



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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**Papel de Aurora Cinasa B y Deacetilasas de Histona
durante el ciclo replicativo de DENV 2**

T E S I S

Que presenta

JOSÉ HUMBERTO PÉREZ OLAIS

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

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

Ciudad de México

Enero de 2018

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, UNIDAD ZACATENCO BAJO LA TUTORIA DE LA DRA. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ DE CÁCERES.

Durante el desarrollo del presente trabajo el estudiante contó con beca del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT).

No. De registro: 417968

No dejes que termine el día sin haber crecido un poco,
sin haber sido feliz, sin haber alimentado tus sueños.
No te dejes vencer por el desaliento.
No permitas que nadie te quite el derecho a expresarte, que es casi un deber.
No abandones las ansias de hacer de tu vida algo extraordinario.
No dejes de creer que las palabras
y las poesías, sí pueden cambiar el mundo.
Pase lo que pase nuestra esencia está intacta.
Somos seres llenos de pasión.
La vida es desierto y es oasis.
Nos derriba, nos lastima, nos enseña, nos convierte en protagonistas de nuestra
propia historia.
Aunque el viento sople en contra, la poderosa obra continúa:
Tú puedes aportar una estrofa.
No dejes nunca de soñar, porque sólo en sueños puede ser libre el Hombre.
No caigas en el peor de los errores: el silencio.
La mayoría vive en un silencio espantoso.
No te resignes, huye...
"Emito mis alaridos por los tejados
de este mundo", dice el poeta.
Valora la belleza de las cosas simples.
Se puede hacer bella poesía sobre pequeñas cosas,
No traiciones tus creencias.
Porque no podemos remar en contra de nosotros mismos:
Eso transforma la vida en un infierno.
Disfruta del pánico que te provoca
tener la vida por delante.
Vívela intensamente, sin mediocridad.
Piensa que en ti está el futuro
y encara la tarea con orgullo y sin miedo.
Aprende de quienes puedan enseñarte.
Las experiencias de quienes nos precedieron,
de nuestros "Poetas Muertos",
te ayudan a caminar por la vida.
La sociedad de hoy somos nosotros:
Los "Poetas Vivos".
**No permitas que la vida te pase a ti
sin que la vivas ...**

Carpe diem - Walt Whitman

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la **Dra. Rosa María del Ángel** por hacerme parte de su equipo de trabajo, escuchar, apoyar y dirigir el presente proyecto. Por compartir parte de su conocimiento y ayudarme a dar forma a mis pensamientos, pero sobre todo por su paciencia.

A mi madre **Carmen Olais** y a mis hermanos **Moisés y Ricardo**, que siempre han estado presentes a pesar de que nos encontremos lejos, del apoyo incondicional y desinteresado que me han demostrado.

A **Fernando Ruiz**, por estar siempre en presencia y a distancia. Por ese gran cariño que nos tenemos y por qué más que un amigo eres un hermano. *No hay ilusión más grande que la separación.*

A mi asesora la **Dra. Rosa Hernández Rivas**, por su crítica constructiva, sus observaciones precisas y sobre todo por sus buenos deseos para conmigo y el proyecto, una persona de la que aprendí demasiado.

A todos los amigos que conozco desde hace años y a aquellos que hice durante el desarrollo de este proyecto en el laboratorio, su amistad también ayudó a construir parte de esta tesis. Gracias **Salomé Cabrera, Cinthia Dionicio, Liliana Ramírez, Rebeca Basave, Esther Calderón, Patricia Bautista, Arianna Hurtado, Fidel Osuna, Noé Farfán, Luis Gonzales y Diego Soto.**

A mis Asesores, la Dras. **Lorena Gutiérrez y Sofía Alcaraz** así como al Dr. **Juan Ludert** por su apoyarme en el desarrollo de esta tesis y aportar en ella, tiempo, conocimiento y paciencia.

En general a todas personas que me apoyaron durante el desarrollo de este trabajo, que aportaron conocimiento, paciencia, palabras y momentos inolvidables ya que hicieron de este camino algo mucho más llevadero y provechoso.

Finalmente a mi **amigo...** obligado compañero, uno de los mejores y estrictos maestros que la vida me dio al hacernos uno solo.

Per aspera ad astra

DEDICATORIA

El conocimiento es un espejo, y por primera vez en mi vida
tenía permitido ver quién era, y en quién podría convertirme...
Cloud Atlas – David Mitchell

A todas las personas que contribuyeron en la realización de este trabajo, mis
amigos, compañeros y familia.

INDICE

Abstract	1
Resumen	2
1. Introducción.	3
1.1 Dengue: generalidades.	3
1.2 Características Genómicas de DENV.	4
1.3 Características Proteómicas de DENV.	5
1.3.1 Proteínas estructurales.	5
1.5 Proteínas no estructurales (NS).	7
2. Ciclo de replicación.	10
3. Epidemiología.	15
4. Patogénesis.	17
5. Respuesta inmune.	20
6. Modificaciones postraduccionales y acetilación de histonas.	24
7. Deacetilasas de histona (HDACs).	25
8. Fosforilación de histonas.	25
9. Papel de las cinasas en infecciones virales.	26
10. Cinasas durante la infección por DENV.	27
11. Aurora cinasas.	29
12. Aurora cinasa B.	30
13. Justificación.	36
14. Hipótesis.	37
15. Objetivos.	37
15.1 Objetivo general.	37
15.2 Objetivos particulares.	37
16. Material y métodos.	38
16.1 Cultivo celular y cepa viral.	38
16.2 Anticuerpos y fármacos.	38
16.3 Extracción y enriquecimiento de histonas con H ₂ SO ₄ .	38
16.4 Análisis de modificaciones postraduccionales de la histona H3.	39
16.5 Ensayos de metabolismo y viabilidad celular.	40

16.6 Ensayo de focos para titulación de virus.	41
16.7 Citometría de flujo para análisis de células infectadas por DENV.	42
16.8 Determinación del antígeno viral NS1.	43
16.9 Ensayos de inhibición sobre células Huh-7 y su efecto sobre el ciclo viral.	43
16. 10 Ensayos de luciferasa.	43
16.11 Ensayos de inmunofluorescencia.	43
16.12 Ensayos de western blot.	44
16.13 Construcciones de Aurora Cinasa B.	44
16.14 Ensayo de mutagénesis dirigida.	45
17. Resultados.	47
17.1 Análisis de la fosforilación y acetilación de la Histona H3 durante la infección por DENV 2 en células Huh-7.	47
17.2 Efecto del butirato de sodio sobre el metabolismo/viabilidad de las células Huh-7.	48
17.3 Ensayo de focos para análisis de la progenie viral durante el tratamiento con BuNa.	49
17.4 Ensayos de luciferasa en células tratadas con Butirato de sodio.	50
17.5 Ensayos de viabilidad a distintas concentración de ZM447439.	51
17.6 Inhibición de la actividad catalítica de AurKB durante el tratamiento con ZM447439.	52
17.7 Análisis la progenie viral durante el tratamiento con ZM447439.	54
17.8 Análisis de infección de células tratadas con ZM44743.	56
17.9 Alteración en la traducción de proteínas virales durante la inhibición de AurKB.	56
17.10 ZM447439 no altera la replicación del genoma viral utilizando el sistema de replicón de DENV en células Vero.	57
17.11 La inhibición de AurKB altera la integridad de los complejos de replicación.	59
17.12 La inhibición de AurKB modifica la localización de proteínas Estructurales.	61

17.13 ZM447439 modifica la localización de la proteína de la cápside.	63
17.14 Inmunomarcaje de los complejos de replicación para microscopía electrónica.	65
18. Discusión.	68
19. Conclusiones.	79
20. Perspectivas.	80
21. Presentaciones en congresos.	81
22. Referencias.	88

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Organización de la partícula viral (DENV).	3
Figura 2. Representación esquemática del genoma de DENV.	5
Figura 3. Ciclo de replicación de DENV.	11
Figura 4. Complejos de replicación de DENV.	13
Figura 5. Presencia y distribución de DENV en el mundo.	16
Figura 6. Casos de DENV en México en el periodo de 2000 a 2012.	17
Figura 7. Patogénesis durante la infección por DENV.	19
Figura 8. Potenciación dependiente de anticuerpo (ADE).	23
Tabla 1. Clasificación de Deacetilasas de histona (HDACS)	26
Figura 9. Complejo CPC (Chromosomal passenger complex).	29
Figura 10. Activación de AurKB. Cuando AurKB forma parte de CPC,	32
Figura 11. Fosforilación de CHMP4C por AurKB durante la citocinesis.	33
Tabla 2. Primers diseñados para el ensayo de mutagenesis dirigida.	46
Figura 12. Modificaciones postraduccionales en la histona H3.	47
Figura 13. Ensayos de Metabolismo/Viabilidad celular durante el tratamiento con BuNa.	48
Figura 14. Ensayo de focos del sobrenadante de células infectadas con DENV 2 y tratadas con BuNa.	49
Figura 15. Inhibición de la replicación de DENV por BuNa.	50
Figura 16. Ensayos de Metabolismo y Viabilidad celular durante el tratamiento con ZM447439.	52
Figura 17. Ensayos de la actividad inhibidora de ZM447439 sobre AurKB.	53
Figura 18. Análisis de la progenie viral durante la inhibición de AurKB.	54
Figura 19. El tratamiento con ZM447439 no modifica el porcentaje de células infectadas pero si la IMF.	55
Figura 20. La inhibición de AurKB no modifica la expresión de la proteasa viral NS3.	57
Figura 21. Secreción de la proteína viral NS1.	58
Figura 22. Ensayo de luciferasa para medir la replicación del genoma viral durante la inhibición de AurKB	58

Figura 23. Complejos de replicación teñidos con NS4A y dsRNA durante la inhibición de AurKB por 24 h.	60
Figura 24. Deslocalización de componentes de complejo de replicación durante inhibición de AurKB por 24 h.	61
Figura 25. Modificación de los complejos replicativos a las 48 h de inhibición de AurKB.	62
Figura 26. Distribución de la proteína E y NS3 en presencia de ZM447439 durante 24 h.	63
Figura 27. Distribución de la proteína E y NS3 durante la inhibición de AurKB por 24 h.	64
Figura 28. La proteína de la cápside modifica su localización durante el tratamiento por 24 h con ZM447439.	65
Figura 29. En presencia de ZM447439 la proteína de la cápside se localiza en el núcleo de las células infectadas.	66
Figura 30. Inmunomarcado de NS4A y dsRNA en microscopía electrónica.	67

ABSTRACT

Flaviviruses, such as Dengue (DENV), Zika, Yellow Fever, Japanese Encephalitis and West Nile are the principal representatives of the arboviruses. They are pathogens which cause high morbidity and mortality. The last estimation indicates that ~370 millions of people are infected by DENV per year and almost 90 million develop different clinic forms of the infection. The interaction between the viral and host proteins plays a complex network and elucidate the function and role of some of them during DENV replication could be useful to develop antiviral, therapeutic or prophylactic drugs. Previously, we observed a decrease in the phosphorylation of serine 10 and acetylation of lysine 9 of H3 histone during the DENV2 infection. Phosphorylation of serine 10 is controlled mainly by the Aurora Kinase B (AurKB) while the acetylation of lysine 9 is regulated by histone acetyltransferase and their deacetylation is made by Histone Deacetylases. In the present work, we analysed the role of AurKB and HDACs inhibition during DENV 2 infection of the Huh-7 cell line. To fulfill this aim we used the inhibitor, ZM447439 for AurKB and sodium butyrate for HDAC. Interestingly, when we inhibited AurKB an increase in the amount of infected cells was observed. In contrast, no alteration in the levels of viral protein NS3 and NS1 secretion or in genome replication was observed. At structural level, during the inhibition of AurKB the replicative complexes resident protein NS4A, and dsRNA showed a disperse location in the cell. Similar results have been reported using another Kinases inhibitors. By confocal microscopy an alteration in the co-localization of dsRNA and NS4A was observed. Moreover, the migration of the Capsid protein to nucleus was detected. Altogether these results, indicated that activity of AurKB is necessary for a correct morphogenesis of viral DENV particles. In the case of HDAC inhibition a decrease in the viral particle production and genome replication was detected which indicated that HDAC activity is necessary for DENV 2 replication. This work could be useful to identify new antiviral drug and allow us to know that typical nuclear proteins involved in the regulation of the cell cycle and in transcriptional activation can participate and play important roles in the replicative cycle of DENV.

