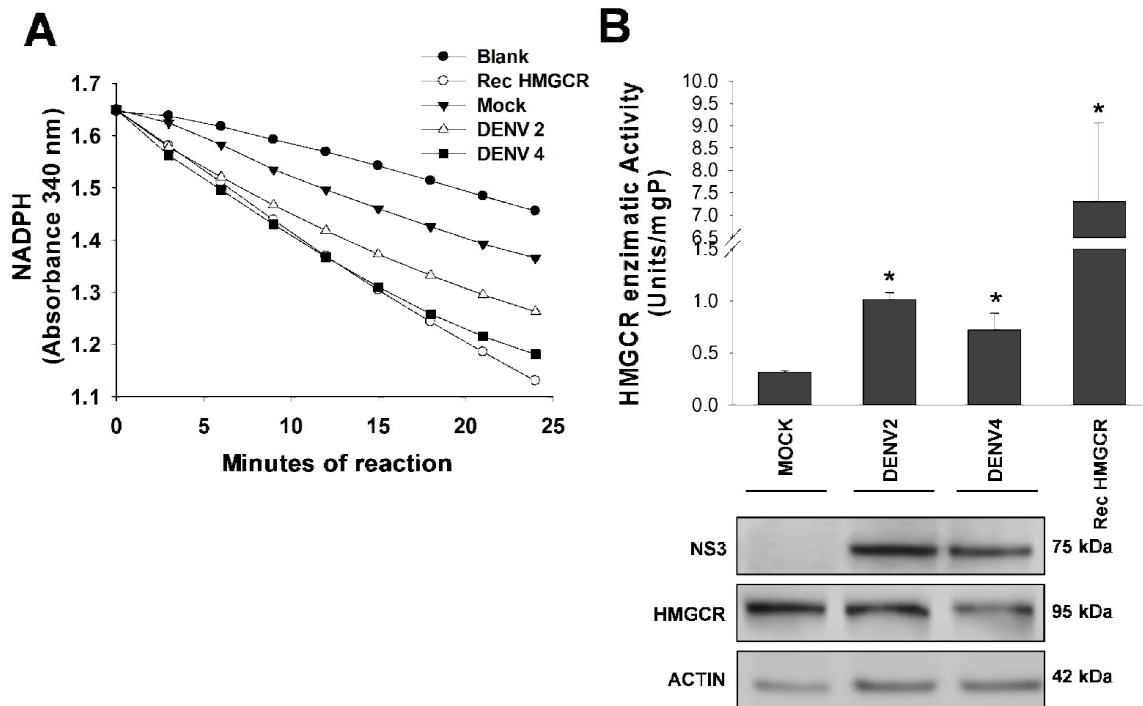


Figura 13. Actividad enzimática de HMGCR en respuesta a la infección con DENV. La actividad enzimática de la HMGCR se evaluó en lisados de células infectadas con DENV2, DENV4 y células Mock. La reacción enzimática se graficó cada 3 minutos durante 24 minutos (A) y la actividad se expresó como unidades por miligramo de proteína (Units/mgP) (B). Los WB indican el testigo de infección (NS3), la presencia de la HMGCR y el control de carga.

7.4. El incremento en la actividad de la HMGCR es mediado por la modulación de la actividad de la AMPK en las células infectadas y no por cambios en actividad de PP2A.

Está ampliamente descrito que la regulación de la fosforilación de la HMGCR está mediada principalmente por la cinasa AMPK (AMP-activated protein kinase) y la fosfatasa PP2A (protein phosphatase-2) (Wu et al., 2011). Considerando que en las células infectadas se demostró un incremento en la actividad de HMGCR, observado como una fosforilación disminuida, que podría explicarse debido a que,

durante infección, hubiera una reducción en la actividad de kinasa de la AMPK o bien un aumento en la actividad de fosfatasa de la PP2A. Para poder evaluar ambos escenarios, decidimos realizar un tratamiento con metformina, que al ser un activador de AMPK, fosforilaría a la HMGCR y esto reduciría su actividad y muy probablemente la infección por DENV4 debido a que bajo esas condiciones la producción de colesterol se vería disminuida. Por el contrario, si la infección por DENV4 induce un incremento en la actividad de PP2A, el cual explique el incremento en la síntesis de colesterol, entonces el tratamiento con Ácido Okadaico que es un inhibidor de PP2A, mantendría una alta fosforilación de la HMGCR y por tanto, baja síntesis de colesterol y reducción de la infección viral.

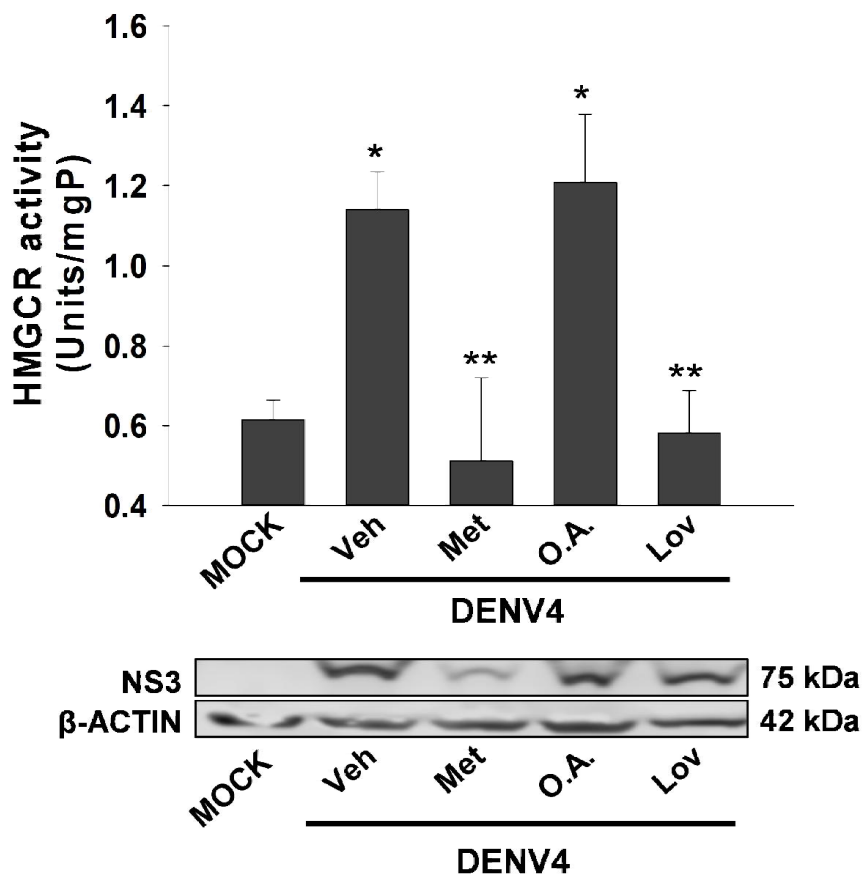


Figura 14. Actividad enzimática de la HMGCR de células Huh7 infectadas con DENV4 en respuesta a la activación de AMPK, inhibición de PP2A y la inhibición de la HMGCR. Células Huh7 infectadas con DENV4 fueron tratadas con metformina (Activador de AMPK, 10mM), Ácido Okadaico (inhibidor de PP2A, 10 nM) y Lovastatina (inhibidor de HMGCR, 50 μ M), a las 24 horas de tratamiento, los lisados celulares se sometieron a ensayos de actividad enzimática expresada como unidades por miligramo de proteína (Units/mgP). Los WB muestran el testigo de infección y el control de carga.

7.5. La infección con DENV2 y DENV4 no modula la actividad de PP2A pero su inhibición promueve un efecto antiviral.

Con el fin de corroborar que el incremento en la actividad de HMGCR no está mediado por un incremento en la activación de PP2A se evaluó la actividad de fosfatasa en células Huh7 infectadas con DENV2 y DENV4 a 1, 12 y 24 hpi (Figura 15). El resultado muestra que la infección no produjo ningún cambio en las células infectadas en comparación con las células no infectadas. Para confirmar este resultado y comprobar el funcionamiento del sistema se utilizó el tratamiento con Ácido Okadaico tanto en células no infectadas como en células infectadas con DENV2 y DENV4 por 24 horas. En células sin tratar, no se observó ningún efecto en las células infectadas en comparación con las no infectadas (entre 1300 y 1400 picomoles de fosfato), corroborando los resultados anteriores. Bajo tratamiento con ácido okadaico, se observó la inhibición de la actividad de PP2A tanto en células infectadas como no infectadas (hasta 1000 picomoles de fosfato) y no hubo una diferencia significativa entre ellas, indicando que la infección por DENV no modula la actividad de PP2A y por ende, el incremento en la actividad de HMGCR en las células infectadas no es mediante la regulación de esta fosfatasa. Interesantemente, al analizar por western-blot los extractos usados en el ensayo, pudimos confirmar que el tratamiento con ácido okadaico inducía una reducción en la cantidad de proteína viral en comparación con las células infectadas sin tratamiento con el inhibidor.

Con el fin de confirmar que el ácido okadaico estaba induciendo un efecto antiviral decidimos analizar el efecto de este fármaco en la producción de progenie viral, secreción de NS1 y cantidad de genoma viral en células infectadas con DENV2 y DENV4 durante 24 horas. Los resultados demuestran que la progenie viral y la cantidad de genoma viral se redujo al menos medio logaritmo mientras que se observó una reducción de un 40% de secreción de NS1 en las células infectadas con ambos serotipos y tratadas con 10 nM de ácido okadaico en comparación con las células control. Estos datos confirman el efecto antiviral de ácido okadaico que podría ser mediado por la inhibición de PP2A pero por un mecanismo independiente a la actividad de HMGCR.

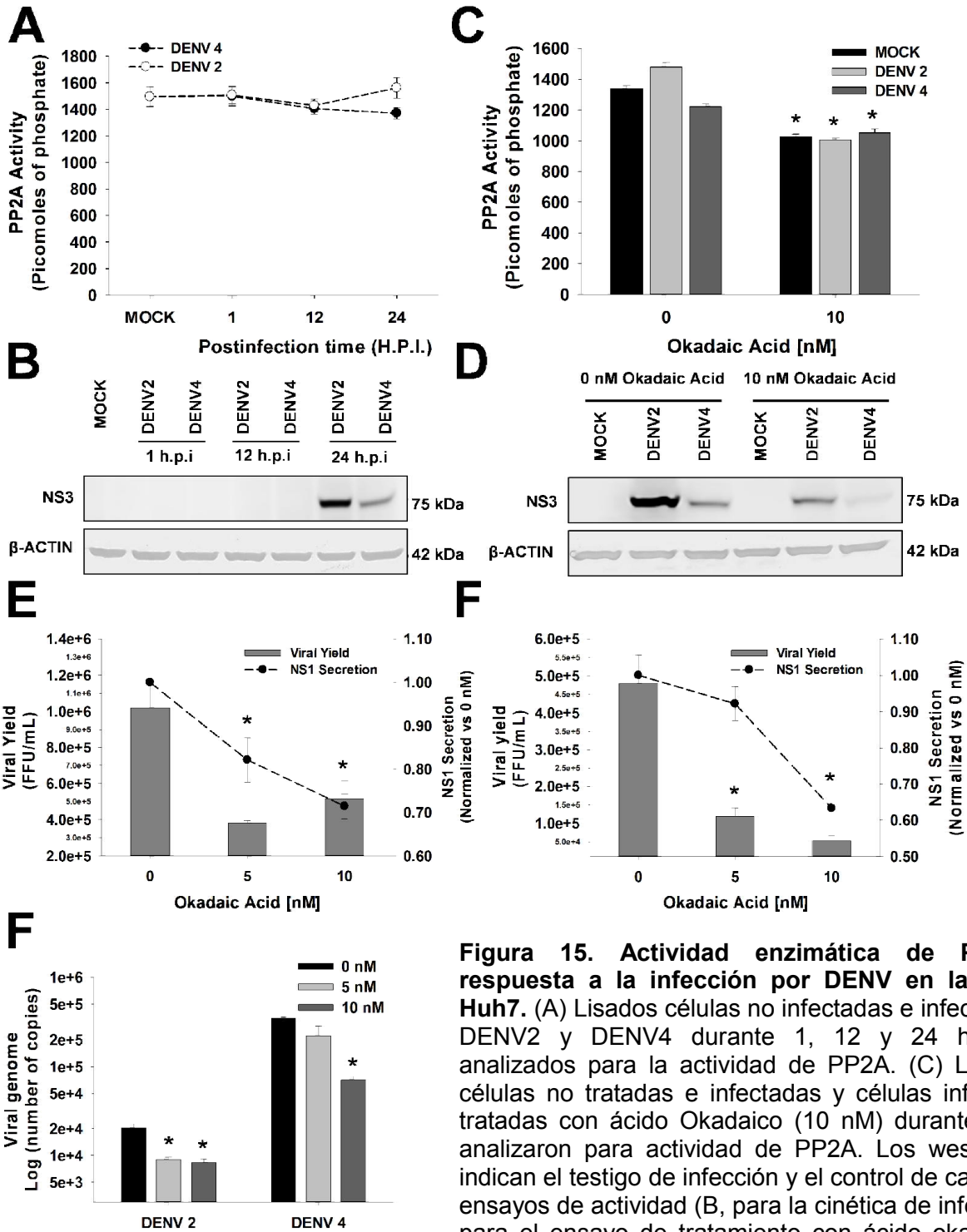


Figura 15. Actividad enzimática de PP2A en respuesta a la infección por DENV en las células Huh7. (A) Lisados de células no infectadas e infectadas con DENV2 y DENV4 durante 1, 12 y 24 hpi fueron analizados para la actividad de PP2A. (C) Lisados de células no tratadas e infectadas y células infectadas y tratadas con ácido Okadaico (10 nM) durante 24 h se analizaron para actividad de PP2A. Los western blots indican el testigo de infección y el control de carga de los ensayos de actividad (B, para la cinética de infección y D para el ensayo de tratamiento con ácido okadaico). El efecto antiviral de ácido okadaico se evaluó por carga viral y secreción de NS1 en sobrenadantes de células infectadas y tratadas con DENV 2 (E) y DENV 4 (F). Adicionalmente se midió la reducción del genoma viral en células infectadas y tratadas con ácido Okadaico.