RESUMEN

Los flavivirus como dengue (DENV), Zika (ZIKV), Fiebre amarilla (YFV), encefalitis japonesa (JEV) y del oeste del Nilo (WNV) son los principales representantes del grupo de los arbovirus. Estos patógenos causan una alta tasa de mortalidad y morbilidad. Estimaciones recientes indican que aproximadamente 370 millones de personas son infectadas por DENV al año y de estas, al menos 90 millones desarrollan la enfermedad en cualquiera de las formas clínicas de la infección. La interacción entre las proteínas virales y celulares forma una compleja red necesaria para la replicación viral, por cual analizar la función de algunas de estas interacciones durante el ciclo replicativo de DENV 2 podría ser útil para identificar nuevos blancos terapéuticos y el desarrollo de fármacos antivirales o profilácticos. En trabajos anteriores, observamos que la infección de células Huh-7 con DENV 2 induce una disminución en los niveles de fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (H3S10p) así como la acetilación de la lisina 9 de la misma histona. La marca H3S10p es regulada principalmente por la Aurora Cinasa B (AurKB) mientras que la deacetilación de los residuos mencionados es controlada por enzimas denominadas Deacetilasas de Histona (HDAC). En el presente trabajo se analiza el papel de AurKB y las HDACs durante la replicación de DENV 2 en la línea celular hepática Huh-7. Para llevar a cabo este objetivo se utilizó el inhibidor selectivo de AurKB ZM447439 mientras que para las HDACs se utilizó el Butirato de sodio (BuNa). Interesantemente, observamos que al inhibir la actividad cinasa de AurKB se induce un incremento en la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células infectadas. En contraste, la síntesis de proteínas virales como NS3 y NS1 o la replicación del genoma viral no se modificaban. Por microscopía confocal se observó alteración en la integridad de los complejos de replicación utilizando anticuerpos contra la proteína NS4A y el RNA de doble cadena (dsRNA). Por otra parte, también se observó que durante la inhibición de AurKB la proteína de la cápside localizaba en núcleo. Los resultados mostrados en el presente trabajo sugieren que la actividad cinasa de AurKB es necesaria para la correcta formación de los complejos de replicación así como para el proceso de morfogénesis/ ensamble viral. En el caso de las HDACs, se observó que el butirato de sodio disminuye la producción de partículas virales e interfiriendo en la replicación y traducción del genoma viral. El presente trabajo sugiere que proteínas nucleares relacionadas al ciclo celular y activación transcripcional, participan en el ciclo replicativo de DENV 2 y que podrían plantearse como nuevos blancos terapéuticos para la infección por DENV.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Dengue: Generalidades.

El Virus Dengue (DENV) es el agente etiológico de la Fiebre dengue (FD) y el Dengue severo (DS), Dengue pertenece al género *Flavivirus*, el cual, es el más amplio en la familia *Flaviviridae* con 53 especies diferentes descritas (1). Dentro del grupo de los arbovirus, DENV tiene la mayor prevalencia, por lo tanto es considerado como el de mayor importancia a nivel clínico y es endémico de la mayoría de las zonas habitadas del planeta. En los últimos 50 años la incidencia de la infección ha aumentado aproximadamente 30 veces por lo cual es considerado un virus emergente a nivel mundial (2).

El término “Dengue” engloba actualmente cuatro virus relacionados genética y antigénicamente denominados DENV serotipo 1, 2, 3 y 4 que a su vez agrupan entre 3 y 5 genotipos (3, 4). Dengue es transmitido por mosquitos del genero *Aedes* (ampliamente distribuidos en las zonas tropicales y subtropicales del planeta), principalmente *Aedes aegypti* y de manera menos efectiva por *Aedes albopictus*, el cual recientemente fue reportado como responsable de la diseminación de la infección en los últimos años (5). Por otra parte, en las zonas en donde se encuentran los mosquitos vectores también están circulando desde uno hasta los 4 serotipos virales, creando regiones endémicas e hiperendémicas (6).

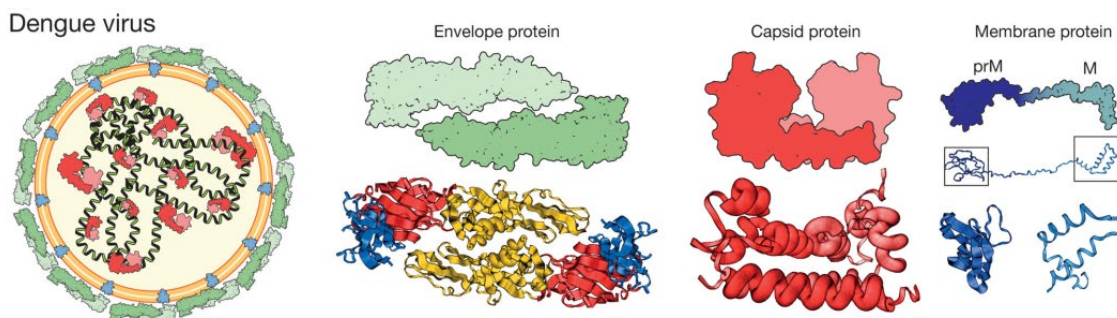


Figura 1. Organización de la partícula viral (DENV). Dengue es un virus envuelto de aproximadamente 50 nm, en la cara externa de la bicapa lipídica se encuentran ancladas 180 copias de la proteína E y M mientras que en la cara interna se encuentra anclada a la membrana copias de la proteína de la cápside (C) que a su vez se unen al genoma viral formando la nucleocápside. (Modificado de *Da poian Andrea T. et al, 2015*).

1.2 Características Genómicas de DENV

Estructuralmente, DENV es un virus de 50 nm de diámetro, de geometría icosaédrica y envuelto. En la cara interna de la membrana se encuentran ancladas múltiples copias de la proteína C unida al genoma viral formando la nucleocapside, mientras que en la cara externa existen ancladas 180 copias de la proteína E y M (**Figura 1**)(7, 8).

El genoma de DENV consiste en una molécula de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 11 Kb con un solo marco de lectura abierta (ORF) que codifica para una poliproteína de ~ 3361 a.a que bajo procesamiento proteolítico co y post-traducciona (por la proteasa viral NS3 y proteasas de tipo furina respectivamente) da lugar a 10 proteínas; 3 estructurales (Cápside [C], Envoltura [E] y Membrana [prM/M]) y 7 no estructurales (NH₃- NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 - COOH) (9, 10).

El genoma viral esta flanqueado por regiones 5' y 3' UTR. La 5' UTR es la más pequeña con un tamaño aproximado de 100 nucleótidos (nt) y contiene una estructura de Cap tipo I, la región 3' UTR con cerca de 400 nt carece de una secuencia poli A (Tracto de poliadeninas) (11).

Ambas UTR's contienen elementos de tallo y burbuja, conocidos como "*Stem loop*", los cuales están involucradas en procesos de circularización del genoma y de evasión de la respuesta inmune por un mecanismo el cual involucra la producción de RNA subgenómico. Este mecanismo también está presente en otros Flavivirus como West Nile y el virus de la encefalitis japonesa (**Figura 2**)(12-15).

Aparentemente, las estructuras en *stem loops* de la región 3' (3'SL) son esenciales para el proceso de replicación de DENV así como de otros flavivirus, además de lo anterior en esta misma región se encuentra la denominada secuencia de circularización (ciclyzation sequence [CS]) que está involucrada en la interacción de tipo RNA-RNA con la región 5' UTR y que tiene como consecuencia la circularización del genoma, un proceso necesario la síntesis de RNA pero dispensable para la traducción viral (16, 17).

Por su parte, modificaciones en el 3' UTR (duplicaciones) impactan en la rápida adaptación del virus al huésped vertebrado e invertebrado y al switch entre ambos sin afectar negativamente el *fitness* viral, de lo anterior se ha concluido que el genoma de DENV es una molécula altamente dinámica (18)

1.3 CARACTERÍSTICAS PROTEÓMICAS DE DENV.

1.3.1 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES.

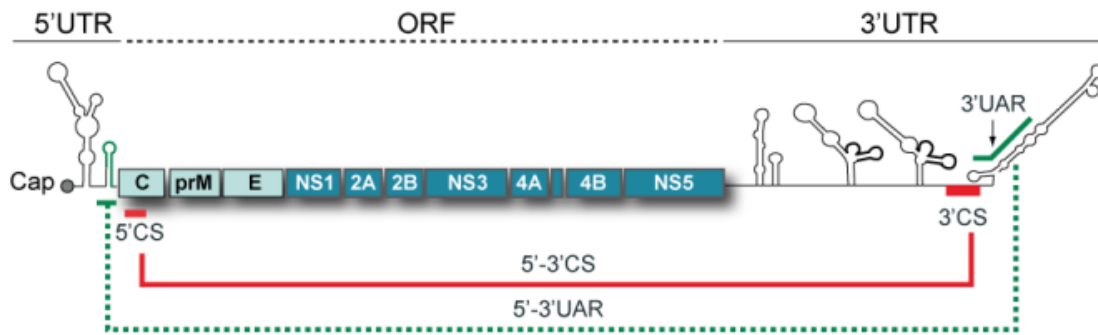


Figura 2. Representación esquemática del genoma de DENV. El genoma de DENV tiene un tamaño aproximado de 11 Kb, y durante su traducción da lugar a 10 proteínas. En los extremos existen regiones UTR; el extremo 5' que contiene una estructura de tipo Cap y 3' que carece de un tracto poli A. Estas regiones permiten el ciclamiento del genoma beneficiando la replicación o traducción del genoma viral, además son importantes para la interacción del genoma con proteínas virales y celulares. (Modificado de *Gamarnik A. et al 2011*).

Como se mencionó anteriormente, del genoma de DENV se generan 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales, cada una de ellas tendrá una o varias funciones dentro del ciclo de replicación viral.

Por ejemplo, la proteína de la cápside (C) tiene un tamaño aproximado de 17 kDa, es de naturaleza hidrófoba y de carga básica (26% de residuos básicos, lo cual la incluye dentro del grupo de las proteínas supercargadas) aunque dentro de su estructura contiene regiones ácidas, ambas características permiten a la proteína formar homodímeros y a través de esto se puede unir tanto al genoma viral como a membranas lipídicas(19).

Entre de las funciones que lleva a cabo la proteína de la cápside, está la protección del genoma y participación en los procesos de morfogénesis y encapsidación viral.

Además de componentes virales, la cápside puede interactuar con proteínas y/o estructuras celulares con diversas funciones dentro de la célula que van desde el empaquetamiento genómico, apoptosis, metabolismo de lípidos, etc., esto con el objetivo de favorecer la replicación viral (20, 21).

Entre las proteínas que se han descrito como blanco para la cápside encontramos a la Nucleolina, DAXX, histonas del “core” nucleosomal (H2A, H2B, H3 y H4), además de lipid droplets y lipoproteínas de baja densidad (LDLs)(20-24).

La glicoproteína E o de envoltura pesa aproximadamente entre 53 y 55 kDa dependiendo del serotipo viral. Este componente viral es el encargado de llevar a cabo el reconocimiento de los receptores y/o correceptores virales en la célula huésped, además de que media la fusión de la membrana viral con la membrana del endosomal.

Su ectodominio contiene 3 dominios en donde el dominio I (DI) está posicionado estructuralmente entre el dominio II (DII- Dominio de homodimerización que contiene un péptido de fusión) y el dominio III de tipo inmunoglobulina que es responsable de la unión del virus a la membrana de la célula huésped(25).

La proteína E sufre una serie de cambios conformacionales debido a la temperatura (26), pero los cambios más notables dependen directamente del pH en el que se encuentre, a un pH alcalino la proteína adquiere una conformación dimérica mientras que a uno ácido puede formar trímeros. Debido a que la proteína se encuentra en la superficie del virus, es el principal blanco del sistema inmune y por lo tanto es capaz de inducir una fuerte respuesta inmune a base tanto de anticuerpos neutralizantes como no neutralizantes contra diferentes epitopos de la proteína (10, 25, 27).

La proteína de membrana (M) es un muy pequeña, cuenta con aproximadamente 75 aminoácidos y un peso de 9 kDa, se encuentra anclada a la membrana viral través de hélices transmembranales y forma estructuras homodiméricas con la proteína E en la superficie viral. Entre las funciones no estructurales de esta proteína se cree que puede inducir apoptosis de manera

dependiente de su localización, la cual puede ser en el retículo endoplásmico (RE) o de manera extracelular(28).

Recientemente se reportó que la proteína M (al igual que la proteína E) es esencial para la entrada de DENV a la célula, interacciona con Claudina 1 en la célula huésped (29). Finalmente, a pesar de que la proteína M tiene características similares a virioporinas no se ha encontrado evidencia de que funcione como tal en un modelo con Oocitos de *Xenopus* (30).

1.5 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES (NS).

NS1 consta de 352 aminoácidos y un peso de ~ 46-55 kDa lo cual depende de su estado de glicosilación. Esta proteína puede adquirir conformaciones de dímero, trímero y hexámero y se puede encontrar localizada en compartimentos vesiculares, superficie celular y secretada de manera hexaédrica como lipopartícula. Es precisamente la presencia de la forma secretada de NS1 en el suero de pacientes que se utiliza comúnmente como método diagnóstico(31). En el caso de células de mosquito la secreción de NS1 se lleva a cabo por la vía no clásica dependiente de claveolina 1(32).

Se ha reportado que los anticuerpos producidos contra la proteína NS1 tienen reacción cruzada con proteínas del huésped como integrinas/adhesinas, componentes de la matriz extracelular, factores sanguíneos, etc. Debido a que algunos componentes del huésped que regulan la homeostasis vascular comparten epitopos con NS1 se ha involucrado directamente con alteraciones en el sistema vascular como lo es la hiperpermeabilidad y fuga vascular sistémica(33, 34). Recientemente, se demostró que NS1 altera el glicocáliz endotelial a través de la degradación del ácido sialico y la liberación de proteoglicanos de heparan sulfato en células de endotelio microvascular pulmonar humano debido a que induce la expresión de sialidasas y heparanasas teniendo como resultado la disfunción endotelial y la hiperpermeabilidad vascular (35).

Además de alterar la permeabilidad vascular, NS1 incrementa la producción de interleucina 10, 6 y TNF- α a través de la activación de TLR 2, 4 y 6, aunque esto último es contradictorio entre los artículos que lo reportan (36-38). Por otra parte se

conoce que la presencia de NS1 sobre células dendríticas derivadas de monocitos induce la producción de citocinas pro-inflamatorias(39).

Se cree que la secreción de NS1 ayuda al virus a evadir la respuesta inmune a través de diversos mecanismos como la inhibición de la polimerización de C9, proteína que es parte del sistema de complemento(40).

La proteína NS2A (de ~ 22 kDa) es de naturaleza altamente hidrofóbica y se asocia con la membrana del RE. La proteína consta de tres regiones: I) la región N-terminal (0-68 a.a.) que se encuentran localizadas en el lumen del RE y que además contiene una secuencia que interacciona con el RE sin atravesar la membrana, II) la región entre el a.a. 69 y 209 que consta de 5 segmentos transmembranales y III) el tallo C-terminal que se encuentra de cara al citoplasma (41). Dentro de las funciones que se han descrito para la proteína esta la inhibición de la respuesta a interferón α/β (42). En cuanto a la replicación viral se sabe que NS2A es importante para los procesos de síntesis del genoma y ensamble viral, y se demostró que la proteína es importante para llevar a cabo el rearrreglo de las membranas de RE (43-45). Finalmente, se ha descrito que NS2A puede actuar como una virioporina ya que induce un aumento en la permeabilidad de membranas liposomales y se ha observado que el extremo N-terminal de NS2A parece ser responsable del efecto citopático en células HEK 293 (46, 47).

La proteína NS2B funciona como cofactor de la proteína viral NS3, su presencia es necesaria para el procesamiento proteolítico de la fracción NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5(48, 49).

NS2B trabaja íntimamente con NS3 para evadir la respuesta inmune del huésped mediada por interferones de tipo I. En las células infectadas, se han descrito dos vías por las cuales es llevada a cabo esta función; I) a través de la interacción directa con IKK ϵ cubriendo el dominio cinasa de la proteína e impidiendo la fosforilación y translocación a núcleo de IRF3 (50) II) por inhibir la activación de la vía sensora cGAS/cGAMP/STING (stimulator of the interferon gene) (51). En el caso de este último componente, se demostró en células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) que NS2B/3 lleva a cabo la degradación de la proteína (52).

NS2B también participa en la formación de los complejos de replicación viral, invaginaciones del RE en donde se lleva a cabo la replicación, ensamble y morfogénesis viral.

Recientemente se describió que la proteína NS2B por si sola es capaz de alterar la permeabilidad de la membrana celular en eritrocitos y en modelos bacterianos, proponiendo que podría actuar como una virioporina, sin embargo, los modelos utilizados parecieran no ser los adecuados(53).

Como se mencionó anteriormente, NS2B es el cofactor para la serin-proteasa viral NS3 (54, 55) la cual tiene un peso aproximado de 69 kDa y comparte ~ el 77% de identidad en secuencia de aminoácidos entre los serotipos de DENV (56) y entre el 50 y 70% con la NS3 de otros flavivirus (57). Además de la función de NS2B como cofactor, esta “ancla” a NS3 a la membrana del RE a través de sus dominios transmembranales.

NS3 se considera una proteína multifuncional ya que además de la actividad de proteasa lleva a cabo funciones de ATPasa (Adenosin trifosfatasa) y RTPasa (trifosfatasa RNA 5') esta última función está involucrada en los primeros pasos para la formación de la estructura cap en el 5' del genoma viral (58). El dominio proteasa se encuentra en el extremo amino terminal, en la misma región que se asocia con el NS2B, mientras que en el extremo carboxilo encontramos los dominios de RNA helicasa, RTPasa y NTPasa (el cual requiere un ion de metal divalente) (54, 59).

Se ha observado que en otros flavivirus como YFV (Yellow Fever Virus) NS3 participa en el proceso de ensamble viral (60).

NS5 es la proteína más conservada entre los diferentes serotipos del virus (67% de identidad entre ellos), pesa aproximadamente 104 kDa y está compuesta por 900 aminoácidos, con dos actividades importantes: RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y metiltransferasa (10).

El dominio RdRp de NS5 tiene una conformación canónica de mano derecha con dedos y dominios de pulgar. Para su función catalítica requiere de dos iones, coordinados por residuos de ácido aspártico, altamente conservados en su

estructura. NS5 contiene además una secuencia de importación nuclear (entre los residuos 320 y 405), dominios de unión α/β importina y de interacción con NS3 (27).

El dominio de metiltransferasa permite la adición de la estructura Cap tipo I presente en el extremo 5' del RNA viral y recientemente se ha descrito una nueva actividad catalítica, la 2'-O-Metilación específica de poli A, lo cual se ha observado que regula la traducción y la replicación viral, así como la evasión de la respuesta inmune a través del escape de los mecanismos de supresión mediado por IFIT (*genes relacionados con la estimulación de las vía de los INF-I*) (27, 61).

Aparentemente, la localización nuclear de NS5 durante el ciclo de replicación viral está regulada por el extremo carboxilo terminal de la proteína y varía entre los 4 serotipos de DENV (62), siendo DENV 2 y 4 los que acumulan la mayor cantidad de esta proteína en el núcleo en comparación con DENV 1 y 3. Aunque la localización nuclear no se considera estrictamente necesaria para la replicación viral se cree que puede tener un papel auxiliar en el ciclo replicativo viral (63, 64).

NS4A y NS4B pesan 16 kDa y 27 kDa respectivamente y se cree que inducen cambios en las membranas celulares para favorecer la replicación viral. Se sabe que NS4B está implicada en la replicación cuando interacciona con NS3. Otras proteínas como NS2 y NS4A/B están involucradas en la formación de los complejos de replicación aunque no se conoce de manera clara la función que tienen en estos sitios.

2. CICLO DE REPLICACIÓN

El ciclo de replicación de DENV inicia cuando un mosquito hembra infectada se alimenta de una persona, inoculando durante la picadura virus dentro de la dermis. Se han descrito varias células que funcionan como blancos iniciales de la infección por DENV, entre las que encontramos a los queratinocitos y células dendríticas (65-68).