7.6. DENV2 y DENV4 inducen la inactivación de AMPK mediante defosforilación y su activación tiene un fuerte efecto antiviral contra la infección en la línea celular Huh7.

Considerando que la metformina, activador de AMPK, inducía una reducción muy importante de la actividad de la HMGCR en las células infectadas, decidimos analizar la actividad de AMPK, debida a su defosforilación, durante la infección con DENV. Para ello, se midió la actividad de la AMPK en células infectadas con DENV2 y DENV4 a distintos tiempos post-infección (1, 12 y 24 hpi) (Figura 16). Los resultados muestran un decremento en la fosforilación de la AMPK desde 1 hpi, siendo ésta significativa a las 12 y 24 hpi en donde se observa una reducción aproximada del 50% de actividad con respecto a las células no infectadas. Con el fin de corroborar este resultado, células no infectadas e infectadas con DENV2 y DENV4 fueron tratadas con compuesto c (CC), una molécula inhibidora de la actividad de AMPK y con el activador de AMPK (metformina, Met). Como era de esperarse, en las células no infectadas, el tratamiento con compuesto C redujo la fosforilación de AMPK en un 50% y el tratamiento con metformina incrementó aproximadamente 5 veces el valor de las células no tratadas. Por su parte, en las células infectadas con ambos serotipos se observó que la fosforilación de AMPK se redujo aproximadamente la mitad. Interesantemente, el tratamiento con compuesto C fue incapaz de inhibir aún más esta actividad. En contraste, el tratamiento con metformina de las células infectadas revirtió de manera significativa la reducción en la actividad de AMPK promovida por la infección con DENV2 y DEN4. Sin embargo, es de destacar que a pesar de que metformina aumentó la actividad enzimática de la AMPK, ésta no alcanzó los niveles de fosforilación provocados por metformina en las células sin infectar (poco menos de 1 vez el valor de las células no infectadas y no tratadas). Este hecho confirma que la infección por DENV ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad de AMPK, que no puede ser inhibida aún más por compuesto C. Además nos permite suponer que esta inhibición en la actividad está íntimamente ligada al incremento en la actividad de la HMGCR en las células Huh7 infectadas (Figura 16B).

Al analizar por western-blot los extractos usados en los ensayos de actividad, pudimos observar que el tratamiento con metformina no solo inhibe la actividad de AMPK sino que también reduce de manera dramática la cantidad de proteína viral presente en los extractos, sugiriendo que metformina además de inhibir la actividad de la HMGCR, tiene un potente efecto antiviral (Figura 16C y 16D). Dicha propiedad anti-DENV se evaluó mediante la medición de producción de progenie viral, niveles de secreción de NS1 y cantidad de genoma viral en las células infectadas y tratadas con 10 mM de metformina durante 24 horas (Figura 16E y 16F). Los resultados muestran que metformina induce una reducción de más de un logaritmo en la producción de progenie y cantidad de genoma viral y una reducción de más del 90% en la secreción de NS1 en las células infectadas con ambos serotipos. Este hecho confirma el efecto anti-viral de metformina. En conjunto, estos resultados sugieren que AMPK participa de manera importante en el proceso de replicación del DENV convirtiéndolo en un nuevo blanco terapéutico.

7.7. La HMGCR está localizada en los complejos replicativos y su actividad es importante para la formación de dichas estructuras.

Nuestros resultados indican que los niveles de colesterol de células infectadas no aumentan en tiempos posteriores a las 12 hpi, sin embargo, los ensayos de actividad claramente indican que existe un incremento en la actividad de la HMGCR mediada por un decremento en la actividad de AMPK. Por tanto, es posible suponer que las células infectadas tengan colesterol aumentado después de las 12 hrs, pero muy probablemente compartimentalizado y por ello no puede ser medido en el colesterol total. Si este es el caso, la pregunta lógica es ¿cuál podría ser el destino del colesterol recién sintetizado?

Se ha descrito que la mayoría de los virus de RNA de cadena positiva, entre ellos DENV, promueven un intenso arreglo membranoso en el RE con el fin de reclutar la maquinaria necesaria para la replicación y el ensamblaje viral. Se ha descrito también, que dicho cambio estructural en la membrana del RE es debida

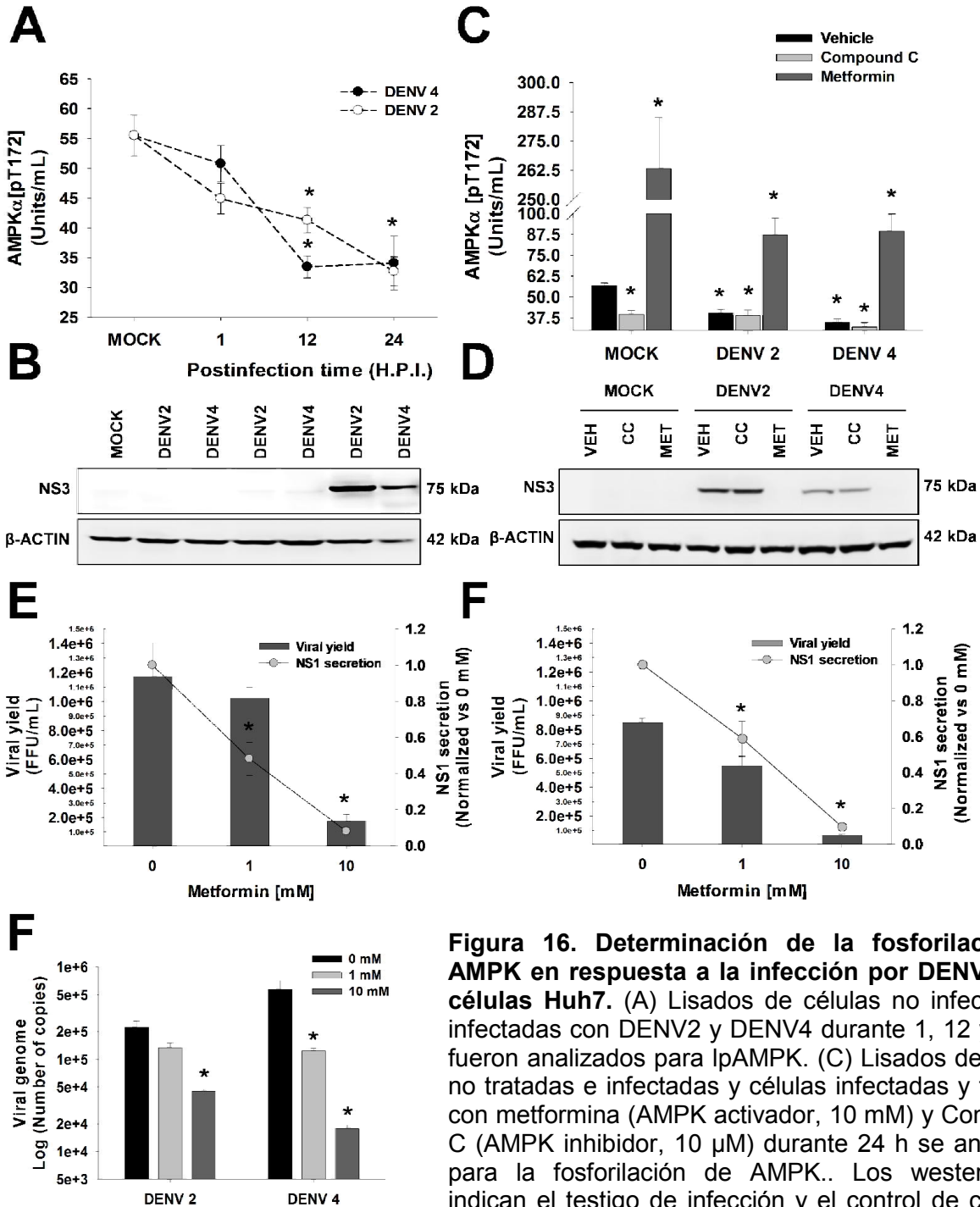


Figura 16. Determinación de la fosforilación de AMPK en respuesta a la infección por DENV en las células Huh7. (A) Lisados de células no infectadas e infectadas con DENV2 y DENV4 durante 1, 12 y 24 hpi fueron analizados para IpAMPK. (C) Lisados de células no tratadas e infectadas y células infectadas y tratadas con metformina (AMPK activador, 10 mM) y Compuesto C (AMPK inhibidor, 10 μ M) durante 24 h se analizaron para la fosforilación de AMPK. Los western blots indican el testigo de infección y el control de carga de los ensayos de actividad (B, para la cinética de infección y D para el ensayo de tratamiento con Met y CC). El efecto antiviral de Metformina se evaluó por carga viral y secreción de NS1 en sobrenadantes de células infectadas y tratadas con DENV 2 (E) y DENV 4 (F). Adicionalmente se midió la reducción del genoma viral en células infectadas y tratadas con Metformina.

a un cambio en el contenido lipídico, tanto celular como en RE, donde los lípidos que están enriquecidos son lípidos capaces de alterar la membrana del RE funcional y estructuralmente. El reclutamiento hacia los complejos replicativos y el incremento de actividad de enzimas que participan en la síntesis lipídicas también ha sido reportada, particularmente se ha descrito que la infección por DENV tiene este efecto sobre la sintasa de ácidos grasos (FASN) (Heaton et al., 2010; Perera et al., 2012). Por tal motivo, no sería extraño pensar que el incremento en la síntesis de ácidos grasos, durante la formación de los complejos replicativos, estaría coordinado con la síntesis de colesterol mediada por la HMGCR.

Para evaluar esta posibilidad se analizó la distribución de la HMGCR en células infectadas mediante un doble inmuno-marcaje por microscopía confocal (Figura 17A) y microscopía electrónica de transmisión (Figura 17B). Los resultados obtenidos por ambas metodologías muestran que el patrón de distribución de la HMGCR coincide con el patrón de distribución de la proteína viral NS4A, la cual es una proteína necesaria para inducir la formación del complejo replicativo y presente en los complejos replicativos (Teo and Chu, 2014), sugiriendo que la HMGCR forma parte del complejo replicativo.

Con la finalidad de corroborar que la actividad enzimática de la HMGCR es importante para mantener la integridad del complejo replicativo, las células fueron infectadas y tratadas con un inhibidor directo de la función enzimática (Lov), y con el inhibidor indirecto de la HMGCR (metformina, met) para posteriormente analizar la localización de la HMGCR y la integridad de los complejos replicativos (Figura 18). En las células infectadas y sin tratar, fue evidente la colocalización de la HMGCR con la proteína viral NS4A (coeficiente de colocalización de 0.32) (Figura 18A) y con NS3 (0.22) (Figura 18B) y la integridad del complejo replicativo, medida mediante la colocalización de las dos proteínas virales NS4A y la proteína E (0.38) (Figura 18A) y de NS3 y E (0.47) (Figura 18B). Cuando las células infectadas fueron tratadas con el inhibidor indirecto de la actividad de HMGCR (Met) se observó una reducción de la cantidad de enzima en la célula. Este inhibidor de la síntesis de HMGCR ya ha sido descrito para metformina; adicionalmente, se observó reducción en la colocalización de la enzima con las proteínas virales

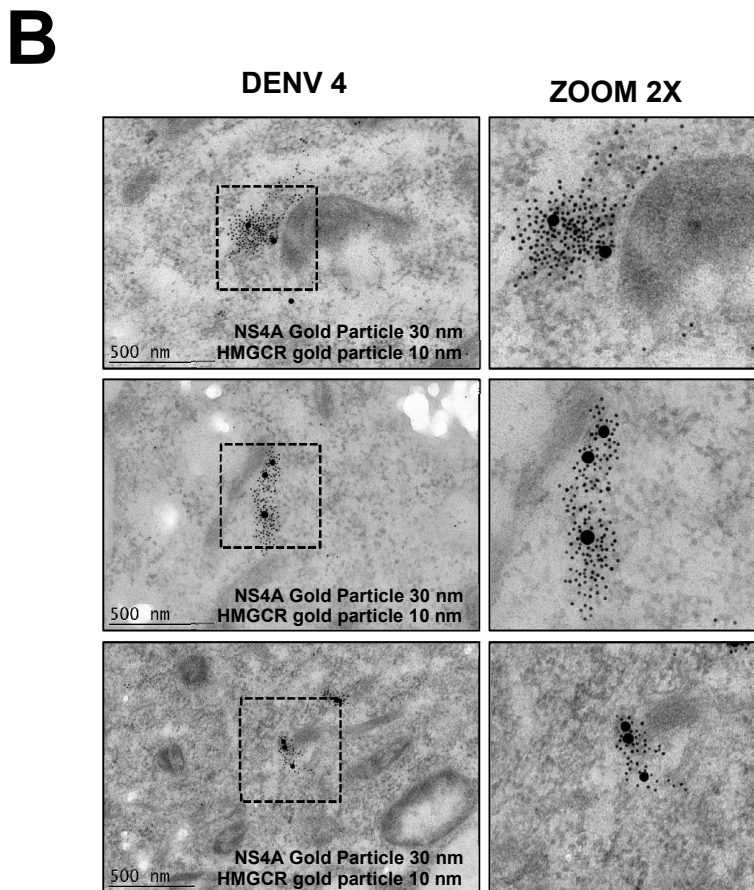
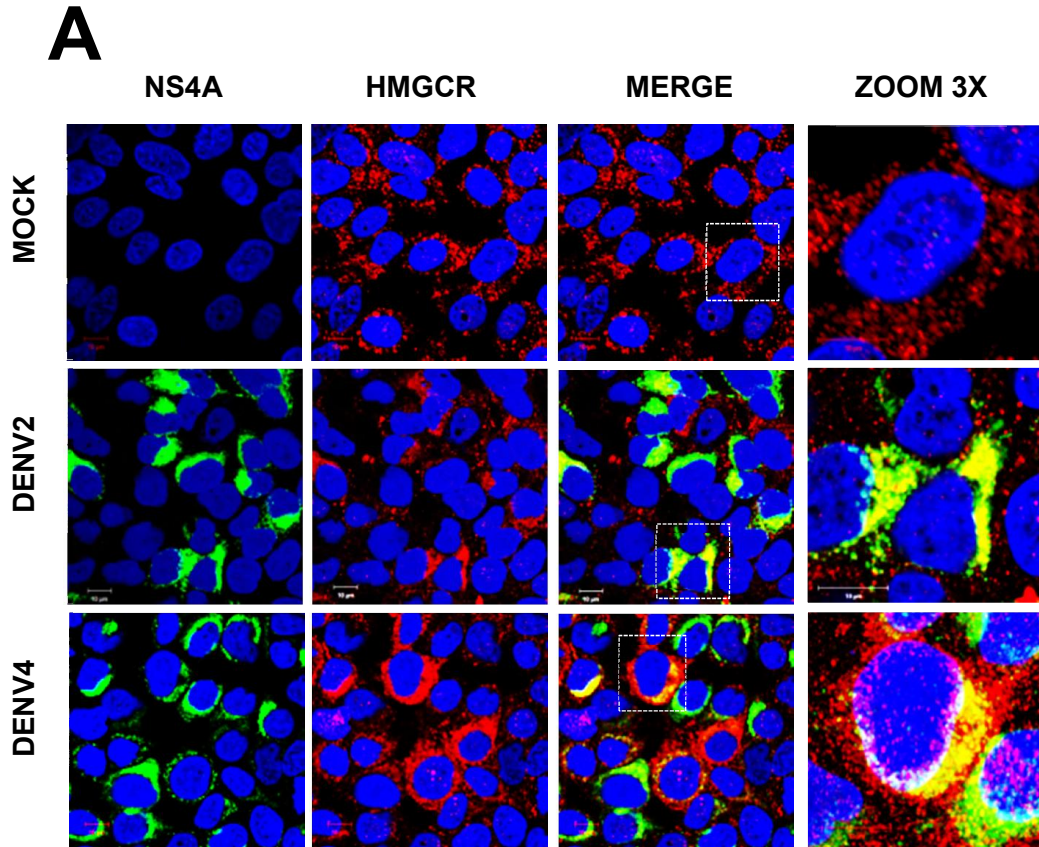