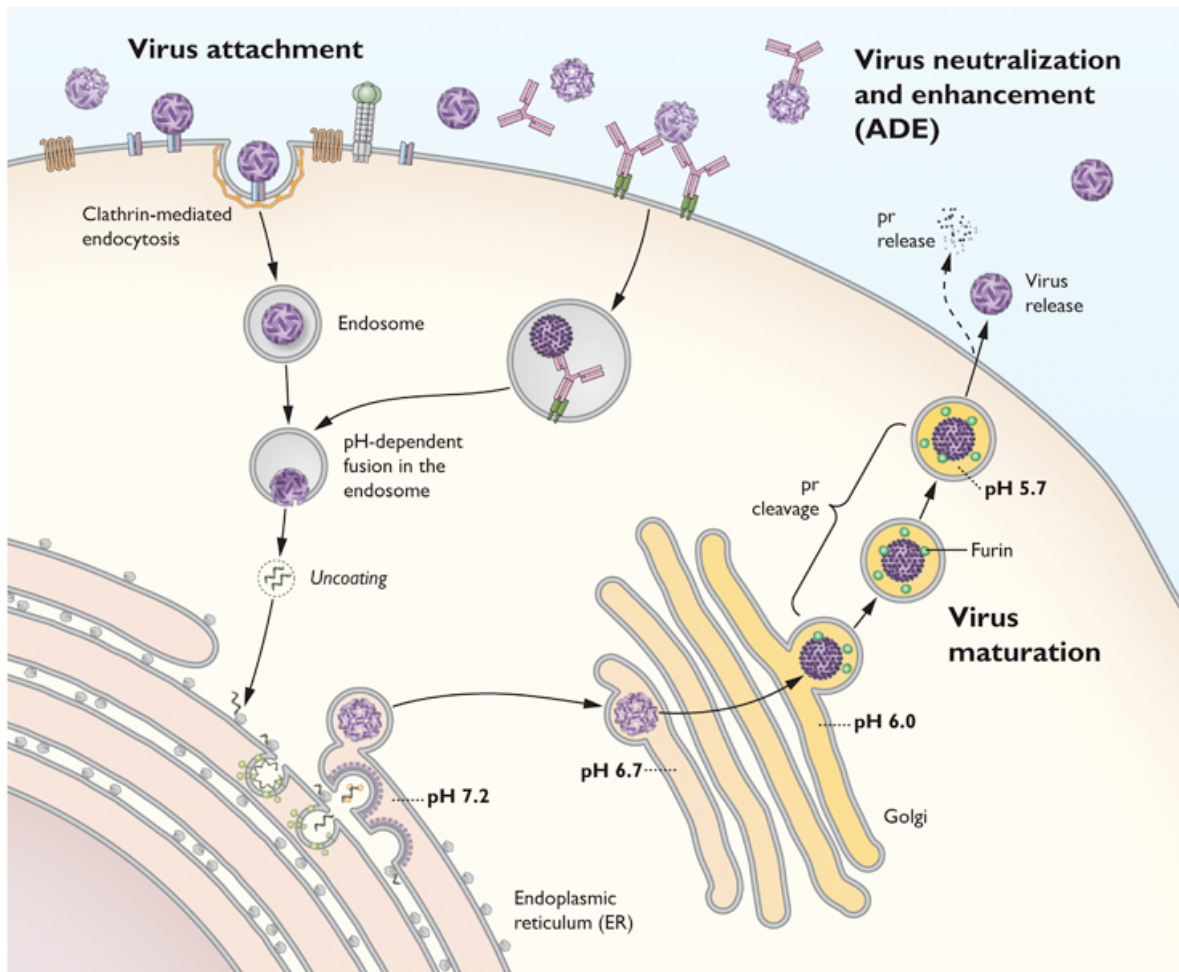


Figura 3. Ciclo de replicación de DENV. El ciclo replicativo de DENV inicia con la unión de este a los receptores y/o correceptores celulares, después se lleva a cabo un proceso de endocitosis mediada por receptor, durante el proceso de acidificación del Endosoma la proteína E sufre cambios conformacionales y permite la liberación de la nucleocapside dentro del citoplasma celular. El RNA viral produce las proteínas virales que lo replicaran en compartimentos del retículo llamados complejos de replicación en donde se lleva a cabo el proceso de Ensamble/Morfogénesis viral. El virion inmaduro es transportado por las membranas del Golgi para su procesamiento por la proteasa furina y finalmente sale al exterior por un proceso de exocitosis. (Tomado de *Ted Pierson, NIAID, 2012.*)

El primer paso en el ciclo replicativo del virus es la unión de éste a la superficie celular a través de la glicoproteína E (69). Debido al amplio número de células permisivas a la infección por DENV se podría pensar que el receptor es una molécula ubicua. Hasta ahora, se han identificado diversas proteínas y moléculas que tienen interacción con el virus y están involucradas en la fusión y anclaje a la célula como la HSP70, HSP90, R80, R67, CD14, DC-SING, GRP78, Heparán

sulfato, neolactotetraosilceramida, receptores de tipo lectina y el receptor de alta afinidad para laminina (**Figura 3**) (70, 71)".

"El virus entra a la célula a través de endocitosis mediada por clatrina usando en algunos casos complejos de clatrina preformados lo cual implica un rodamiento del virus a través de varios receptores/correceptores hasta llegar a estos complejos, que bajo la influencia de dinamina permiten la formación de la vesícula cubierta por clatrina".

"Una vez libre de clatrina, la vesícula libera al virus dentro de endosomas tempranos, los cuales maduran hasta endosomas tardíos en donde el pH se acidifica provocando cambios conformacionales en la proteína E, principalmente debidos a la protonación de histidinas que actúan como sensores de pH en los residuos en las posiciones 146 y 323 de la proteína. El cambio conformacional provoca la disociación de los homodímeros de E en monómeros lo que expone a la región hidrofóbica del péptido de fusión del dominio DII a la membrana blanco. Después, se lleva a cabo la inserción de la región de fusión de DII en la membrana endosomal. Tres proteínas E con el dominio de fusión insertado en la membrana interaccionan entre si y forman un complejo trimérico a través de DII y DI, en donde esta última, estabiliza el trímero (70, 72)."

"En seguida DII cambia y se dobla hacia sí misma, lo que fuerza a las membranas blanco y viral a acercarse, iniciando así la formación de un "poro de fusión" en donde las membranas se fusionarán y por donde más tarde la nucleocápside será liberada al citosol. Recientemente, se ha observado que existen serotipos y cepas virales capaces de utilizar vías alternativas independientes de clatrina, caveolina y balsas lipídicas(70, 73)."

"Una vez liberada la cápside en el citoplasma celular, el siguiente paso es la liberación del RNA viral. El RNA en el citoplasma tendrá al menos tres funciones: a) Como mRNA para la síntesis de proteínas, b) molde para la síntesis de RNA y c) como sustrato para la encapsidación. Todos estos procesos deben de ser estricta y temporalmente regulados para asegurar la replicación viral y la eficiencia de los mismos."

“La función de mRNA viral es la de codificar una sola poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos (74), la cual como se describió anteriormente será proteolíticamente procesada para dar lugar a cada una de las proteínas, tanto estructurales como no estructurales. La traducción de la poliproteína ocurre en el retículo endoplasmático, donde se adquiere una distribución espacial a través de la pared reticular; prM y E se encuentran en el lumen del retículo, C, NS3 Y NS5 se localizan en el lado citoplasmático y NS2A/B junto a NS4A/B permanecen predominantemente como proteínas transmembranales (27).”

“Al Finalizar este paso de la replicación, se inicia una hipertrofia de las membranas intracelulares lo cual crea estructuras conocidas como “complejos membranales” con la consecuente asociación del RNA viral dentro de paquetes vesiculares llamados “complejos de replicación”. En el proceso de replicación se crea RNA de polaridad negativa a partir de un molde de RNA de polaridad positiva. En este paso la actividad catalítica necesaria para la polimerización la lleva a cabo NS5 en asociación con NS3 que tiene actividad de Helicasa/proteasa.”

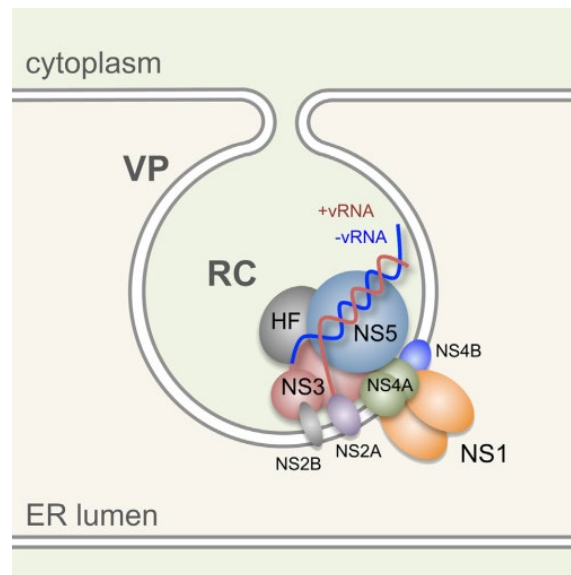


Figura 4. Complejos de replicación de DENV. Durante el ciclo de replicación de DENV, a través de la actividad de proteínas virales como NS4A, se lleva a cabo un rearrreglo en las membranas del retículo endoplásmico hasta formar invaginaciones llamados complejos de replicación, en estas estructuras encontramos todos los elementos tanto virales como celulares necesarios para la replicación del genoma y el proceso de replicación/ensamble viral (Tomado de *Muller and Young 2013*).

“La formación de complejos de replicación por parte de las proteínas virales involucra la modulación y explotación de vías celulares para favorecer la replicación y liberación del virus en las células infectadas. Se han identificado más de cien factores celulares involucrados en la replicación, traducción, ensamble y liberación del virus (**Figura 4**).”

“Una de las vías que son alteradas por DENV es el sistema ubiquitin-proteosoma (SUP), lo cual le permite de primera instancia evadir la respuesta inmune al degradar factores antivirales como INF-I (INF- α/β) y STAT-2. Una función cuyo mecanismo aun es desconocido involucra a la vía SUP en la entrada, traducción y/o replicación del virus (**75**).”

“Por otra parte, las células infectadas por el virus inician la acumulación de “gotas lipídicas” (LD, *Lipid droplets*) que son almacenes de lípidos del retículo endoplasmático. En las LD se almacena la proteína de la cápside y de esta manera participan de manera activa en el proceso de ensamblaje viral sin embargo no se ha demostrado la asociación real de las LD con RNA viral. La proteína NS4A induce la autofagia de estas a través del sistema autofagosomal provocando así la movilización de triglicéridos y la obtención de energía extra en forma de ATP vía β oxidación (76). De la misma forma, la infección viral induce un incremento en la cantidad de colesterol total a través de dos mecanismos diferentes, I) un incremento en la captación de colesterol mediado por un aumento del receptor LDL en la superficie celular y II) un aumento en la síntesis mediado por la desfosforilación de la HMG CoA reductasa, enzima limitante en la síntesis de colesterol (77).”

“Como contraparte el dominio de proteasa de la NS3 interacciona con la sintasa de ácido grasos (FASN) e inicia su reclutamiento a sitios de replicación viral en donde se observa un aumento en la biosíntesis lipídica lo cual puede favorecer la expansión de las membranas de los complejos de replicación (75). Así el virus por una parte promueve la autofagia de almacenes lipídicos y la formación de nuevas membranas evitando de esta manera un estrés excesivo en el retículo endoplasmático, lo cual podría provocar la muerte celular.”

“El rearrreglo de la membrana del retículo con la subsecuente formación de vesículas se induce a través del efecto de NS4A y demás factores virales y/o celulares. Estas vesículas se conectan con el citosol mediante un poro que presumiblemente sirve como sitio de salida para el RNA de la progenie viral. “

“Los viriones inmaduros que salen del RE son transportados a través de la vía secretora con el sucesivo paso por las cisternas del Golgi, en donde bajo la acción proteolítica de la furina y el cambio de pH el virus adquiere capacidad infectiva debido al rearrreglo de las proteínas M y E, dándole a esta última la capacidad de unión a receptores celulares. La furina ejerce su actividad proteolítica sobre prM, dando lugar a la formación de dos péptidos: el pr y el M (25). De esta manera las partículas virales siguen su curso a través de la vía secretora y salen de la célula. Ahora bien, el procesamiento llevado a cabo por la furina no siempre es exitoso, por lo cual son liberados virus maduros e inmaduros (72). El péptido pr se cree que funciona como un péptido que protege el dominio II de la proteína E, evitando así la unión prematura del virus con alguna membrana blanca (75).”

3. EPIDEMIOLOGÍA

Se estima que el ancestro de DENV surgió hace aproximadamente 1000 años, en un ciclo de replicación selvático en primates no humanos, mientras que su transmisión a humanos es más reciente (apenas hace unos cientos de años) (78-80).

Actualmente se encuentran 4 serotipos establecidos aunque recientemente en 2013 se detectó un serotipo distinto en un granjero de Malasia el cual fue denominado DENV 5, que a diferencia de los otros cuatro solo sigue un ciclo selvático (81).

Como se mencionó anteriormente *Aedes aegypti* y *A. albopictus* son los principales vectores de DENV, se estima que anualmente alrededor de 390 millones de personas son infectadas con el virus y de estas aproximadamente 96 millones desarrollan la enfermedad en cualquiera de sus formas clínicas (82). Por otra parte

la OMS en 2009 calculaba que la mitad de la población mundial (3.5 mil millones de personas) está en riesgo de contraer la infección principalmente aquellos que habitan en zonas tropicales y subtropicales del planeta (**Figura 5**) (2).

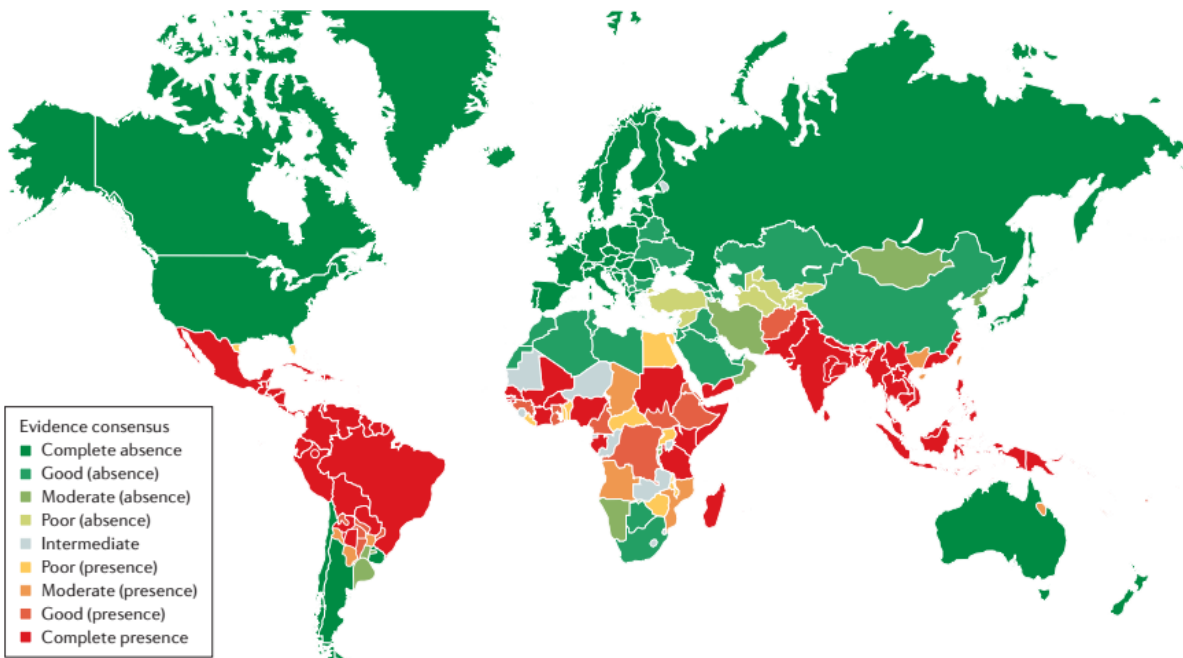


Figura 5. Presencia y distribución de DENV en el mundo. DENV se encuentra presente principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del planeta en donde se estima que habita la mitad de la población mundial. En el mapa, en rojo se encuentran los principales países afectados y en verde aquellos en donde no existe presencia del virus o no se ha reportado de manera endémica (Tomado de *Halstead S.B. et al 2016*).

En el continente Americano, la primera epidemia registrada ocurrió en Cuba en 1981 y desde entonces se considera la infección emergente más importante en el continente. En el caso de México, después de una extensiva campaña para control del vector en 1957 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) declaró a DENV erradicado del país lo cual duro únicamente dos décadas hasta la reaparición del virus en 1978 (83, 84).

DENV 1 fue el primer serotipo detectado en México, años más tarde fueron el serotipo 2 y 4 y finalmente en 1995 el serotipo 3. La aparición de este último

coincidió con los primeros casos de dengue hemorrágico (dengue severo) en México.

A nivel nacional se ha reportado la presencia del virus ya sea un serotipo o la co-circulación de 2 o más en al menos 29 estados del país que en conjunto concentran a una población aproximada de 50 millones de personas. El perfil de infección de DENV ha mostrado un comportamiento irregular con incrementos y disminuciones entre cada año (83).

En el periodo de 2000-2012, en el territorio mexicano se reportaron 502 804 casos confirmados de Dengue (fiebre dengue) y 75 000 casos de Dengue hemorrágico (Dengue severo) afectando a todos los grupos etarios y siendo los estados más afectados en su mayoría costeros (Veracruz, Guerrero, Jalisco, Quintana Roo, Yucatán) (**Figura 6**) (85).

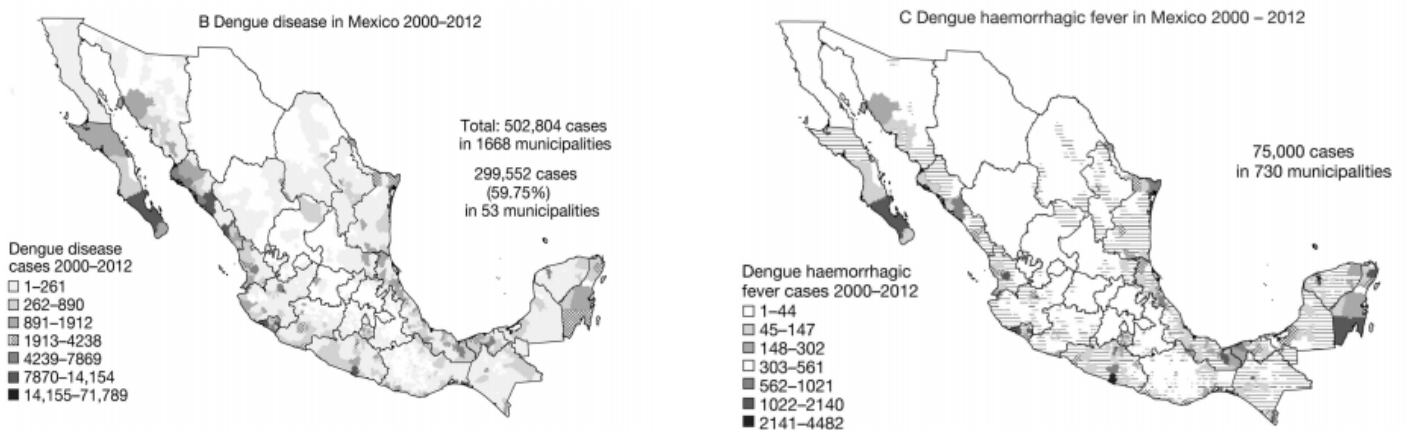


Figura 6. Casos de DENV en México en el periodo de 2000 a 2012. Durante el periodo de tiempo del año 2000 al 2012 se registraron 502 804 casos de fiebre dengue y 75 000 casos de dengue severo, los principales estados afectados fueron Veracruz, Guerrero, Jalisco, Quintana Roo y Yucatán. (Tomado de *Elsa Sarti et al, 2014*).

4. PATOGÉNESIS

“La enfermedad causada por DENV puede generar dos clases de síntomas, la FD y el dengue severo. Entre el 50% a 90% de los pacientes son asintomáticos, sin embargo, otros presentan FD la cual es un proceso patológico febril autolimitado. El dengue severo, en contraste, tiene como principal característica el aumento en

la permeabilidad vascular sin daño en la morfología del endotelio capilar, lo cual puede conducir a un Shock hipovolémico y a la muerte (86).

Después de un periodo de incubación de entre tres y siete días aparecen repentinamente los síntomas seguido por un periodo de tres fases: 1) fase febril, 2) fase crítica y una 3) fase de recuperación espontanea.

La fase febril se caracteriza por una fiebre igual o mayor a 38.5 °C la cual está acompañada de dolor de cabeza y abdominal, vómito, mialgia y en algunas ocasiones “rash” macular. Se observan pequeñas manifestaciones hemorrágicas reflejadas en petequias y los análisis de laboratorio arrojan trombocitopenia y leucopenia de media a moderada y aumento en los niveles de aminotransferasas hepáticas. La fase dura de 3 a 7 días después de lo cual, dependiendo de diversos factores, el paciente puede recuperarse sin mayores complicaciones. Si el paciente se recupera en esta fase de forma exitosa, entonces el caso corresponde a una fiebre clásica por dengue (5, 10).

Después de 4 a 7 días en que ha cesado la fase febril inicia la fase crítica la cual sufren una pequeña proporción de pacientes siendo más frecuente en niños y adultos jóvenes. La fase se caracteriza por el inicio de un síndrome de fuga vascular sistémica, los resultados de laboratorio evidencian un proceso de hemoconcentración, hipoproteinemia, efusión pleural y ascitis.

Es en esta fase, donde el organismo inicia un proceso compensatorio para equilibrar la homeostasis del flujo sanguíneo a órganos críticos, hay pérdida de volumen plasmático con la subsecuente disminución de la presión cardiaca, esto debido a que la permeabilidad vascular ha aumentado. Si la presión disminuye más allá de los 20 mm Hg hay signos de colapso vascular y es entonces cuando es evidente que el paciente ha desarrollado el síndrome de shock por dengue, el cual de no ser tratado adecuadamente puede ocasionar la muerte.