Figura 17. Presencia de HMGCR en los complejos replicativos formados durante la infección por DENV. La distribución de la HMGCR (rojo) y la proteína viral (verde) se evaluó por microscopía confocal en células infectadas con DENV2 y 4 (A). Adicionalmente, la presencia de la HMGCR en los complejos replicativos se evaluó por microscopía electrónica de transmisión en células infectadas con DENV4 (B).

NS4A y con NS3 lo que indica la ausencia de HMGCR en el complejo replicativo (HMGCR/NS4A, 0.03, HMGCR/NS3 0.02). Curiosamente, la ausencia de HMGCR y de actividad enzimática reduce de manera drástica la integridad del complejo replicativo ya que hay una reducción en el coeficiente de colocalización entre las dos proteínas virales NS4A/E (0.02) y entre NS3/E (0.01).

Sin embargo, el tratamiento con lovastatina a pesar de que tiene el mismo efecto inhibitorio en la actividad enzimática de la HMGCR que la metformina, indujo una alta producción de enzima. Esto por el hecho de que al reducir la actividad enzimática, la célula censa que requiere colesterol e induce la síntesis de más RNAm y más proteína. A pesar de ello, hay una reducción de la colocalización entre HMGCR y NS4A de 0.32 a 0.06 y entre HMGCR y NS3 de 0.22 a 0.15 cuando se compara con las células no tratadas (Figura 18A y B). Este hecho indica que a pesar de existir un incremento en la cantidad de enzima, al ser inactiva, pierde su localización en los complejos replicativos y la estructura de este complejo se ve alterada ya que la colocalización entre NS4A y E se redujo de 0.38 a 0.11 y la colocalización entre NS3 y E se redujo de 0.47 a 0.1 cuando se compara con células no tratadas (Figura 18A y B). Con todos estos datos, es posible decir que la presencia de la HMGCR y su actividad es necesaria para la formación de los complejos replicativos.

Una vez que sabíamos que la HMGCR activa era parte de los complejos replicativos, decidimos evaluar si su localización es capaz de promover un enriquecimiento de colesterol en los complejos replicativos. Para ello, las células fueron teñidas con Filipina III complex y se analizó la colocalización entre NS4A y colesterol mediante microscopía confocal (Figura 19). En las células infectadas con DENV4 en ausencia de tratamiento se observa una acumulación de la señal que corresponde a colesterol en las zonas donde se encuentra la proteína NS4A, sugiriendo un incremento en la cantidad de colesterol en complejos replicativos que correlaciona con el incremento de actividad y la presencia de la HMGCR. Cuando las células infectadas fueron tratadas con inhibidores directos (Lov) e indirectos (Met) la cantidad de colesterol se redujo y el patrón de distribución y la

cantidad de NS4A se altera, sugiriendo que el colesterol forma parte estructural del complejo replicativo.

En conjunto, estos resultados indican que DENV es capaz de promover la presencia de la enzima limitante de la síntesis de colesterol en los complejos replicativos e incrementar su actividad para mantener la estructura de estos complejos mediante la inactivación de AMPK, el principal regulador metabólico que modula entre otras vías, el metabolismo de ácidos grasos, síntesis de triglicéridos y metabolismo de glucosa sugiriendo que AMPK puede ser un nuevo blanco terapéutico contra la infección por DENV.

7.8. El Ácido Nordihidroguaiarético (NDGA) inhibe la infección por DENV reduciendo la replicación y ensamblaje viral.

El **Ácido Nordihidroguaiarético (NDGA)** es el principal componente obtenido de la planta conocida como chaparral, cuya distribución es muy abundante en las zonas desérticas del norte de México y el sur de Estados Unidos. Este ácido araquidónico es inhibidor de la 5-lipoxigenasa, tiene propiedades antioxidantes y propiedades hipolipidémicas. NDGA inhibe la expresión de genes involucrados en la síntesis de colesterol, triglicéridos y aumenta el catabolismo de ácidos grasos promoviendo un fuerte efecto hipolipidémico (Arteaga et al., 2005). Este último es mediado a través de un incremento en la actividad de AMPK al igual que el efecto producido por metformina (Zhang et al., 2013). Con el fin de corroborar la importancia de AMPK en la infección por DENV se evaluó el efecto antiviral del NDGA y se describió el proceso viral afectado por el tratamiento.

El primer paso, fue analizar el efecto hipolipidémico del NDGA determinando la cantidad de colesterol total en las células Huh7 tratadas con 35, 50 y 100 μM de NDGA durante 24 horas (Figura 20). El tratamiento con NDGA promovió la reducción en los niveles de colesterol intracelular a partir de la concentración de 35 μM sin alterar la viabilidad celular (Figura 20 A y B). Para conocer el efecto de la reducción de colesterol inducida por el NDGA en la infección por DENV, se

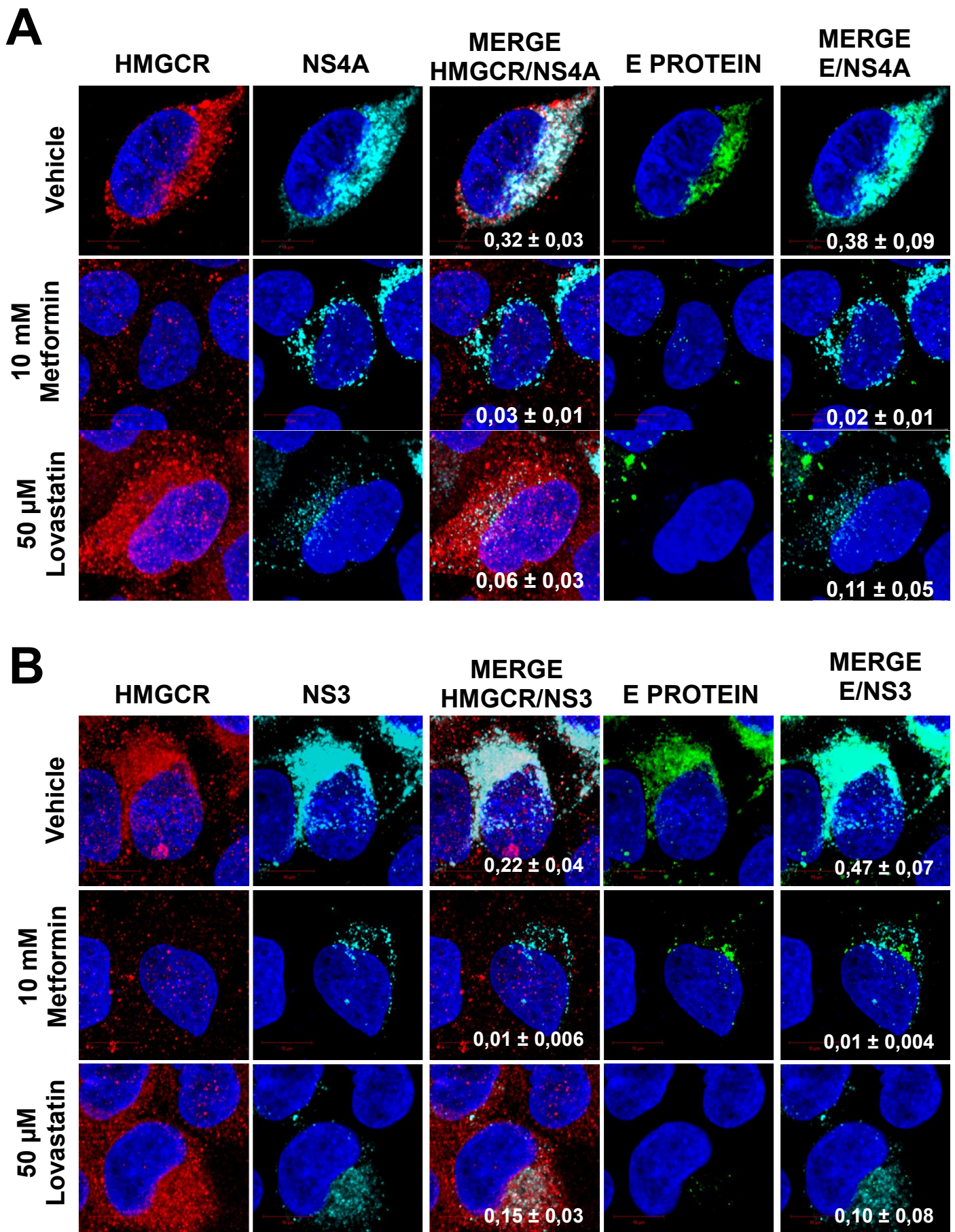


Figura 18. Distribución de proteínas virales y HMGCR en respuesta a inhibidores de la actividad de HMGCR. (A) Células Huh7 infectadas fueron tratadas con metformina y Lovastatin y la distribución y colocalización de las proteínas virales (E, NS4A) fue analizada por microscopía confocal. (B) El mismo sistema fue empleado pero realizando la tinción de la proteína NS3.

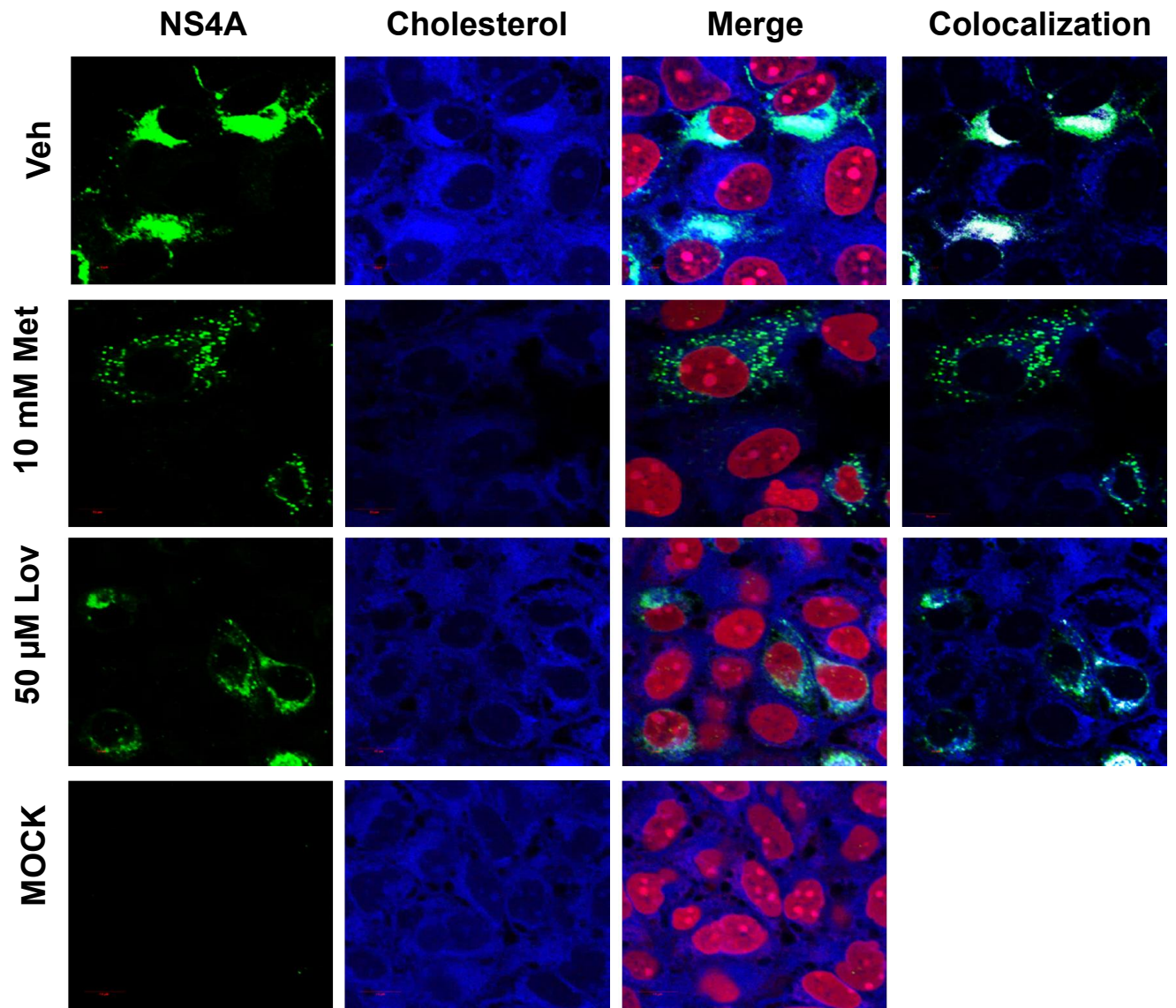


Figura 19. Distribución de colesterol en las células infectadas con DENV4 en respuesta a la inhibición de la HMGCR. La distribución y colocalización del colesterol con la proteína viral NS4A en las células infectadas y tratadas con Met y Lov se analizó mediante microscopía confocal.

midió la producción de progenie viral y de proteína NS1 en el sobrenadante de las células infectadas. Se observó una reducción dependiente de la concentración en ambos parámetros cuando las células infectadas con DENV4 se trataron durante 24 y 48 horas (Figura 20 C y D), sugiriendo un efecto antiviral mediado por el tratamiento con NDGA.