Los síntomas previos al inicio de la fase crítica incluyen vómito persistente, incremento en el dolor abdominal, tendencia a desarrollar hepatomegalia, hemoconcentración, rápida disminución en el conteo plaquetario ($20 \times 10^9/L$) y un

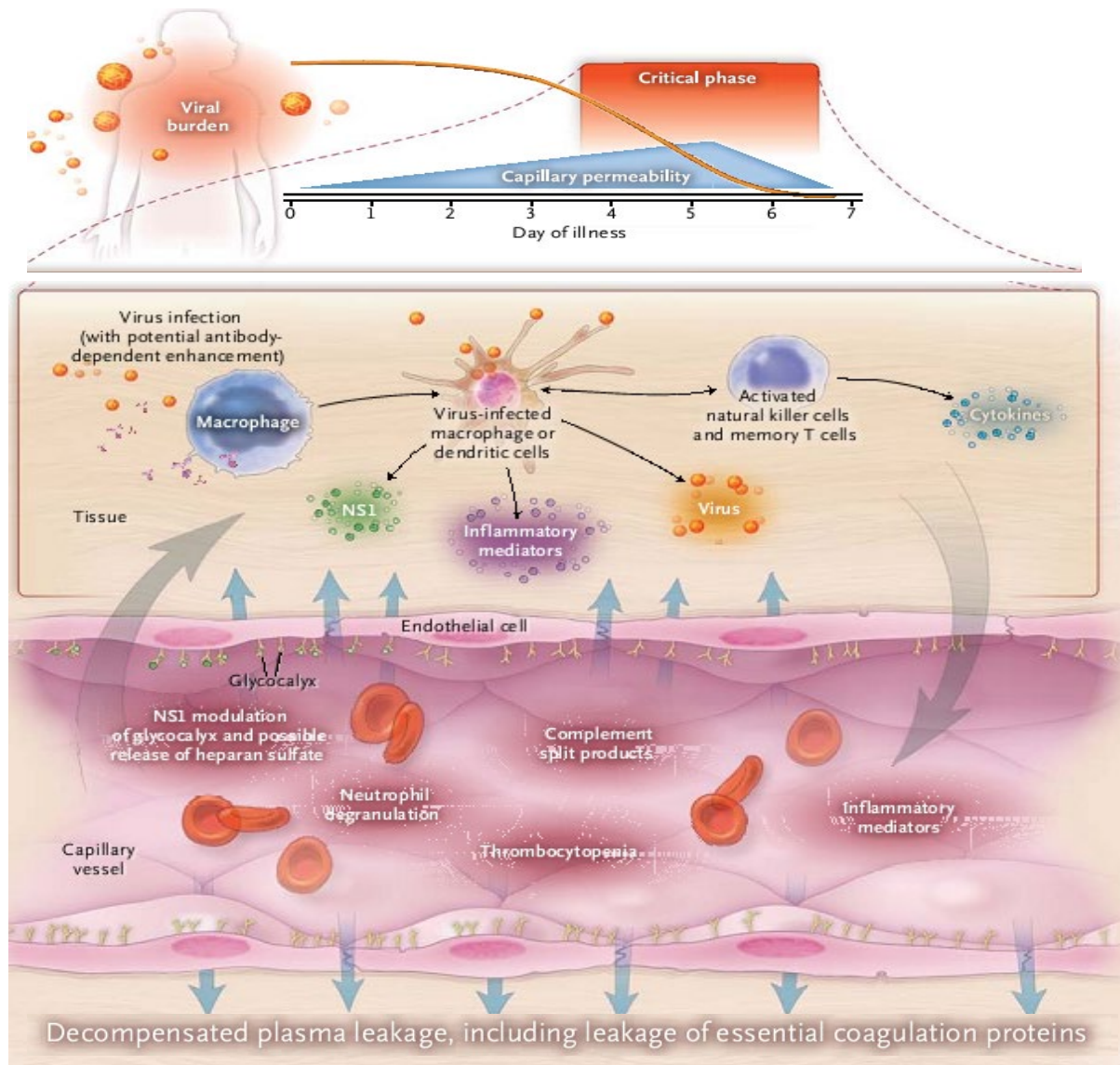


Figura 7. Patogénesis durante la infección por DENV. Durante la infección por DENV se produce la activación de células de la respuesta inmune como macrófagos, células dendríticas, células T y Natural Killer. Estas producen citocinas y en el caso de los cuadros graves de la infección se induce una tormenta de citocinas que tienen como consecuencias aumento en la permeabilidad vascular y hemorragias en mucosas. (Modificado de *Simmons P. et al 2012*)

comportamiento de letargo o agitación. Las manifestaciones hemorrágicas son comunes en esta fase pudiendo presentarse en piel y mucosas (ya sea vaginal, gastrointestinal o ambos). También existe una fuerte evidencia de aumento en la permeabilidad vascular con escape de fluidos intravasculares a espacios

intersticiales, además de que en casos más graves y complicados de la enfermedad pueden existir coagulopatías derivadas de la trombocitopenia (87).

Si existe una respuesta favorable por parte del paciente, inicia una fase de recuperación. Existen otras manifestaciones más graves pero infrecuentes, como la falla hepática, miocarditis y encefalopatía y tienen poca o nula asociación con fuga plasmática. El principal factor de riesgo para las formas más severas de la enfermedad es que se trate de una infección secundaria. Se ha sugerido que la viremia en las formas severas es mayor que en la fiebre por dengue.

Las alteraciones en la permeabilidad vascular y en la coagulación se cree que surgen por una combinación de: a) un incremento en la replicación viral, b) incremento en la muerte de las células infectadas o por la acción de células citotóxicas del sistema inmune, c) activación del complemento; y si ha existido una infección previa por cualquier serotipo de dengue d) la activación de linfocitos T de memoria y e) aumento en la producción y liberación de citocinas proinflamatorias e interferones I y II por los linfocitos T y células infectadas (87).

Todos estos procesos son reflejo de lo que en inmunología se conoce como el “pecado original antigénico”, ya que la respuesta inmune potencia la infección del virus así como la severidad de los síntomas y el progreso a cuadros más severos de la infección.

La fase de recuperación inicia cuando el paciente revierte el aumento de la permeabilidad vascular a un nivel normal después de 48 a 72 horas. Se puede manifestar fatiga profunda en el paciente durante varias semanas después de la fase de recuperación.

5. RESPUESTA INMUNE

Cuando un mosquito infectado pica y se alimenta de un individuo sano, libera en la dermis al virus el cual activa e infecta a células dendríticas inmaduras (iDC) cuyo trabajo es censar el microambiente antigénico y capturar antígenos para su procesamiento y presentación a linfocitos T. Los macrófagos y/o monocitos también se consideran blancos primarios para el virus y uno de los principales sitios de

replicación viral, ya que inician la producción de interferones de tipo I y citocinas quimioattractantes que en su momento provocan la migración de neutrófilos, basófilos y células asesinas naturales (NK, *Natural Killer*) al sitio de infección.

La infección en un inicio se caracteriza por una respuesta de tipo Th1 la cual es propia de un cuadro de FD, y durante el transcurso de la infección y bajo el efecto de interleucinas como la 10, 12 y TGF- β 1 la respuesta cambia a una de tipo Th2 lo cual se relaciona con un progreso a una forma más severa de la enfermedad producida por el virus(86, 87).

Las células NK pueden eliminar a células infectadas mediante dos mecanismos, la citólisis y la citotoxicidad dependiente de anticuerpo. Independiente de su función para controlar la infección, las células NK y CD juegan un papel importante siendo el puente entre la inmunidad innata y el inicio de la adaptativa. La desregulación en la actividad de las CD y NK debido a la infección por dengue puede exacerbar la progresión de la enfermedad durante la infección.

La activación de las células de la respuesta inmune innata se da vía receptores tipo toll (TLR), aunque la participación de éstos en el proceso no es clara aunque se ha relacionado a TLR 3 en la activación de células no inmunitarias como las HepG2. Tanto los receptores tipo NOD como los RIG-I tienen la capacidad de reconocer al virus y desencadenar la activación de NF-kB y la subsecuente producción de interferones de tipo I (α/β), los cuales juegan un papel fundamental para controlar la infección (88).

Por su parte los neutrófilos producen grandes cantidades de TNF- α y de defensinas, péptidos pequeños ricos en cisteína y que pueden controlar la infección viral a través de su interacción con la membrana viral o con receptores celulares.

Cuando las células dendríticas y macrófagos han sido activados, el siguiente paso es la activación de células de la respuesta inmune adaptativa (RIA), como son los linfocitos T y B, los cuales en su momento producirán anticuerpos específicos contra epítopos de las proteínas del virus.

La proteína E es contra la cual se producen la mayoría de los anticuerpos ya que ésta se encuentra en mayor cantidad en la cubierta del virus maduro. Por otra parte la proteína prM que se encuentra en virus inmaduros juega un papel importante en la producción de anticuerpos y resulta ser a su vez un mecanismo de evasión de la respuesta inmune, ya que se producen anticuerpos contra una proteína inexistente en los virus maduros y por consecuencia resultan ser no neutralizantes. Los epítomos reconocidos por los anticuerpos neutralizantes reconocen a los tres dominios de la proteína E y pueden tener reacción cruzada entre los distintos serotipos (72).

Para que los anticuerpos producidos logren ser neutralizantes necesitan estar a una concentración adecuada y suficiente para unirse a la mayoría de epítomos posibles y así evitar la interacción del virus con sus receptores y/o correceptores.

Después de una infección primaria por cualquier serotipo, la persona queda protegida contra una reinfección por éste sin embargo, esta protección no es efectiva contra otros serotipos del virus si no al contrario, se ha demostrado que puede causar un aumento de la infección e inducir la progresión a un cuadro más severo de la enfermedad. Este efecto se conoce como “el pecado original antigénico” el cual se basa en que, después de una primera infección los títulos de anticuerpos contra el virus tienden a caer, pero si existe una reinfección por otro serotipo del virus, el título aumenta y se mantiene así, despertando una reacción inmunológica dañina para el huésped (10, 72).

Por otra parte, existe otro efecto denominado “potenciación dependiente de anticuerpo” (“ADE” por sus siglas en ingles), en donde estos mismos anticuerpos tienen reacción cruzada con otro serotipo del virus, pero en lugar de neutralizarlo inducen la infección de un rango mucho mayor de células, disparando el aumento de la viremia. Este hecho se debe a que células permisivas (y por las cuales el virus tiene tropismo preferencial, como son los macrófagos) tienen receptores FcγR, los cuales reconocen a los anticuerpos que están opsonizando al virus, facilitando así la entrada de éstos al macrófago y aumentando el número de células infectadas por el virus. Todo este proceso es dependiente de la concentración de anticuerpos, ya

que si no alcanzan la concentración necesaria para neutralizar al virus inducen el ADE (**Figura 8**) (10).

Existe por lo tanto un efecto directo de estos dos procesos, la progresión hacia un cuadro más severo de la enfermedad (DHF/DSS), involucrando sistemas y procesos como el complemento, que se sabe está activando la superficie de células

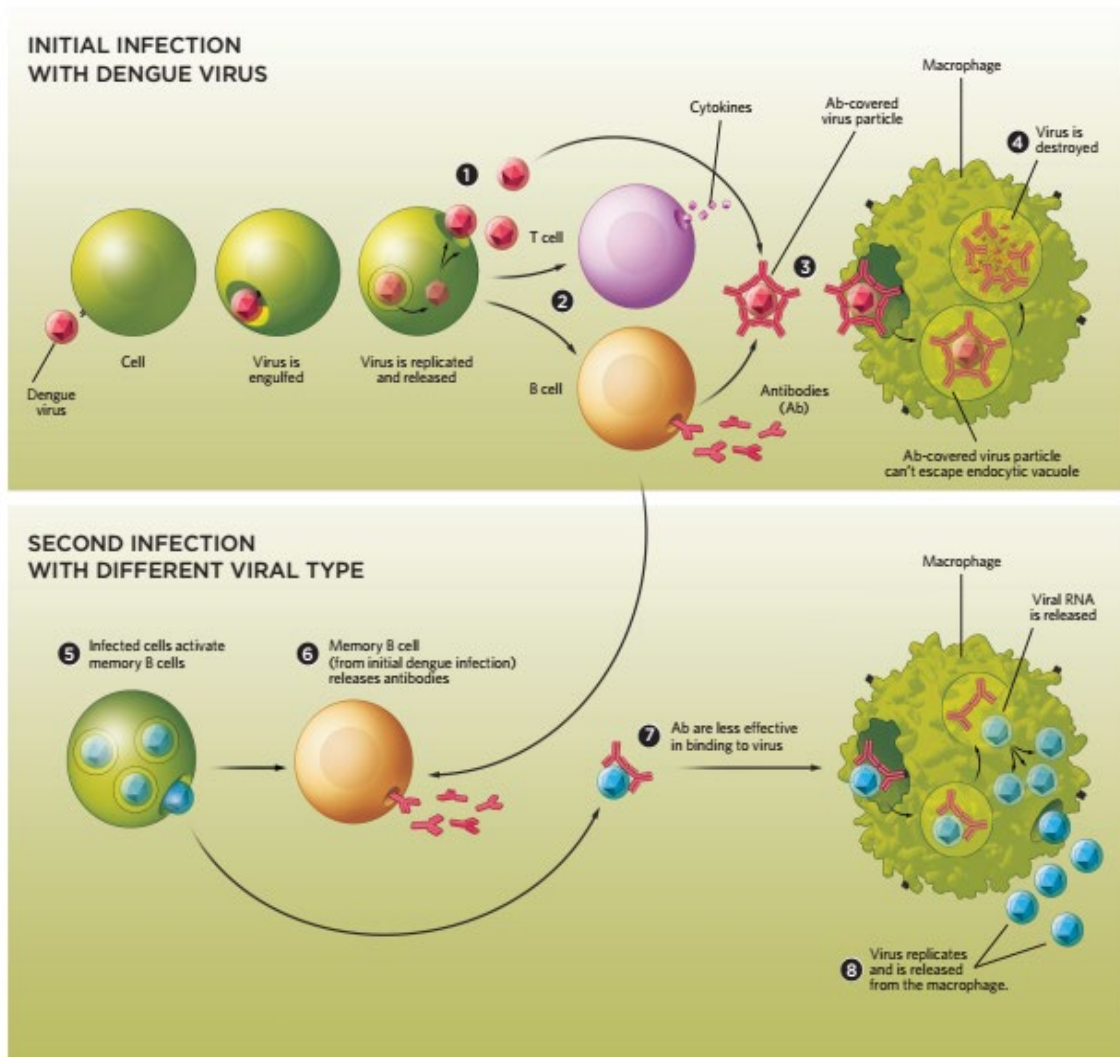


Figura 8. Potenciación dependiente de anticuerpo (ADE). Durante una infección primaria por DENV se producen anticuerpos con la afinidad y en la concentración adecuada para neutralizar a las partículas virales e inhibir la infección de nuevas células. Cuando sucede una segunda infección por DENV con un serotipo diferente al inicial, los anticuerpos producidos no tienen la afinidad ni la concentración adecuada para poder inhibir al virus, en su lugar los anticuerpos unidos al virus son reconocidos por receptores Fc de los macrófagos y así se potencia su infección, el ADE está ligado con los cuadros graves de DENV. (Tomado de *Tami Tolpa, The Scientis, 2012*).

endoteliales lo que contribuye al proceso de fuga vascular característica del dengue severo.

Por otra parte, se produce una tormenta de citocinas inducida por células de la respuesta inmune innata y linfocitos T con reactividad cruzada, todas las cuales proliferan y contribuyen en el proceso de fuga vascular.

Entre los mecanismos de evasión de la respuesta inmune que tiene dengue, se encuentran la inhibición de la fosforilación de IRF3, que forma parte de la vía necesaria para la producción de IFN-I, esto a través de la proteína no estructural NS2B. Por otra parte se bloquea la dimerización de las proteínas STAT 1 y 2, promoviendo la degradación de STAT 2 vía el sistema Ubiquitina proteosoma. Ambos eventos llevan al bloqueo de la producción de INF- γ (89).”

6. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES Y ACETILACIÓN DE HISTONAS.

El genoma de los organismos eucariotas se encuentra empaquetado en una estructura llamada cromatina cuya unidad funcional son los nucleosomas, a su vez, el nucleosoma está conformado por dos copias de las Histonas H2A, H2B, H3 y H4 formando un octamero, este se encuentra rodeado de aproximadamente 147 pb de ADN(90). La cromatina de todas las células es una estructura altamente dinámica que se puede encontrar esencialmente en dos estados: heterocromatina y eucromatina, ambos hacen referencia al grado de compactación del DNA dentro de la célula el cual prácticamente regula la accesibilidad al ADN de factores reguladores de la transcripción, replicación, reparación, recombinación y reparación del DNA dañado.

La transición entre estos dos estados se encuentran regulados principalmente por modificaciones químicas covalentes en el extremo aminoterminal de las histonas como la fosforilación, metilación y acetilación (que son las modificaciones más ampliamente estudiadas) y la metilación del DNA (91). Para

finés de este trabajo nos centraremos en una breve descripción de la acetilación y fosforilación de histonas.

La acetilación y su impacto sobre la transcripción fue descrita por primera vez en 1964 siendo hasta ahora la modificación más ampliamente estudiada y relacionada principalmente a la activación de la transcripción. Se contemplan dos posibles hipótesis sobre su mecanismo de acción, el primero involucra la pérdida de afinidad de las histonas por el DNA debido a un cambio en la carga de las histonas y el segundo implica el reclutamiento de proteínas o complejos modificadores de cromatina y factores de transcripción(92, 93).

La acetilación de histonas es un proceso regulado por dos tipos de enzimas, las acetil transferasa de histona (HATs) (Proteínas escritoras) y las Deacetilasas de histona (HDAC) (Proteínas borradoras). Las primeras se clasifican en tres familias: la MYST, GNAT y p300 mientras que las segundas en 2 familias y 4 clases; HDAC I, II, III y IV (94-96).

7. DEACETILASAS DE HISTONA (HDACs)

Las deacetilasas de histona son un grupo de enzimas cuya función es la remoción del grupo acetil del nitrógeno ϵ de residuos de lisina en histonas y proteínas no histónicas, estas enzimas fueron descubiertas por primera vez en 1969 por *Inoue & Fujimoto* (97). Actualmente, se han descrito 18 HDACs que son divididas en dos familias basado en la similitud entre sus secuencias pudiendo ser parte de la familia de las histona deacetilasas o de la familia reguladora de Sir2. Como se comentó anteriormente, estas familias se dividen en cuatro clases: HDACs de clase I, II, III y IV (**Tabla 1**). La clasificación de las HDACs está basada en la homología de su secuencia con la secuencia de las HDACs de *Saccharomyces cerevisiae* (**96, 98**).

La deacetilación de histonas por las HDACs regula la estructura de cromatina y la transcripción, a su vez la acción de estas enzimas sobre proteínas no histónicas controlan diversos procesos celulares(96). Se ha observado que este grupo de enzimas juegan un papel importante durante el ciclo de replicativo de varios virus

tanto de DNA como de RNA como el Virus de la hepatitis B, (HBV), Citomegalovirus humano (HCMV), Epstein Barr virus (EBV), HIV y el flavivirus HCV (99-106).

8. FOSFORILACIÓN DE HISTONAS

La fosforilación de las histonas, particularmente de H3, es un proceso necesario para que se lleve a cabo la condensación de la cromatina principalmente durante la mitosis y la muerte celular por apoptosis. Otras funciones de la fosforilación de histonas es participar en procesos de replicación, reparación, transcripción y recombinación del DNA (107).

Tabla 1.
Clasificación de Deacetilasas de histona (HDACS)

Familia	Clase	HDAC
Deacetilasas de Histona	Clase I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8.
	Clase II	HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 HDAC10.
	Clase IV	HDAC11.
Familia reguladora de Sir2	Clase III	SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7

Modificado de *Seto E. & Yoshida M., 2014*

La fosforilación de las serinas 10 y 28 de la histona H3 se encuentra relacionada a la condensación de la cromatina durante la mitosis ya que se ha demostrado que la fosforilación de la serina 10 recluta el complejo de condensina hacia la cromatina, la enzima encargada de llevarlo a cabo es Aurora cinasa B (108).

9. PAPEL DE LAS CINASAS EN INFECCIONES VIRALES

La función de cinasas y fosfatasas es esencial en múltiples procesos celulares así como en procesos patológicos sean o no infecciosos. Esta mega familia de enzimas llevan a cabo el proceso de fosforilación proteica la cual es la más modificación postraducciona más abundante, reversible e importante modificación postraducciona tanto en proteínas celulares como virales (109). Se

estima que el genoma humano contiene aproximadamente 500 genes que codifican para cinasas (518 cinasas y 106 pseudogenes, aproximadamente 2% de los genes humanos) y que más del 30% de las proteínas celulares pueden ser sometidas a fosforilación (110).

La fosforilación regularmente modifica el comportamiento de las proteínas en donde es llevada a cabo; entre de las modificaciones más importantes tenemos: cambios funcionales, cambios en su actividad enzimática, localización celular y asociación o no con otras proteínas. Dependiendo de la especificidad por el sustrato las cinasas son divididas en serina/treonina (S/T) o tirosina (Tyr) cinasas (109). Ambos tipos de cinasas tiene un núcleo catalítico común el cual contiene un sitio de unión a ATP en el extremo N terminal rico en glicina y un centro catalítico central con un residuo de ácido aspártico requerido para la actividad enzimática (111). A su vez ambos tipos de cinasas regulan eventos catabólicos, anabólicos y vías de señalización que mantiene la homeostasis celular(110).

Durante los procesos de infección viral las cinasas juegan un papel importante en la regulación de la entrada viral, transcripción, replicación, ensamble y salida para beneficio del virus (112).

10. CINASAS DURANTE LA INFECCIÓN POR DENV

Durante la infección por DENV el virus toma el control de vías metabólicas como la síntesis de lípidos y de señalización como la relacionada con respuesta a interferón en la célula huésped. A su vez durante la infección la participación de cinasas del huésped es fundamental para llevar a cabo cada uno de los procesos necesarios para el ciclo de replicación viral, es por eso que analizar la importancia de algunas cinasas para la replicación de DENV puede plantear nuevos blancos terapéuticos que ayuden a disminuir la progresión a cuadros graves.

Por ejemplo se ha demostrado que la proteína NS5 puede ser fosforilada por la proteína cinasa G (PKC), por casein cinasa II (CK II), CK 2 y por proteína cinasa C (PKC). En el caso de PKG fueron analizados por espectrometría de masas los sitios de fosforilación en la proteína NS5 de YFV y DENV encontrándose un sitio de

fosforilación por PKG conservado en ambos virus (Thr 449 en DENV). La función de la fosforilación de NS5 se ha descrito en mosquitos en donde esta proteína fosforilada altera el comportamiento de vuelo de *A. gambiae* (113). Además de los dos flavivirus mencionados, también se ha detectado que el dominio de metiltransferasa de West Nile Virus (WNV) es fosforilado por PKG (114).

De manera general, se ha reportado que la proteína NS5 de los flavivirus puede ser fosforilada por la CK I (Ser 56), pero solo en YFV se ha demostrado que es importante para su función enzimática de esta (115). Por otra parte, CK 2 también puede fosforilar a NS5 y de esta manera regular su localización nuclear de la proteína a través de su retención citoplasmática (116).

En el caso de PKC, la inhibición de esta enzima demostró tener un efecto benéfico sobre la infección induciendo un incremento en producción de viral pero afectando la viabilidad de las células huésped. Al revertir la inhibición de PKC induciendo su activación con PMA el efecto se revirtió, de esta manera se demostró que PKC modula la replicación viral a través de la fosforilación del dominio RdRp de NS5 (117). En este caso, pareciera observarse que la fosforilación de la proteína NS5 es esencial para que esta lleve a cabo sus funciones de manera adecuada durante el ciclo de replicación viral.