Con la finalidad de dilucidar si el NDGA disminuye la replicación del genoma viral, utilizamos un sistema que involucra a células Vero establemente transfectadas con un replicón de DENV que codifica para la luciferasa como gen reportero. Este replicón es capaz de replicarse porque codifica las 7 proteínas no estructurales necesarias para el procesamiento del genoma, pero en lugar de codificar para las tres proteínas estructurales, contiene el gen de luciferasa de tal manera que al medir la señal de luciferasa da indicios de la replicación del genoma viral. Estas células fueron tratadas con NDGA durante 24 y 48 horas con las concentraciones anteriormente mencionadas. Como puede observarse en la figura 21B se observó una reducción en la señal de luciferasa dependiente de la concentración de NDGA en ambos tiempos de tratamiento sin ningún efecto sobre la viabilidad celular (Figura 21A y B). Estos resultados sugieren que el efecto hipolipídico de NDGA es capaz de reducir la replicación del genoma viral. Con el fin de corroborar este resultado, células Huh7 infectadas con DENV2 y DENV4 fueron tratadas con 50 y 100 μ M de NDGA durante 24 y 48 horas y la cantidad de proteína viral NS3 y genoma viral fueron medidos por ensayos de western Blot y RT-PCR cuantitativa respectivamente. Los resultados muestran una reducción significativa en la expresión de NS3 (Figura 21C) y en la cantidad de RNA viral (Figura 21D) después del tratamiento, en comparación con células no tratadas. Estos resultados indican que al menos parte del efecto antiviral del NDGA es a través de una reducción de la traducción/replicación del genoma viral.

Como se ha descrito anteriormente, la replicación de DENV se lleva a cabo en los complejos replicativos y los fármacos que inhiben la síntesis lipídica alteran estas estructuras (Heaton et al., 2010; Welsch et al., 2009), entonces se podría pensar que la inhibición de la replicación viral inducida por el tratamiento con NDGA podría ser a través de la alteración de la estructura del complejo replicativo. Por tal motivo, la integridad del complejo replicativo se midió durante el tratamiento con NDGA como anteriormente se describió, esto es, a través de la colocalización entre NS3/E (Anwar et al., 2011)(Figura 22). Los resultados muestran una distribución perinuclear de ambas proteínas virales (coeficiente de colocalización 0.8) en las células infectadas sin tratamiento; sin embargo, el tratamiento con

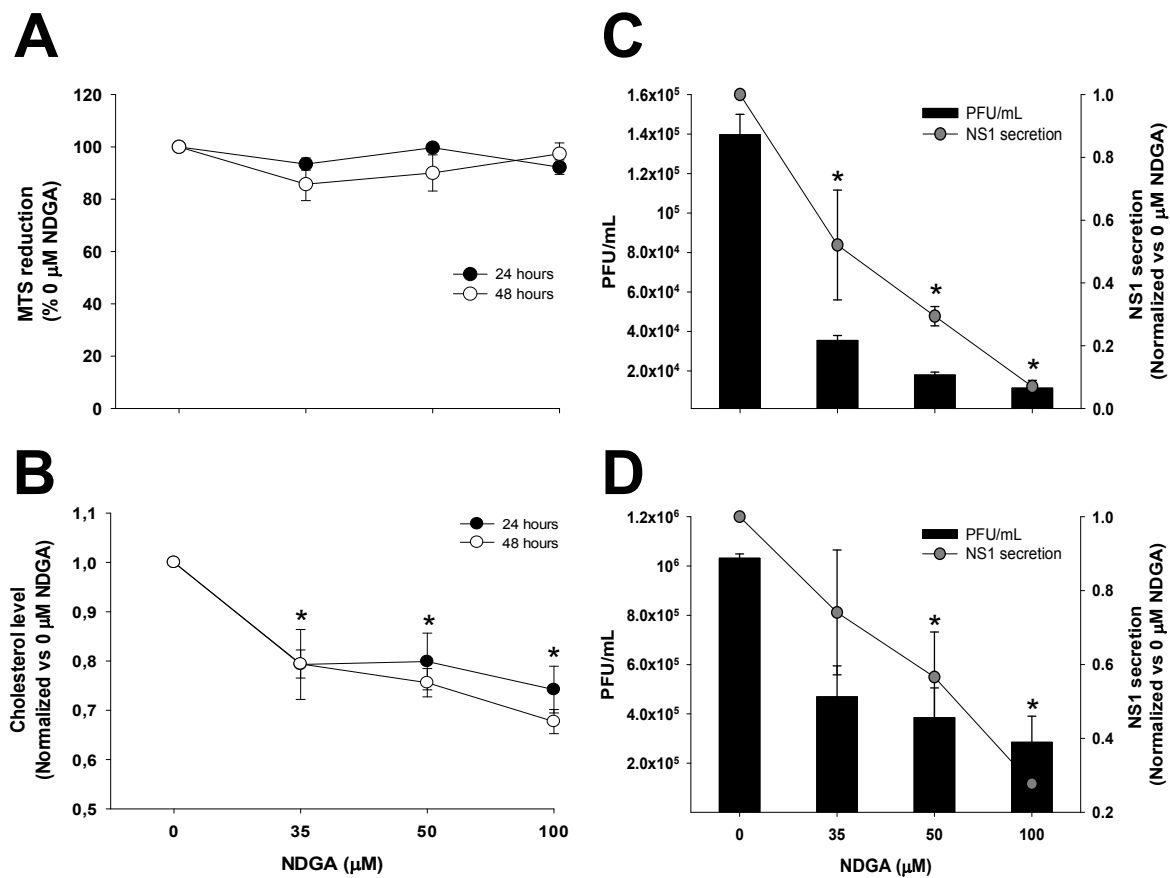


Figura 20. Validación del tratamiento con NDGA y su efecto en la carga viral y la secreción de NS1 en células infectadas y tratadas. Las células tratadas con NDGA se sometieron a análisis de viabilidad mediante reducción de MTS (A) y cuantificación de colesterol total por ensayos colorimétricos (B) durante 24 y 48 horas de tratamiento. Sobrenadantes de células Huh7 infectadas con DENV4 y tratadas con NDGA durante 24 (C) o 48 (D) horas se analizaron para carga viral (barras negras) por ensayos de plaqueo y secreción de NS1 por ensayos de ELISA. La viabilidad celular, niveles de colesterol y secreción de NS1 son expresados como la media normalizada de la absorbancia. La carga viral se expresa como la media de PFU/mL de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$

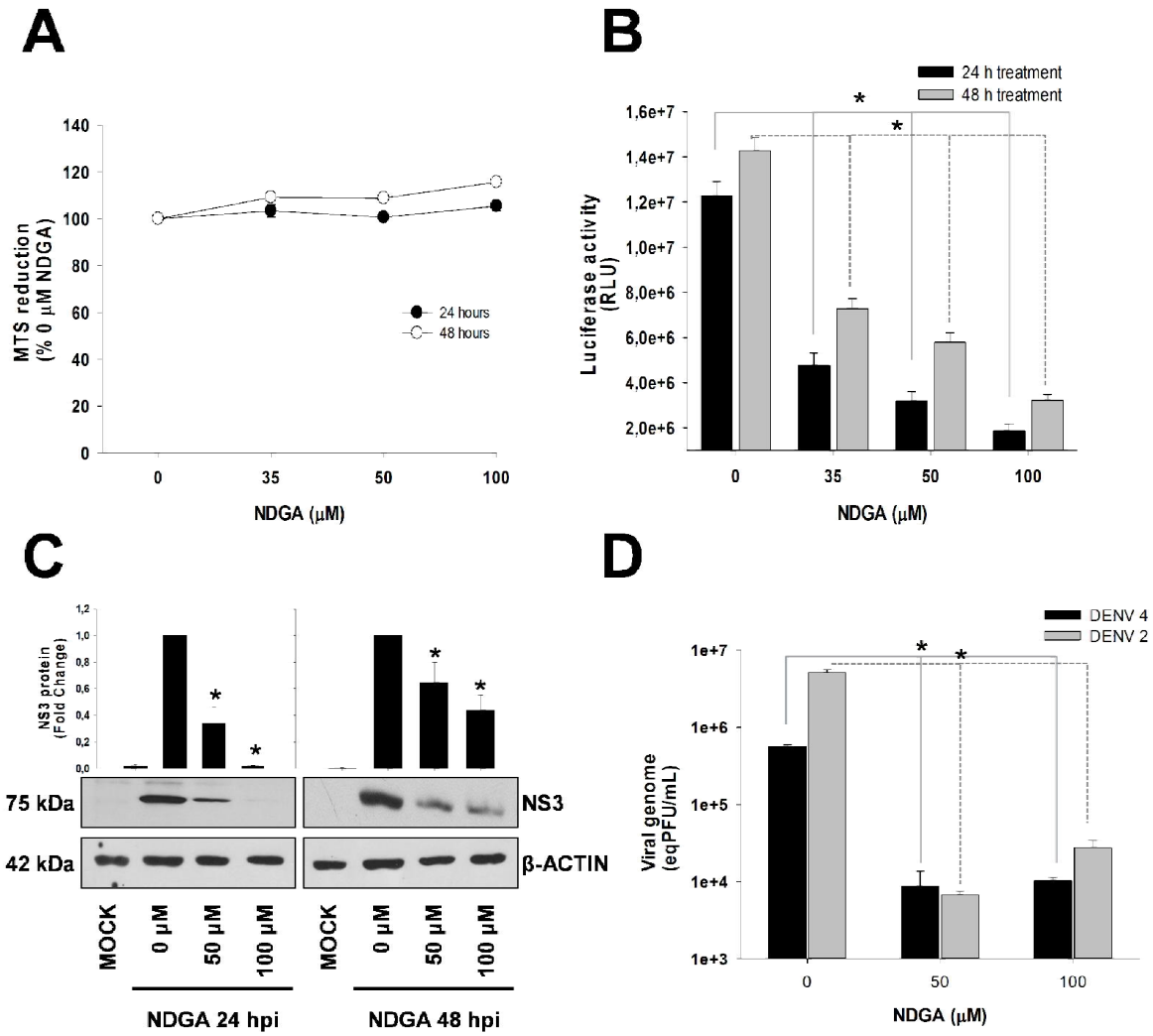


Figura 21. Efecto del NDGA sobre la replicación del genoma viral. Células Vero que expresan un replicón de DENV4 que codifica un gen de luciferasa se trataron con NDGA durante 24 y 48 horas y se analizó la viabilidad celular por reducción de MTS (A) y la actividad de luciferasa (B). La viabilidad celular se expresa como la media normalizada de la absorbancia. La actividad de luciferasa se expresa como la media de unidades relativas de luciferasa (RLU) de tres experimentos independientes. Adicionalmente, en células Huh7 infectadas y tratadas con NDGA se analizaron la cantidad de proteína viral NS3 (C) (expresada como veces de cambio) y el genoma viral (D) (expresado como eqPFU/mL) ensayados por Western blot (24 y 48 h de tratamiento) y qRT-PCR (24 h de tratamiento), respectivamente. * $p < 0.05$

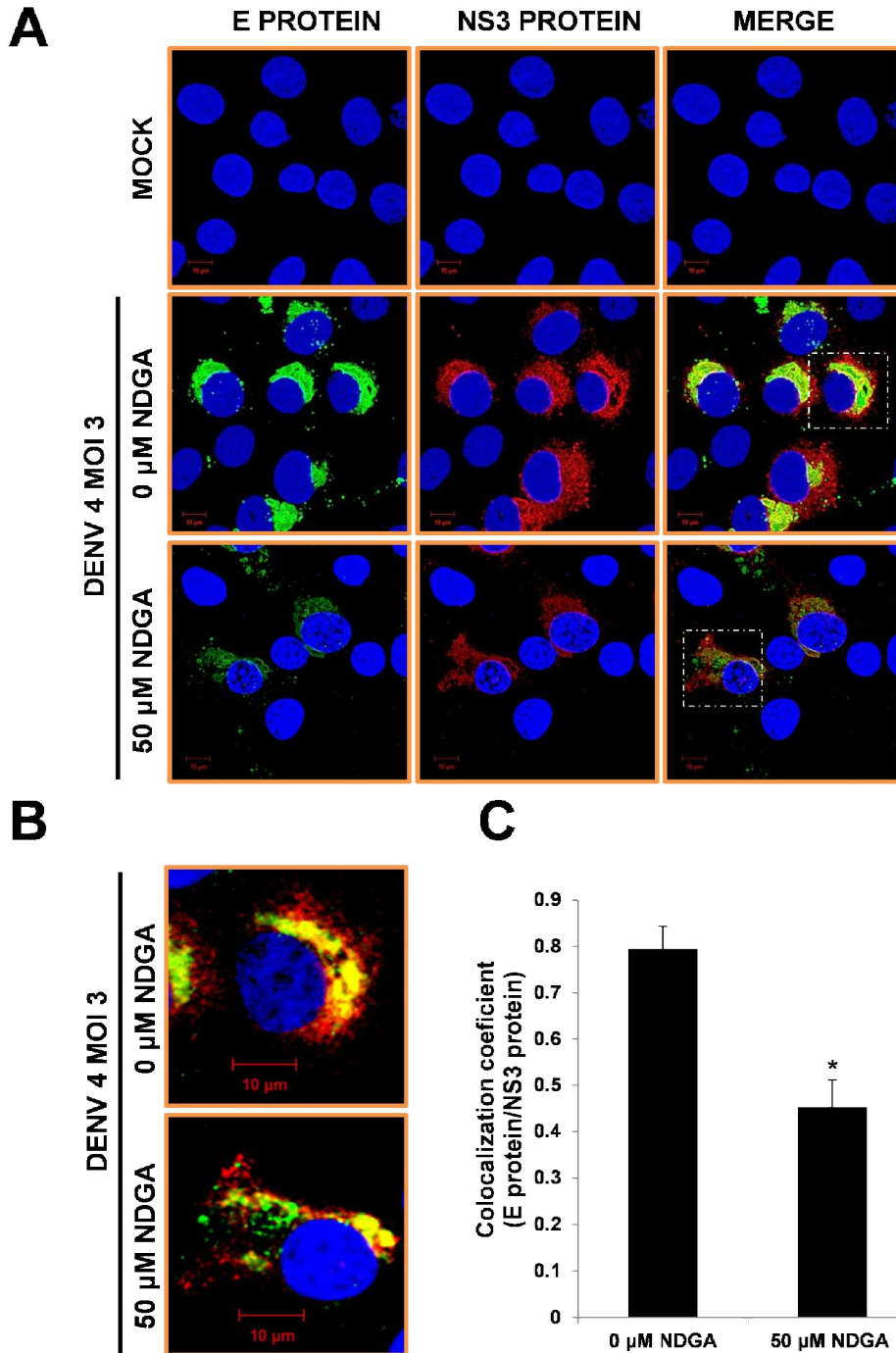


Figura 22. Efecto del NDGA sobre los patrones de distribución de proteínas virales. Células Huh7 infectadas y tratadas con NDGA por 24 h se fijaron y tiñeron para las proteínas virales E (verde) y NS3 (rojo). (A) La distribución de las proteínas virales se analizó por microscopía confocal, (B) el área seleccionada se amplificó 2.5 veces mostrando la deslocalización de las proteínas virales. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. (C) la gráfica compara los coeficientes de colocalización entre ambas proteínas virales (E/NS3) de las células infectadas sin tratar y tratadas con NDGA. $*=p<0.05$

NDGA altera el patrón de distribución de ambas proteínas virales (coeficiente de colocación de 0.4) y reduce la cantidad de proteína viral, sugiriendo que la inhibición de síntesis de lípidos altera la estructura de los complejos replicativos. Este hecho correlaciona con lo observado anteriormente con la activación de AMPK y la inhibición directa de la actividad de la HMGCR. En conjunto, estos resultados indican que la inhibición de la replicación viral inducida por el tratamiento con NDGA es a través de la alteración de la formación de los complejos replicativos.

Por último, se ha descrito que estructuras ricas en ésteres de colesterol derivadas de RE denominadas Lipid Droplets (LD), participan activamente en el ensamblaje viral ya que la asociación de la proteína C del virus a estas estructuras es indispensable para este proceso (Samsa et al., 2009). Se tiene evidencia que el tratamiento con NDGA es capaz de inhibir la formación de las LD ya que tiene un efecto importante en la activación de AMPK al igual que el efecto conocido para metformina (Syed and Siddiqui, 2011). Por lo tanto, se analizó si el tratamiento con NDGA era capaz de alterar también el ensamblaje viral (Figura 23). Para ello, mediante ensayos de citometría de flujo evaluamos el efecto de NDGA sobre la formación de LD. Lo primero que destaca es el hecho de que durante infección por DENV, la cantidad de LD se incrementa de manera significativa y que el tratamiento con NDGA es capaz de reducirla de manera dependiente de la concentración- (Figura 23A). Adicionalmente, también se corroboró el efecto antiviral de NDGA ya que la cantidad de células infectadas disminuye con el tratamiento (Figura 23B). Con el fin de evaluar si las células que incrementan la cantidad de LD corresponden a la población de células infectadas, se realizó un doble marcaje para detectar las células infectadas y positivas para LD las cuales se representan en el cuadrante superior derecho. La figura 23C muestra que una población del 33% es positiva para ambos parámetros en las células infectadas y sin tratar. Sin embargo, el tratamiento es capaz de reducir esta población hasta un 11% sugiriendo que la reducción en la cantidad de LD, mediado por el tratamiento con NDGA, promueve un efecto antiviral.

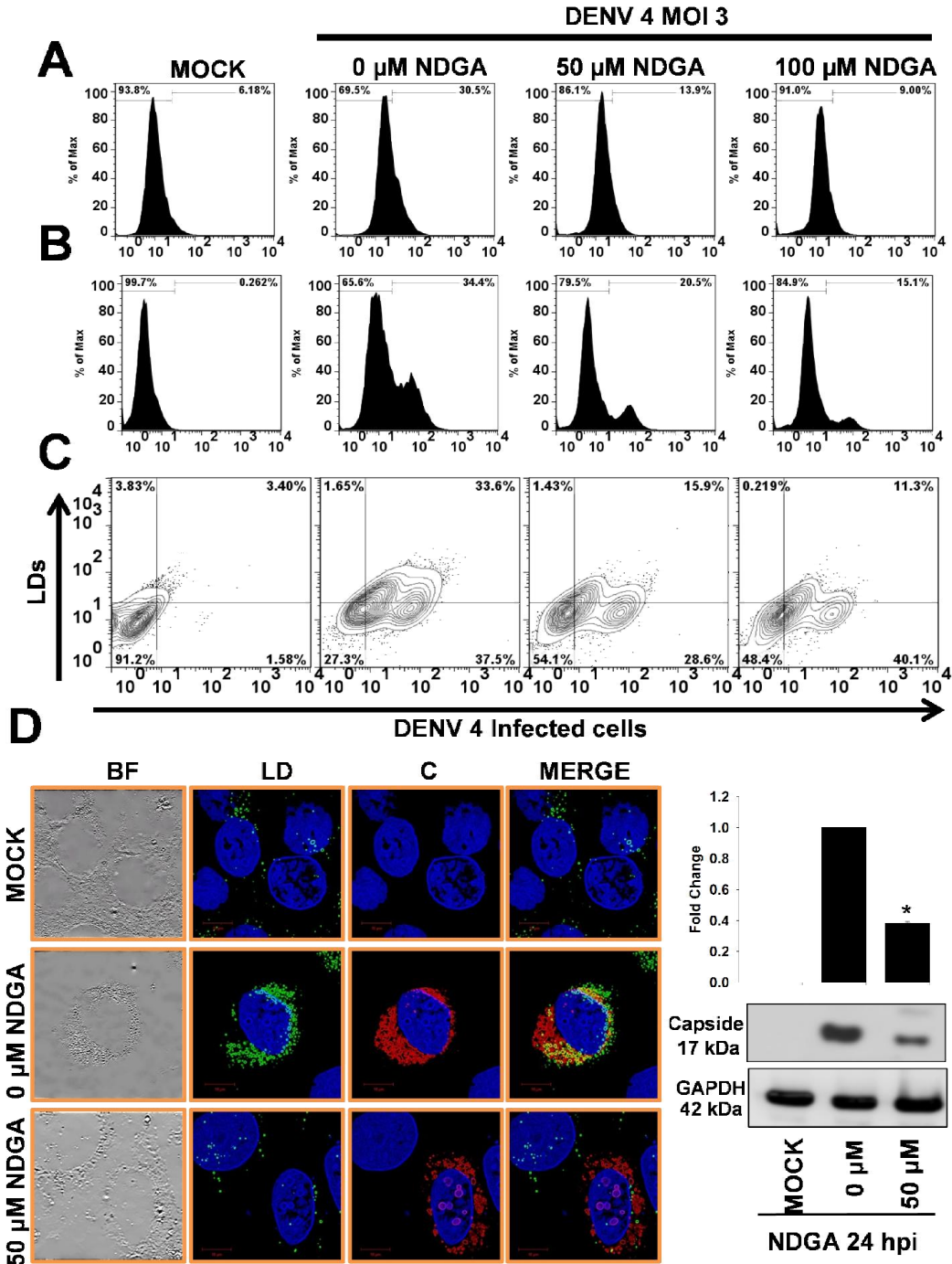


Figura 23. Efecto del NDGA sobre los niveles y distribución de LDs y cápside viral en células infectadas por DENV. La cantidad de Lipid droplets y células infectadas fueron cuantificadas por citometría de flujo. Los histogramas indican la intensidad de fluorescencia media y la cantidad de células positivas para LDs (A) e infección (B). El panel C (cuadrante superior derecho) indica la población de células infectadas positivas para LDs. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes. El efecto del NDGA en la distribución de los LDs y cápside observado por microscopía confocal se confirmó por ensayos de western blot (D). * $p < 0.05$

Así mismo, con la finalidad de evaluar si la reducción de LD inhibía el ensamblaje viral mediante la inhibición de la interacción de la proteína C con estas estructuras, se realizó la tinción de LD y proteína C en células infectadas y tratadas y el patrón de distribución se analizó mediante microscopía confocal. En las células infectadas se confirmó un incremento de la cantidad de LDs y pudo observarse que el patrón de localización de la proteína C concuerda con el patrón de LD. Sin embargo, el tratamiento con NDGA disminuyó drásticamente la cantidad de LD y la cantidad y el patrón de distribución de la proteína C (Figura 23D); la reducción en la cantidad de proteína C fue corroborada por ensayos de western blot (Figura 23E). Por lo tanto, estos resultados demuestran que el tratamiento con NDGA es capaz de alterar también el ensamblaje viral a través de la reducción en la cantidad de LD y el impedimento de la interacción de la proteína C con estas estructuras.

Por último, se corroboró el efecto anti-DENV del NDGA en otras líneas celulares (Figura 24). Para ello, se infectaron células Vero y células U937-DC SIGN con DENV4 y DENV2 y la cantidad de células infectadas se analizó por ensayos de citometría de flujo. En ambas líneas celulares se observó que el tratamiento con NDGA fue capaz de reducir la cantidad de células infectadas a la mitad, indicando que el efecto antiviral del NDGA es reproducible en otras líneas celulares (Figura 24A y B).

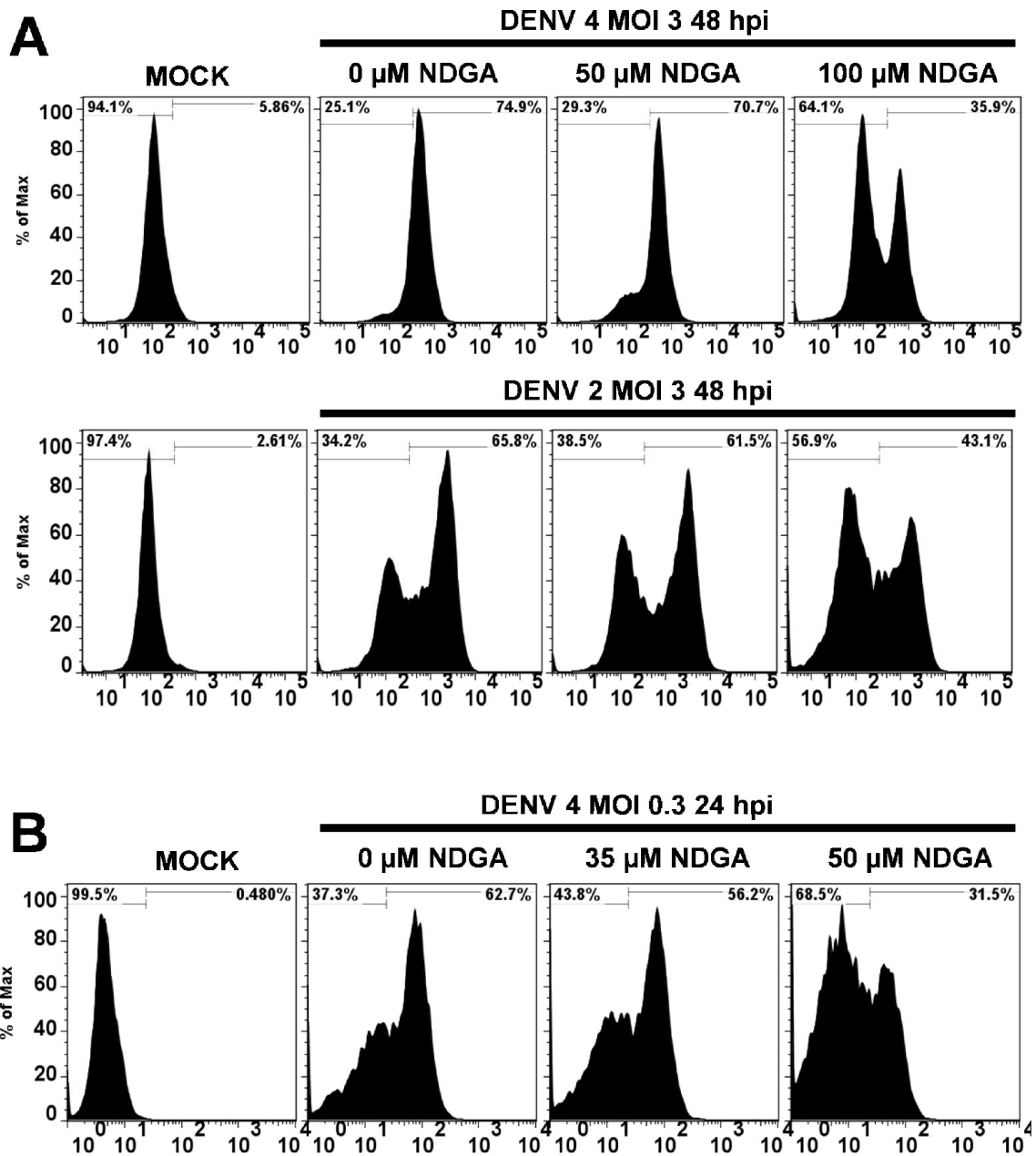


Figura 24. Propiedad antiviral del NDGA contra DENV en células Vero y U937-DC SIGN. (A) Células Vero infectadas y tratadas durante 48 horas con DENV 4 y DENV 2 a MOI de 3. (B) Células U937-DC SIGN infectadas a MOI 0.3 con DENV 4 y tratadas con NDGA durante 24 h.

8. Discusión.

Durante los últimos años se ha acumulado evidencia bioquímica y farmacológica que demuestra la importancia del colesterol en distintas etapas del ciclo replicativo de DENV (Lee et al., 2008; Rothwell et al., 2009; Soto-Acosta et al., 2013), por tanto, podría esperarse que la infección por DENV modulara los niveles de colesterol intracelular. Un incremento en la formación de balsas lipídicas y colesterol total se observó después de la infección por DENV, tan pronto como a 1 hpi y se mantuvo hasta las 6 hpi. Estos resultados sugieren que la unión y/o entrada viral desencadenan un incremento en la formación de balsas lipídicas y colesterol a tiempos tempranos de infección. De acuerdo con estos resultados, el virus inactivado UV-DENV4, solo produjo el incremento del colesterol intracelular a 1 hpi pero no a las 6 hpi, sugiriendo que la replicación viral es requerida para mantener el incremento de colesterol hasta las 6 hpi. Interesantemente, tanto en este trabajo como en el de otros autores (Rothwell et al., 2009), se ha reportado que no se presentan cambios en los niveles de colesterol a tiempos de infección posteriores a las 6 hpi, por lo que la modulación del colesterol parece constituir un evento temprano, el cual es desencadenado por la entrada viral, pero necesita de la replicación viral para completar el proceso de estimulación. De manera adicional, se hicieron dos importantes observaciones: el incremento del colesterol y de las balsas lipídicas correlaciona con la multiplicidad de infección y el proceso es específico de la infección por DENV.

El incremento en la captación de partículas LDL a través de su receptor es una de las formas por la cual la célula responde para incrementar la demanda en los niveles de colesterol (Daniels et al., 2009; Soccio and Breslow, 2004). En este trabajo se detectó un incremento en los niveles de LDLR sobre la membrana celular a 1 hpi, donde además, este incremento se encuentra completamente funcional, como lo indicó el incremento en la captación de partículas LDL marcadas con Dil en las células infectadas. Interesantemente, la infección con UV-DENV4 no fue capaz de inducir cambio alguno sobre el LDLR, sugiriendo que algún evento temprano pero posterior a la entrada (decapsidación) sea el inductor

del incremento del receptor sobre la superficie celular el cual puede ser debido a un incremento en el reciclamiento del LDLR hacia la membrana celular. Esta posibilidad está soportada por la ausencia de efecto sobre la cantidad de receptor recién sintetizado analizado por ensayos de western blot, ni en la cantidad de RNAm que codifica para el receptor en respuesta a la infección.

El LDLR tiene 5 regiones funcionalmente distintas, la región N terminal encargada de la unión del ligando, una región homóloga con el precursor del factor de crecimiento epidermal (EGF), una región de O-glicosilación, un dominio transmembranal y el dominio C-terminal citosólico (Gent and Braakman, 2004). Este receptor, a través de su dominio EGF, es capaz de unir a la PCSK9 (proprotein convertase subtilin/kexin type 9) la cual redirecciona al LDLR hacia degradación lisosomal inhibiendo el reciclaje del receptor hacia la superficie celular (Mousavi et al., 2009; Zhang et al., 2007). De manera adicional, se ha descrito una nueva vía post transcripcional para controlar la incorporación de partículas LDL a través de ubiquitinación del LDLR mediada por IDOL (E3-ubiquitin ligase inducible degrader) (Sorrentino and Zelcer, 2012). Por lo tanto, estudios posteriores de actividad de PCSK9 y bloqueo de la actividad del proteosoma podrían también ser de utilidad para comprender el mecanismo involucrado en el incremento del LDLR en la superficie celular a tiempos tempranos de infección por DENV.

El incremento en la cantidad de las enzimas involucradas en la síntesis de colesterol, o el incremento en la actividad de esas enzimas es una forma complementaria para promover el incremento de los niveles de colesterol intracelular. Se ha reportado que la cantidad de enzima limitante en la síntesis de colesterol (HMGCR) o su ARNm no se encuentran incrementados en las células infectadas por DENV (Peña and Harris, 2012). Sin embargo, la actividad de la enzima no había sido evaluada. Está bien descrito que la forma desfosforilada de la HMGCR es la forma activa. Si la enzima es fosforilada en la serina 872, un residuo conservado en el sitio activo, su actividad es menor que cuando está desfosforilada (Burg and Espenshade, 2011; Omkumar et al., 1994; Subbaiah et al., 2008). Durante la infección con DENV y UV-DENV4, se observó una reducción

en los niveles de fosforilación de la HMGCR a 1 hpi, sugiriendo que la entrada viral es el detonante en el incremento de la actividad enzimática y este incremento correlaciona con el incremento en la cantidad de colesterol intracelular y balsas lipídicas observados a 1 hpi. Además, nuevamente la disminución en la fosforilación de la enzima se observó desde las 9 hpi y hasta las 18 hpi. Este segundo aumento en cantidad de enzima desfosforilada concuerda con el incremento en la actividad de la HMGCR observado a las 24 hpi en las células infectadas. El incremento en la actividad de esta enzima ha sido reportada en otras infecciones virales, principalmente en la infección por el virus respiratorio sincitial (RSV) y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) donde dicho incremento participa en la transmisión viral intercelular dependiente de actina y en la acumulación de colesterol, la cual presumiblemente pudiera jugar un importante papel en la replicación viral (Feeney et al., 2013; Ravi et al., 2013). Los principales eventos que podrían explicar el incremento de actividad de la HMGCR serían que la infección por DENV fuera capaz de promover un decremento en la actividad de la cinasa dependiente de AMP (AMPK) o el incremento en la actividad de la protein-fosfatasa 2 (PP2A). Por lo tanto, si el incremento en la actividad de la enzima está mediado por estas 2 vías, entonces el tratar las células infectadas con fármacos que producen un efecto contrario al esperado por el efecto de la infección (metformina, activador de AMPK; ácido okadaico, inhibidor de PP2A) tendría un efecto notable en la restitución de la actividad de la HMGCR, inhibiendo la infección. Inesperadamente, el tratamiento con el inhibidor de PP2A (A.O.) no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la HMGCR en las células infectadas, sugiriendo que el efecto de la infección sobre la HMGCR no es mediado por la activación de PP2A. Este efecto se corroboró al no observarse cambio alguno en la actividad de fosfatasa de PP2A en las células infectadas a ningún tiempo de la infección (1, 12 y 24 hpi). Sin embargo, a pesar de que PP2A no es modulada por la infección con DENV en la línea celular Huh7, la inhibición de esta fosfatasa, mediada por el tratamiento con ácido okadaico, tiene un modesto efecto antiviral evidenciado por distintos marcadores de infección. Por lo tanto, la ausencia de efecto sobre la actividad de HMGCR y la presencia de efecto

antiviral del ácido okadaico sugiere que el efecto anti-DENV es mediado de manera HMGCR-independiente.

Se ha reportado que durante la infección por HCV se produce una sobre expresión de PP2A en respuesta a estrés de RE (Christen et al., 2007; Guernon et al., 2011) que tiene como resultado un incremento en la actividad de la helicasa NS3 (Duong et al., 2005). Por otro lado, se ha descrito que esta sobre expresión de PP2A inhibe la señalización inducida por interferón mediante la inhibición las proteínas STAT1 y 2 (Duong et al., 2005). Por su parte, la infección con DENV, específicamente la proteína no-estructural NS5, es capaz de inhibir la respuesta a interferón (Mazzon et al., 2009). Por lo tanto, una posibilidad para explicar la inhibición de la infección por DENV después del tratamiento con ácido okadaico podría deberse a una incremento de la respuesta a interferón, induciendo inhibición de la infección. Alternativamente, consideramos interesante analizar la relación entre PP2A y la actividad de helicasa de la proteína no estructural NS3 en la infección por DENV y dilucidar si el efecto antiviral del tratamiento con ácido okadaico pudiera estar mediado por la inhibición de la actividad de NS3, como se ha descrito para HCV (Duong et al., 2005). Adicionalmente, se ha descrito que el tratamiento con ácido okadaico activa la protein cinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR) y está bien establecido que la activación de esta cinasa tiene un amplio espectro antiviral (Haneji et al., 2013; Reineke and Lloyd, 2014). Por lo tanto, ensayos de actividad de helicasa de NS3 y ensayos para determinar la actividad de PKR en células infectadas con DENV serían útiles en la caracterización del mecanismo antiviral del ácido okadaico observado en este trabajo.

Por otro lado, el tratamiento con metformina fue capaz de restablecer a niveles basales la incrementada actividad de la HMGCR en las células infectadas, comportándose de manera similar al efecto de la inhibición enzimática directa obtenida por un inhibidor competitivo para la HMGCR (lovastatina). Este hecho sugiere que el incremento de actividad de la HMGCR está mediado por la inhibición de la actividad de AMPK. AMPK es un heterotrímero que consiste en una subunidad catalítica junto con dos subunidades reguladoras, esta molécula es

activada mediante fosforilación en un residuo específico de treonina en la subunidad catalítica (Thr172) a través de cinasas que se encuentran río arriba de la vía (Towler and Hardie, 2007). Por lo tanto, se evaluó la actividad de AMPK midiendo los niveles de fosforilación en las células infectadas y se observó que efectivamente la infección por DENV induce una reducción en la actividad de la AMPK desde la hora de infección siendo estadísticamente significativa a las 12 y 24 hpi. Adicionalmente, demostramos que el revertir el efecto de la infección sobre esta molécula empleando tratamientos con metformina induce un potente efecto antiviral evidenciado por distintos marcadores de infección, colocando a esta molécula como un potencial blanco terapéutico contra la infección por DENV.

Se ha reportado que la actividad de AMPK es reducida por AKT o proteína cinasa B (PKB), una serina/treonina cinasa involucrada en la señalización celular río abajo de factores de crecimientos, citocinas y otros estímulos celulares. Esta cinasa es capaz de fosforilar a AMPK en los residuos de serina 485/491 de la subunidad catalítica reduciendo la fosforilación de AMPK en la treonina 172 induciendo una reducción en la actividad de AMPK (Horman et al., 2006; Kovacic et al., 2003). Distintos flavivirus entre ellos DENV y el virus de la encefalitis japonesa (JEV) activa la vía PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa)/AKT, por lo tanto esta activación podría ser la responsable de la inactivación de AMPK y el subsecuente incremento de actividad de la HMGCR (Das et al., 2010; Lee et al., 2005; Zhu et al., 2012).

En resumen, nuestros resultados demuestran un proceso dinámico en la modulación de colesterol en las células infectadas por DENV en la línea celular hepática Huh7. En primer lugar, los resultados sugieren que la entrada viral es capaz de desencadenar un incremento en la cantidad de balsas lipídicas en la superficie celular en respuesta a un incremento en la concentración de colesterol intracelular el cual es el resultado de 2 mecanismos distintos: un incremento en la captación de colesterol exógeno por parte del LDLR y un incremento en la síntesis de colesterol mediante un incremento en la actividad de la HMGCR posiblemente regulado por un decremento en la actividad de AMPK. Posteriormente, a las 6 hpi, los niveles de colesterol intracelular se mantienen incrementados aun cuando la

captación de colesterol exógeno y la actividad enzimática regresan a valores basales. Sin embargo, la cantidad de balsas lipídicas está aumentada, no a los mismos niveles que a 1 hpi, pero sigue siendo significativa con respecto a las células no infectadas. Considerando que posiblemente a las 6 hpi se lleva a cabo una temprana síntesis de proteínas virales y es el comienzo en la formación de los complejos replicativos para permitir la replicación efectiva del genoma viral, el redireccionamiento del colesterol presente en las balsas lipídicas de la superficie celular, (las cuales podrían funcionar como reservorio de colesterol), hacia los complejos replicativos en el RE, podría ser el mecanismo que explica el mantenimiento de los niveles de colesterol intracelular. Esto también podría explicar la reducción en la cantidad de balsas lipídicas en las células infectadas aun cuando la captación de colesterol exógeno y su síntesis regresan a valores basales. Está bien descrito que el transportador de esteroides STARD4, una proteína soluble que consiste en un solo dominio de transferencia de lípidos de aproximadamente 210 aminoácidos, es capaz de modular la concentración de colesterol en la superficie celular y re-dirigirlo hacia RE (Mesmin et al., 2013); por lo tanto, estudios funcionales de este transportador podrían ayudar a caracterizar la localización subcelular del colesterol en la infección por DENV. Por último, los resultados previos indican que los niveles de balsas lipídicas y colesterol intracelular regresan a niveles basales a partir de las 12 hpi; sin embargo, el incremento en la actividad de la HMGCR mediada por un decremento en la actividad de AMPK es muy evidente, por lo tanto nuestra hipótesis es que probablemente el colesterol recién sintetizado está siendo utilizado por la maquinaria de replicación viral para construir los complejos replicativos.

DENV y otros virus con genoma de RNA de polaridad positiva modifican las membranas del RE con el fin de concentrar todos los factores necesarios para la replicación del genoma viral (complejos replicativos) (Apte-Sengupta et al., 2014; Mukhopadhyay et al., 2005; Perera et al., 2012; Stiasny and Heinz, 2006). Los resultados de este trabajo indican que la HMGCR además de estar activa, se encuentra presente en los complejos replicativos y el incremento en la síntesis de colesterol en las células infectadas juega un papel importante en la construcción

del complejo replicativo evidenciado por la disrupción del complejo replicativo mediada por la inhibición directa (lovastatina) e indirecta (metformina) de la actividad de la HMGCR. Adicionalmente, el efecto mayor de metformina sobre el complejo replicativo en comparación con el efecto observado con el tratamiento con lovastatina refuerza el papel de AMPK en la infección por DENV y sugiere mecanismos alternos a la inhibición de la HMGCR por los cuales la activación de esta cinasa promueve un efecto antiviral. Se ha descrito que la AMPK activada interacciona y directamente fosforila los SREBP-1c y 2, estas proteínas son factores de transcripción que activan genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y colesterol. La fosforilación mediada por la forma activada de AMPK inhibe la translocación al núcleo de estos factores de transcripción inhibiendo la transcripción de la sintasa de ácidos grasos (FAS) y la HMGCR de manera adicional a la fosforilación directa de ambas enzimas para inhibir su actividad (Lateef et al., 2013; Lee et al., 2010; Li and Chiang, 2009; Li et al., 2011; Zhang et al., 2013). Perera y colaboradores en el 2012 demostraron, en células derivadas de mosquito, diferencias significativas en el perfil lipídico intracelular de las células infectadas con DENV en comparación con células no infectadas. Los tipos de lípidos enriquecidos en las células infectadas tienen la capacidad de alterar la membrana estructural y funcionalmente, confirmando la idea que la infección con DENV promueve importantes rearrreglos membranales a través de la alteración en el metabolismo lipídico (Junjhon et al., 2014). Por otro lado, A este respecto, Heaton y colaboradores en el 2010 demostraron que la proteína NS3 es capaz de reclutar la enzima necesaria para la síntesis de ácidos grasos hacia los complejos replicativos, incrementando su actividad. Dicho incremento en la síntesis de ácidos grasos podría estar coordinado con la síntesis del colesterol para incrementar la síntesis de membranas de los complejos replicativos (Heaton et al., 2010).

Considerando que la activación de AMPK tiene un efecto hipolipidémico amplio que afecta la síntesis de distintas clases de lípidos y la importancia de estos lípidos en la infección por DENV, este trabajo sugiere que AMPK es el principal regulador usado por el virus para modificar el perfil lipídico en las células

infectadas con el fin de construir el complejo replicativo para permitir la replicación viral.

Con la finalidad de reforzar el papel de AMPK en la infección por DENV, se evaluó el efecto antiviral del ácido nordihidroguayarático (NDGA), una molécula capaz de incrementar la actividad de AMPK (Lee et al., 2010; Zhang et al., 2013). En primer lugar, el tratamiento con NDGA produjo una reducción en los niveles de colesterol cuando las células se trataron durante 24 y 48 horas desde la concentración más baja empleada, sugiriendo que este fármaco es capaz de generar un ambiente intracelular pobre en lípidos lo cual es deletéreo para DENV. El mecanismo involucrado en el efecto hipolipidémico del NDGA está basado en 2 moléculas efectoras: la activación de AMPK, cuyo efecto hipolipidémico se describió anteriormente y el incremento en los niveles proteicos de PPAR α . Se ha descrito que el tratamiento con NDGA incrementa los niveles de RNAm y proteicos de esta molécula en el hígado de modelos de ratón y en la línea celular hepática HepG2. Así, PPAR α induce la oxidación de ácidos grasos en el hígado, por lo tanto se cree que el efecto hipocolesterolémico del NDGA en el hígado y en las líneas celulares hepáticas es un evento concertado con la reducción en los niveles de ácidos grasos y triglicéridos en el ambiente intracelular y estos efectos tienen mecanismos moleculares comunes (Lee et al., 2010; Li et al., 2011).

La reducción de la progenie viral y secreción de NS1 dependiente de la concentración del NDGA durante 24 y 48 horas correlaciona con la reducción de los niveles de colesterol, sugiriendo que el efecto inhibitor de la síntesis de lípidos está relacionado con la reducción del proceso infeccioso. Sin embargo, con este resultado no es posible determinar el paso preciso en el ciclo replicativo de DENV que es alterado con el tratamiento con NDGA. La dependencia lipídica en diferentes pasos durante la replicación y ensamblaje de DENV ya ha sido ampliamente descrita a lo largo de este trabajo (entrada, replicación y ensamblaje). Aunque el tratamiento con NDGA es capaz de reducir los niveles de colesterol en la membrana plasmática de células infectadas, tal y como se ha descrito para otros compuestos como las estatinas (del Toro et al., 2010; Zhuang

et al., 2005), nuestras observaciones no tomaron en cuenta esta propiedad del NDGA ya que el tratamiento se realizó después de entrada viral a la célula.

La reducción de la señal de luciferasa dependiente de la concentración de NDGA del replicón de DENV establemente expresado en las células Vero sugiere que el NDGA inhibió la traducción y/o la replicación viral. Esta conclusión se encuentra respaldada por la reducción en la cantidad de genoma viral y en los niveles de proteínas virales que se indujeron tras el tratamiento con NDGA en células Huh7 infectadas. Syed y Siddiqui (2011), observaron que el tratamiento con NDGA disminuye específicamente la replicación del genoma de HCV sin afectar la traducción de proteínas virales, sin embargo, en este trabajo no es posible discriminar entre estos dos procesos. La sobre-regulación de la actividad de AMPK producida por NDGA, la cual a su vez inhibe la síntesis de FAS y HMGCR principalmente, a través de la inhibición de la translocación de los SREBPs puede ser el mecanismo principal por el cual el NDGA promueve la inhibición de la replicación viral. Estos resultados correlacionan con estudios previos donde se reporta la susceptibilidad de la replicación de DENV a fármacos inhibidores de la síntesis lipídica (Martínez-Gutierrez et al., 2011; Martinez-Gutierrez et al., 2014; Rothwell et al., 2009). Para estudiar la posibilidad que el efecto hipolipidémico del NDGA altere la estructura del complejo replicativo y esta sea la causa de la inhibición de la replicación viral, realizamos ensayos de microscopía confocal en células Huh7 infectadas y tratadas con NDGA. Los resultados indican que el NDGA promueve un cambio en el patrón de distribución y una disminución en los niveles de colocalización de las proteínas virales E y NS3 en los complejos replicativos. Considerando el posible papel de los ácidos grasos y esfingolípidos en la formación del complejo replicativo y el efecto directo del NDGA en el metabolismo lipídico, estos resultados sugieren que el NDGA altera la estructura del complejo de replicación. El papel que juega la vía de SREBP-2 en el rearrreglo membranal es menos claro debido a que la inhibición de la HMGCR no tuvo ningún efecto en la estructura del complejo replicativo en células de fibrosarcoma humano (línea celular 2fTGH) infectadas con DENV (Peña and Harris, 2012). Sin embargo, la activación de AMPK inducida por NDGA y la concertada inhibición de

las vías lipogénicas y activación de las vías lipolíticas en las líneas celulares hepáticas pueden explicar el efecto sobre la estructura del complejo replicativo. Adicionalmente, el potente efecto antioxidante que posee el NDGA puede también estar involucrado en el efecto antiviral (Czapski et al., 2012; Chen, 2009). La infección por DENV promueve estrés oxidativo e incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Cuando esta condición es revertida usando antioxidantes como la adición de glutatión exógeno y N-acetilcisteína el proceso infeccioso es reducido (Chen et al., 2011; Tian et al., 2010; Wang et al., 2013).

Como se describió anteriormente, la encapsidación del genoma viral es un paso crucial en el ensamblaje de la partícula viral, adicionalmente, estructuras lipídicas incluyendo LD están involucrados en este proceso (Carvalho et al., 2012; Samsa et al., 2009). En este trabajo, el efecto inhibitorio del NDGA sobre el ensamblaje viral se evaluó usando dos parámetros. Primero, evaluación de la cantidad de células positivas para LDs medido por citometría de flujo y segundo, la colocación entre estas estructuras y la proteína viral C por microscopía confocal. Nuestra primera observación fue como se esperaba, un incremento en la cantidad de LDs durante la infección por DENV, sin embargo, el NDGA redujo dramáticamente la abundancia de los LDs en las células infectadas. Estos resultados son consistentes con observaciones previas (Samsa et al., 2009). Nuestra segunda observación fue que el tratamiento con NDGA disminuye la cantidad de proteína viral C, pero más relevante aun fue observar que el patrón de distribución de la misma proteína viral estaba significativamente alterado en las células tratadas. La modificación en abundancia y distribución de la proteína de la cápside puede estar relacionada con la inhibición de la síntesis de LD inducida por el tratamiento con NDGA. Ambas observaciones son congruentes con la reducción de la progenie viral y la secreción de NS1 observada en las células infectadas y tratadas sugiriendo que el tratamiento con NDGA.

En este trabajo la modificación de las vías de secreción del virus no fueron evaluadas. Sin embargo, este proceso podría estar alterado en las células infectadas y tratadas con NDGA. El tráfico de viriones y NS1 ocurre a través de la

ruta secretora clásica, debido a que el metabolismo de lípidos y específicamente el ensamblaje de los microdominios lipídicos son requeridos para la formación de vesículas secretoras a través de la red del trans-Golgi, sería de esperarse que el efecto inhibitorio de la síntesis de colesterol inhiba la secreción de NS1 y partículas virales a través de la inhibición de la ruta secretora (Fujiwara et al., 1998; Stadler et al., 1997; Yu et al., 2008). De manera adicional, se ha reportado que el NDGA inhibe la biosíntesis y secreción de lipopartículas de muy baja densidad (VLDL) a través de la inhibición de genes involucrados en la secreción de estas partículas (Syed and Siddiqui, 2011). Se ha reportado recientemente que la proteína viral C de DENV es capaz de interactuar con VLDL, específicamente con la proteína Apo E, la cual es la principal apolipoproteína de superficie en las VLDL (Faustino et al., 2014; Samsa et al., 2009). Además, se ha propuesto que la interacción entre la proteína C del HCV y la ApoE de las VLDL permite la formación de lipovirpartículas (Andre et al., 2002). Por lo tanto, la inhibición de la síntesis de VLDL podría ser otro mecanismo operante en el efecto antiviral del NDGA contra la infección por DENV tal y como se ha reportado para HCV por Syed and Siddiqui (2011).

En resumen, los resultados obtenidos con el tratamiento con NDGA indican que el efecto hipolipidémico y antioxidante del NDGA tiene un efecto antiviral contra la infección por DENV inhibiendo al menos dos importantes procesos virales, la replicación del genoma y el ensamblaje viral. Adicionalmente, refuerza el papel de AMPK en la infección por DENV.

9. Conclusión.

La infección por DENV es capaz de incrementar los niveles de colesterol modulando moléculas que participan en la regulación de los niveles de colesterol intracelular. Adicionalmente, la identificación del papel de estas moléculas HMGCR, AMPK y PP2A en la infección por DENV y el efecto antiviral observado con fármacos que las regulan (estatinas, metformina, NDGA y ácido Okadaico) permiten considerarlas como blancos terapéuticos contra la infección por DENV.

10. Perspectivas.

- Ensayos clínicos del tratamiento con estatinas (protocolo aprobado) y metformina en pacientes con dengue.
- Ensayos en modelos animales de moléculas experimentales como NDGA y ácido okadaico.
- Evaluar el mecanismo de inactivación de AMPK en la infección por DENV.
- Determinar el mecanismo de acción anti-dengue del ácido okadaico.
- Caracterizar la participación de otras moléculas en la infección por DENV:
 - transportadores de colesterol (STARD4, ABC1)
 - Reguladores de la degradación del receptor LDL (PCSK9, IDOL).

11. Referencias.

- Alvarez, D.E., Filomatori, C.V., and Gamarnik, A.V. (2008). Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology* 375, 223-235.
- Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodoyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G., and Lotteau, V. (2002). Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol* 76, 6919-6928.
- Anwar, A., Hosoya, T., Leong, K.M., Onogi, H., Okuno, Y., Hiramatsu, T., Koyama, H., Suzuki, M., Hagiwara, M., and Garcia-Blanco, M.A. (2011). The kinase inhibitor SFV785 dislocates dengue virus envelope protein from the replication complex and blocks virus assembly. *PLoS One* 6, e23246.
- Apte-Sengupta, S., Sirohi, D., and Kuhn, R.J. (2014). Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Current opinion in virology* 9C, 134-142.
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., and Cardenas, R. (2005). *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol* 98, 231-239.
- Burg, J.S., and Espenshade, P.J. (2011). Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res* 50, 403-410.
- Callahan, J.D., Wu, S.J., Dion-Schultz, A., Mangold, B.E., Peruski, L.F., Watts, D.M., Porter, K.R., Murphy, G.R., Suharyono, W., King, C.C., *et al.* (2001). Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J Clin Microbiol* 39, 4119-4124.
- Carvalho, F.A., Carneiro, F.A., Martins, I.C., Assuncao-Miranda, I., Faustino, A.F., Pereira, R.M., Bozza, P.T., Castanho, M.A., Mohana-Borges, R., Da Poian, A.T., *et al.* (2012). Dengue virus capsid protein binding to hepatic lipid droplets (LD) is potassium ion dependent and is mediated by LD surface proteins. *J Virol* 86, 2096-2108.
- Cuadras, M.A., Bordier, B.B., Zambrano, J.L., Ludert, J.E., and Greenberg, H.B. (2006). Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *Journal of virology* 80, 3935-3946.
- Czapski, G.A., Czubowicz, K., and Strosznajder, R.P. (2012). Evaluation of the antioxidative properties of lipoxigenase inhibitors. *Pharmacol Rep* 64, 1179-1188.
- Chazal, N., and Gerlier, D. (2003). Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 226-237, table of contents.
- Chen, Q. (2009). Nordihydroguaiaretic acid analogues: their chemical synthesis and biological activities. *Curr Top Med Chem* 9, 1636-1659.
- Chen, T.H., Tang, P., Yang, C.F., Kao, L.H., Lo, Y.P., Chuang, C.K., Shih, Y.T., and Chen, W.J. (2011). Antioxidant defense is one of the mechanisms by which mosquito cells survive dengue 2 viral infection. *Virology* 410, 410-417.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., and Marks, R.M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 3, 866-871.
- Chien, L.J., Liao, T.L., Shu, P.Y., Huang, J.H., Gubler, D.J., and Chang, G.J. (2006). Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol* 44, 1295-1304.
- Christen, V., Treves, S., Duong, F.H., and Heim, M.H. (2007). Activation of endoplasmic reticulum stress response by hepatitis viruses up-regulates protein phosphatase 2A. *Hepatology* 46, 558-565.
- Daniels, T.F., Killinger, K.M., Michal, J.J., Wright, R.W., Jr., and Jiang, Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci* 5, 474-488.
- Das, S., Chakraborty, S., and Basu, A. (2010). Critical role of lipid rafts in virus entry and activation of phosphoinositide 3' kinase/Akt signaling during early stages of Japanese encephalitis virus infection in neural stem/progenitor cells. *J Neurochem* 115, 537-549.
- del Toro, D., Xifro, X., Pol, A., Humbert, S., Saudou, F., Canals, J.M., and Alberch, J. (2010). Altered cholesterol homeostasis contributes to enhanced excitotoxicity in Huntington's disease. *J Neurochem* 115, 153-167.
- Delacour, D., and Jacob, R. (2006). Apical protein transport. *Cell Mol Life Sci* 63, 2491-2505.

Duong, F.H., Christen, V., Berke, J.M., Penna, S.H., Moradpour, D., and Heim, M.H. (2005). Upregulation of protein phosphatase 2Ac by hepatitis C virus modulates NS3 helicase activity through inhibition of protein arginine methyltransferase 1. *J Virol* 79, 15342-15350.

Faustino, A.F., Carvalho, F.A., Martins, I.C., Castanho, M.A., Mohana-Borges, R., Almeida, F.C., Da Poian, A.T., and Santos, N.C. (2014a). Dengue virus capsid protein interacts specifically with very low-density lipoproteins. *Nanomedicine* 10, 247-255.

Faustino, A.F., Guerra, G.M., Huber, R.G., Hollmann, A., Domingues, M.M., Barbosa, G.M., Enguita, F.J., Bond, P.J., Castanho, M.A., Poian, A.T., *et al.* (2014b). Understanding Dengue Virus Capsid Protein Disordered N-Terminus and pep14-23-Based Inhibition. *ACS chemical biology*.

Feeney, E.R., McAuley, N., O'Halloran, J.A., Rock, C., Low, J., Satchell, C.S., Lambert, J.S., Sheehan, G.J., and Mallon, P.W. (2013). The expression of cholesterol metabolism genes in monocytes from HIV-infected subjects suggests intracellular cholesterol accumulation. *The Journal of infectious diseases* 207, 628-637.

Friesen, J.A., and Rodwell, V.W. (2004). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol* 5, 248.

Fujiwara, T., Takami, N., Misumi, Y., and Ikehara, Y. (1998). Nordihydroguaiaretic acid blocks protein transport in the secretory pathway causing redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273, 3068-3075.

Gent, J., and Braakman, I. (2004). Low-density lipoprotein receptor structure and folding. *Cell Mol Life Sci* 61, 2461-2470.

Gomez-Dantes, H., and Willoquet, J.R. (2009). Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. *Cad Saude Publica* 25 *Suppl 1*, S19-31.

Guergnon, J., Godet, A.N., Galioot, A., Falanga, P.B., Colle, J.H., Cayla, X., and Garcia, A. (2011). PP2A targeting by viral proteins: a widespread biological strategy from DNA/RNA tumor viruses to HIV-1. *Biochim Biophys Acta* 1812, 1498-1507.

Haneji, T., Hirashima, K., Teramachi, J., and Morimoto, H. (2013). Okadaic acid activates the PKR pathway and induces apoptosis through PKR stimulation in MG63 osteoblast-like cells. *International journal of oncology* 42, 1904-1910.

Heaton, N.S., Perera, R., Berger, K.L., Khadka, S., Lacount, D.J., Kuhn, R.J., and Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17345-17350.

Henchal, E.A., and Putnak, J.R. (1990). The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3, 376-396.

Hilgard, P., and Stockert, R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32, 1069-1077.

Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Mouton, V., Woods, A., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Hue, L., *et al.* (2006). Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J Biol Chem* 281, 5335-5340.

Jindadamrongwech, S., Thepparit, C., and Smith, D.R. (2004). Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 149, 915-927.

Johnson, B.W., Russell, B.J., and Lanciotti, R.S. (2005). Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* 43, 4977-4983.

Joven, J. (2001). Mecanismos de entrada y salida del colesterol de las células y del organismo: implicaciones para el tratamiento farmacológico. *Cardiovascular risk factors* 10, 135 - 142.

Junjhon, J., Pennington, J.G., Edwards, T.J., Perera, R., Lanman, J., and Kuhn, R.J. (2014). Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *Journal of virology* 88, 4687-4697.

Kovacic, S., Soltys, C.L., Barr, A.J., Shiojima, I., Walsh, K., and Dyck, J.R. (2003). Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem* 278, 39422-39427.

Lateef, T., Cui, L., Heaton, L., Nakamura, E.F., Ding, J., Ahmed, S., and Merikangas, K.R. (2013). Validation of a migraine interview for children and adolescents. *Pediatrics* 131, e96-102.

Lee, C.J., Liao, C.L., and Lin, Y.L. (2005). Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *J Virol* 79, 8388-8399.

Lee, C.J., Lin, H.R., Liao, C.L., and Lin, Y.L. (2008). Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *Journal of virology* 82, 6470-6480.

Lee, M.S., Kim, D., Jo, K., and Hwang, J.K. (2010). Nordihydroguaiaretic acid protects against high-fat diet-induced fatty liver by activating AMP-activated protein kinase in obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 401, 92-97.

Leyssen, P., De Clercq, E., and Neyts, J. (2000). Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. *Clin Microbiol Rev* 13, 67-82, table of contents.

Li, T., and Chiang, J.Y. (2009). Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Res* 2009, 501739.

Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y., *et al.* (2011). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab* 13, 376-388.

Ludert, J.E., Mosso, C., Ceballos-Olvera, I., and del Angel, R.M. (2008). Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Virology* 5, 51.

Lyn, R.K., Kennedy, D.C., Sagan, S.M., Blais, D.R., Rouleau, Y., Pegoraro, A.F., Xie, X.S., Stollow, A., and Pezacki, J.P. (2009). Direct imaging of the disruption of hepatitis C virus replication complexes by inhibitors of lipid metabolism. *Virology* 394, 130-142.

Martinez-Gutierrez, M., Castellanos, J.E., and Gallego-Gomez, J.C. (2011). Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology* 54, 202-216.

Martínez-Gutierrez, M., Castellanos, J.E., and Gallego-Gómez, J.C. (2011). Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology* 54, 202-216.

Martinez-Gutierrez, M., Correa-Londono, L.A., Castellanos, J.E., Gallego-Gomez, J.C., and Osorio, J.E. (2014). Lovastatin delays infection and increases survival rates in AG129 mice infected with dengue virus serotype 2. *PLoS One* 9, e87412.

Martins, I.C., Gomes-Neto, F., Faustino, A.F., Carvalho, F.A., Carneiro, F.A., Bozza, P.T., Mohana-Borges, R., Castanho, M.A., Almeida, F.C., Santos, N.C., *et al.* (2012). The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif. *The Biochemical journal* 444, 405-415.

Mathews, C.K., Ahern, K.G., and Holde, K.E.V. (2002). *Bioquímica* (Addison Wesley).

Mazzon, M., Jones, M., Davidson, A., Chain, B., and Jacobs, M. (2009). Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *The Journal of infectious diseases* 200, 1261-1270.

Mesmin, B., Antonny, B., and Drin, G. (2013). Insights into the mechanisms of sterol transport between organelles. *Cell Mol Life Sci* 70, 3405-3421.

Mosso, C., Galván-Mendoza, I.J., Ludert, J.E., and del Angel, R.M. (2008). Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* 378, 193-199.

Mousavi, S.A., Berge, K.E., and Leren, T.P. (2009). The unique role of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 in cholesterol homeostasis. *J Intern Med* 266, 507-519.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3, 13-22.

Oishi, K., Saito, M., Mapua, C.A., and Natividad, F.F. (2007). Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *J Infect Chemother* 13, 125-133.

Omkumar, R.V., Darnay, B.G., and Rodwell, V.W. (1994). Modulation of Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity by phosphorylation. Role of serine 871. *J Biol Chem* 269, 6810-6814.

Payne, A.F., Binduga-Gajewska, I., Kauffman, E.B., and Kramer, L.D. (2006). Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay. *Journal of virological methods* 134, 183-189.

Pena, J., and Harris, E. (2012). Early dengue virus protein synthesis induces extensive rearrangement of the endoplasmic reticulum independent of the UPR and SREBP-2 pathway. *PLoS one* 7, e38202.

Peña, J., and Harris, E. (2012). Early dengue virus protein synthesis induces extensive rearrangement of the endoplasmic reticulum independent of the UPR and SREBP-2 pathway. *PLoS One* 7, e38202.

Perera, R., Khaliq, M., and Kuhn, R.J. (2008). Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral research* 80, 11-22.

Perera, R., Riley, C., Isaac, G., Hopf-Jannasch, A.S., Moore, R.J., Weitz, K.W., Pasa-Tolic, L., Metz, T.O., Adamec, J., and Kuhn, R.J. (2012). Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. *PLoS Pathog* 8, e1002584.

Poh, M.K., Shui, G., Xie, X., Shi, P.Y., Wenk, M.R., and Gu, F. (2012). U18666A, an intra-cellular cholesterol transport inhibitor, inhibits dengue virus entry and replication. *Antiviral research* 93, 191-198.

Povoa, T.F., Alves, A.M., Oliveira, C.A., Nuovo, G.J., Chagas, V.L., and Paes, M.V. (2014). The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One* 9, e83386.

Puerta-Guardo, H., Mosso, C., Medina, F., Liprandi, F., Ludert, J.E., and del Angel, R.M. (2010). Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *J Gen Virol* 91, 394-403.

Ravi, L.I., Liang, L., Wong, P.S., Brown, G., Tan, B.H., and Sugrue, R.J. (2013). Increased hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase activity during respiratory syncytial virus infection mediates actin dependent inter-cellular virus transmission. *Antiviral research* 100, 259-268.

Reineke, L.C., and Lloyd, R.E. (2014). The stress granule protein G3BP1 recruits PKR to promote multiple innate immune antiviral responses. *J Virol*.

Reyes-Del Valle, J., Chávez-Salinas, S., Medina, F., and Del Angel, R.M. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* 79, 4557-4567.

Rosen, L., Drouet, M.T., and Deubel, V. (1999). Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg* 61, 720-724.

Rothwell, C., Lebreton, A., Young Ng, C., Lim, J.Y., Liu, W., Vasudevan, S., Labow, M., Gu, F., and Gaither, L.A. (2009). Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology* 389, 8-19.

Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assuncao-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., Bozza, P.T., and Gamarnik, A.V. (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS pathogens* 5, e1000632.

Seneviratne, S.L., Malavige, G.N., and de Silva, H.J. (2006). Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100, 608-614.

Simons, K., and Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *The Journal of clinical investigation* 110, 597-603.

Simons, K., and Sampaio, J.L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a004697.

Singhi, S., Kissoon, N., and Bansal, A. (2007). Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. *J Pediatr (Rio J)* 83, S22-35.

Soccio, R.E., and Breslow, J.L. (2004). Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1150-1160.

Sorrentino, V., and Zelcer, N. (2012). Post-transcriptional regulation of lipoprotein receptors by the E3-ubiquitin ligase inducible degrader of the low-density lipoprotein receptor. *Current opinion in lipidology* 23, 213-219.

Soto-Acosta, R., Mosso, C., Cervantes-Salazar, M., Puerta-Guardo, H., Medina, F., Favari, L., Ludert, J.E., and del Angel, R.M. (2013). The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology* 442, 132-147.

Stadler, K., Allison, S.L., Schalich, J., and Heinz, F.X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 71, 8475-8481.

Stiasny, K., and Heinz, F.X. (2006). Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol* 87, 2755-2766.

Subbaiah, P.V., Sowa, J.M., and Singh, D.K. (2008). Sphingolipids and cellular cholesterol homeostasis. Effect of ceramide on cholesterol trafficking and HMG CoA reductase activity. *Arch Biochem Biophys* 474, 32-38.

Suzuki, T., and Suzuki, Y. (2006). Virus infection and lipid rafts. *Biol Pharm Bull* 29, 1538-1541.

Syed, G.H., and Siddiqui, A. (2011). Effects of hypolipidemic agent nordihydroguaiaretic acid on lipid droplets and hepatitis C virus. *Hepatology* 54, 1936-1946.

Tan, G.K., and Alonso, S. (2009). Pathogenesis and prevention of dengue virus infection: state-of-the-art. *Curr Opin Infect Dis* 22, 302-308.

Teo, C.S., and Chu, J.J. (2014). Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. *J Virol* 88, 1897-1913.

Thepparit, C., and Smith, D.R. (2004). Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *Journal of virology* 78, 12647-12656.

Tian, Y., Jiang, W., Gao, N., Zhang, J., Chen, W., Fan, D., Zhou, D., and An, J. (2010). Inhibitory effects of glutathione on dengue virus production. *Biochem Biophys Res Commun* 397, 420-424.

Tolle, M.A. (2009). Mosquito-borne diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 39, 97-140.

Towler, M.C., and Hardie, D.G. (2007). AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 100, 328-341.

Uchil, P.D., and Satchidanandam, V. (2003). Architecture of the flaviviral replication complex. Protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane compartments. *J Biol Chem* 278, 24388-24398.

Vagin, O., Kraut, J.A., and Sachs, G. (2009). Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F459-469.

Wang, J., Chen, Y., Gao, N., Wang, Y., Tian, Y., Wu, J., Zhang, J., Zhu, J., Fan, D., and An, J. (2013). Inhibitory effect of glutathione on oxidative liver injury induced by dengue virus serotype 2 infections in mice. *PLoS One* 8, e55407.

Weaver, S.C., and Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* 9, 523-540.

Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5, 365-375.

Wu, N., Sarna, L.K., Siow, Y.L., and O, K. (2011). Regulation of hepatic cholesterol biosynthesis by berberine during hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300, R635-643.

Yu, I.M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., and Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 319, 1834-1837.

Zhang, D.W., Lagace, T.A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2007). Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* 282, 18602-18612.

Zhang, H., Shen, W.J., Cortez, Y., Kraemer, F.B., and Azhar, S. (2013). Nordihydroguaiaretic acid improves metabolic dysregulation and aberrant hepatic lipid metabolism in mice by both PPARalpha-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304, G72-86.

Zhang, W.Y., Gaynor, P.M., and Kruth, H.S. (1997). Aggregated low density lipoprotein induces and enters surface-connected compartments of human monocyte-macrophages. Uptake occurs independently of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 272, 31700-31706.

Zhu, Y.Z., Cao, M.M., Wang, W.B., Wang, W., Ren, H., Zhao, P., and Qi, Z.T. (2012). Association of heat-shock protein 70 with lipid rafts is required for Japanese encephalitis virus infection in Huh7 cells. *J Gen Virol* 93, 61-71.

Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R., and Freeman, M.R. (2005). Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 115, 959-968.

12. Anexo 1. Producción

12.1 Patente en proceso