Existen otras cinasas como EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidermal) que al ser inhibidas impactan negativamente sobre la replicación del RNA viral en líneas celulares hepáticas (HepG2) a través de un mecanismo que pareciera involucrar alteraciones en la forma fosforilada de STAT3, lo cual provocaría una potenciación en la expresión de los genes de respuesta a interferón (RIG) (118). A su vez, el inducir la fosforilación de eIF2 α utilizando el compuesto 4-HPR (N-(4-hydroxyphenyl) retinamide) produce una atenuación de la traducción celular lo que provoca un estado antiviral en la célula infectada (119).

Por una parte las proteínas virales necesitan la fosforilación por proteínas del huésped para llevar a cabo su función, pero DENV también puede modificar el estado de fosforilación de proteínas del huésped para su beneficio como es el caso de AMPK, la cual regula negativamente la función de mTORC1 y a su vez esta

induce lipofagia celular lo cual beneficia la replicación de DENV. En contraparte la inhibición de AMPK disminuye la inducción de autofagia, la depleción de LPs y la replicación del RNA y producción de partículas virales (120).

La inhibición de otras cinasas como AAK1 (proteín cinasa asociada a AP2) y GAK (cinasa asociada a ciclina G) afectan la entrada y la producción de partículas virales ya que durante la infección por DENV se ha observado que ambas cinasas afectan ambos procesos virales (121). A su vez, la activación de PKR (Proteín cinasa regulada por dsRNA) debida a su interacción con dsRNA regula negativamente la producción de interferón por lo que al ser inhibida aumenta la producción de partículas virales (122).

Si bien la inhibición puntal de cinasas afecta el ciclo de replicación viral, utilizar un fármaco que inhiba de manera general cinasas también afecta el ciclo de replicación viral, como lo comprobaron *García-Blanco y cols.* cuando al utilizar el fármaco SVF785 indujeron una descolocalización de las proteínas virales y una disminución en la producción de partículas virales infectivas debido a un proceso de ensamble/morfogénesis frustrado (123).

11. AURORA CINASAS

En 1995 en la mosca *Drosophila* se detectó que al mutar el gen *aur* que codifica para una serina/treonina cinasa putativa, se afectaba de manera negativa la separación de centrosomas en embriones y neuroblastos de larva provocando la formación de un huso monopolar (de ahí que se le diera el nombre de Aurora). De esta manera la familia de las Aurora cinasa fue descubierta (124) y entre los años 1995 y 1998 que los homólogos se describieron en mamíferos (125, 126).

Actualmente se conocen tres miembros: Aurora cinasa A, B y C (AurKA, AurKB y AurKC), todas evolutivamente conservadas. Las tres cinasas comparten similitud en el domio catalítico que se localiza en el extremo amino terminal, y difiere tanto en similitud como en tamaño en el extremo carboxilo terminal (127). Los genes para las auroras se localizan en el cromosoma 20q13.2 (AurKA), 17p13.1 (AurKB) y 19q13.43 (AurKC) (128).

Estructuralmente las auroras contienen dos dominios principales: I) el dominio regulador en el extremo amino terminal (altamente diverso entre las auroras) y el elemento A-Box y II) en el carboxilo el elemento D-Box y el dominio catalítico, el cual conserva >70% de homología entre los miembros de la familia. En las auroras cinasa tanto el A-Box como el D-Box regulan su degradación (129-131).

Dentro de las principales funciones de las auroras se encuentra la regulación de ciclo celular modulando procesos como la estabilidad genética, modificación de cromatina, funciones del centrosoma, ensamble del huso mitótico, correcto alineamiento cromosomal y la citocinesis (132).

La expresión de las Auroras está limitada a las fases G2/M del ciclo celular y algunas veces en la fase S, AurKA y AurKB se expresan en todos los tejidos en proliferación durante el inicio y el final de la mitosis, mientras que AurKC se expresa únicamente en tejido testicular (133, 134).

Los tres miembros de la familia se sobreexpresan en distintos tipos de cáncer por lo cual se ha propuesto que tienen actividad oncogénica y/o oncoproteíca. Debido a su expresión y a las funciones antes mencionadas las auroras son conocidas como los reguladores maestros de los eventos mitóticos tardíos y citocinesis.

12. AURORA CINASA B

La principal función de AurKB es regular la segregación correcta de cromosomas (interacción cromátides-microtubulos, cohesión de cromátides hermanas, “checkpoint” del ensamble de huso mitótico) y la citocinesis. Para llevar a cabo estas funciones forma un complejo con las proteínas INCENP (*Inner Centromere Protein*), survivina y borealina, el llamado *Chromosomal passenger complex* (CPC) en donde AurKB forma el núcleo enzimático y las otras proteínas la fracción reguladora (**Figura 9**) (135).

El complejo se forma cuando se lleva a cabo la unión de AurKB a la caja *IN* en el carboxilotermino de la proteína INCENP, esta interacción activa parcialmente a AurKB, la cual se autofosforila en el denominado *Loop-T*, una vez parcialmente activada AurKB fosforila a INCENP en dos serinas adyacentes en la caja *IN* una

región denominada TSS (Thre-Ser-Ser), esto provoca una retroalimentación positiva que resulta en la activación total de AurKB y la potenciación de la actividad cinasa de la enzima; la fosforilación de los residuos de serina en INCENP son esenciales para esto último. Este mecanismo de acción es evolutivamente conservado entre eucariontes (**Figura 10**) (136, 137).

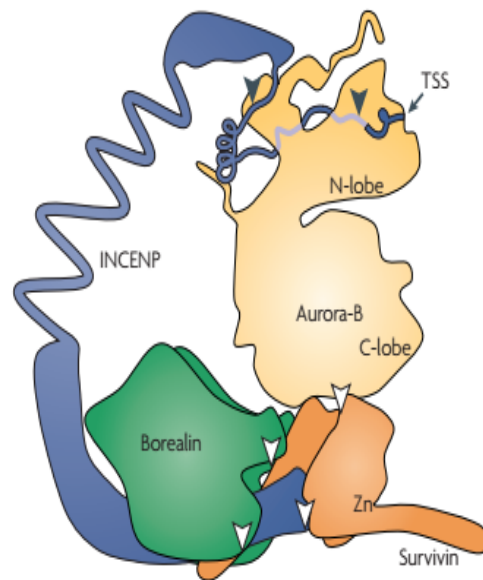


Figura 9. Complejo CPC (*Chromosomal passenger complex*). Aurora cinasa B forma complejo con tres proteínas nucleares: INCEP, Borealina y Survivina, AurKB forma el núcleo catalítico de este complejo mientras que las proteínas restantes forman la fracción reguladora del mismo. (Modificado de Earnshaw W. C. Et al, 2007).

La localización típica de AurKB es en todo el núcleo, pero una vez en iniciada la mitosis se moviliza a estructuras nucleares específicas: durante prometafase a metafase se mueve a centrómeros, una vez que inicia la anafase gradualmente se relocaliza a la zona media hasta que termina la citocinesis. Cuando forma parte del CPC, el movimiento del complejo en el ciclo celular es preciso en tiempo entre sitio y sitio de localización (132).

Cuando existe una AurKB mutada que sea catalíticamente inactiva, se afecta la localización de todo el complejo CPC del centrómero al huso mitótico y altera de forma grave la progresión mitótica (138).

AurKB promueve la biorientación cromosomal a través de la regulación del anclaje de los microtúbulos al cinetocoro. Parte del mecanismo utilizado implica la fosforilación de la proteína MCAK (*Mitotic Centromere-Associated Kinesin*) por parte de AurKB y de esta manera inhibe la despolimerización de los microtúbulos durante la formación del huso mitótico mantenido a los microtúbulos unidos establemente al cinetocoro. A través de esta función, la enzima está involucrada en reclutar proteínas del “Checkpoint” a los cinetocoros (139, 140).

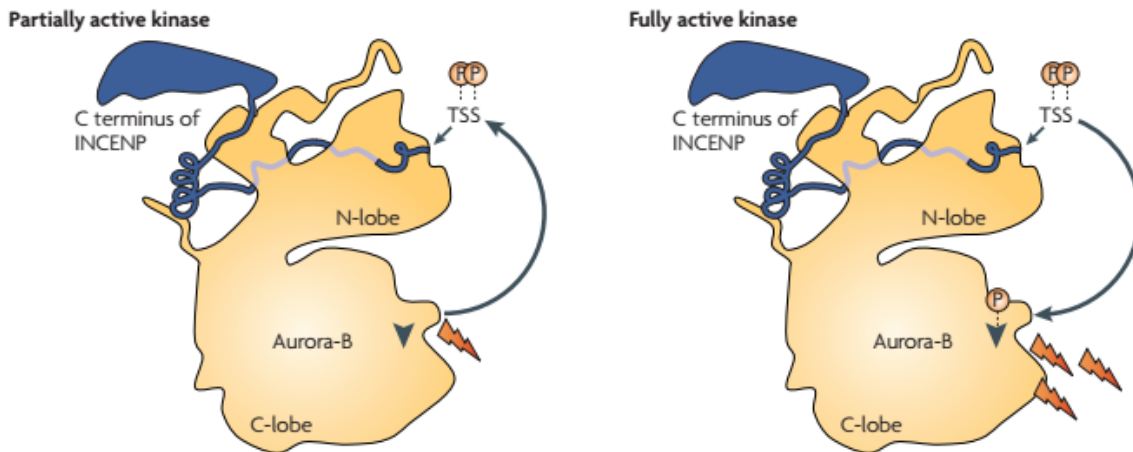


Figura 10. Activación de AurKB. Cuando AurKB forma parte de CPC, se lleva a cabo su activación parcial al unirse a INCENP, posteriormente AurKB se autofosforila y fosforila a INCENP en la región TSS lo cual provoca una potenciación en la actividad de AurKB lo que provoca la activación total de la enzima (*Modificado de Earnshaw W. C. et al, 2007*).

Otra de las funciones importantes de AurKB durante la mitosis es fosforilar las serinas 10 y 28 de la histona H3 lo cual es un paso esencial para la condensación de cromosomas tanto en vertebrados como en nematodos y levaduras (141-144).

Durante la mitosis la división citoplasmática debe de ser regulada espacial y temporalmente para permitir que los cromosomas puedan migrar del ecuador a cada célula hija antes de que sean divididas en dos células independientes, un proceso denominado citocinesis. Para llevar a cabo este proceso es necesario que AurKB interaccione con componentes del complejo ESCRT-III (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), de manera particular con la subunidad CHMP4C (*Charged Multivesicular Body Protein 4C*) que regula la formación de polímeros de ESCRT-III y su asociación con membranas. CHMP4C es fosforilada por AurKB en

la serina 210 (cerca del carboxilterminal). Este paso es requerido para llevar a cabo el proceso de citocinesis e involucra la participación de borealina para la unión a CHMP4C y la fosforilación de esta por parte de AurKB CPC (145, 146).

El proceso es solamente conservado en mamíferos y se cree que surgió tarde evolutivamente como un mecanismo de seguridad para evitar la ruptura prematura de los puentes cromosomales intracelulares y acumulación de daño en el DNA (145) **(Figura 11)**.

Fuera de las funciones en mitosis de AurKB, se ha descrito que junto a ECT 2 (*Epithelial Cell Transforming 2*) la actividad cinasa es esencial para la formación de gránulos de estrés en células cancerosas de astrocitoma humano. En estos gránulos de estrés se detectaron mRNAs para varias vías celulares como migración celular, metabolismo, traducción y transcripción, por lo cual se sugiere que estos gránulos de estrés podrían funcionar como un mecanismo de regulación epigenética en células cancerosas, permitiendo la sobrevivencia de estas(147).

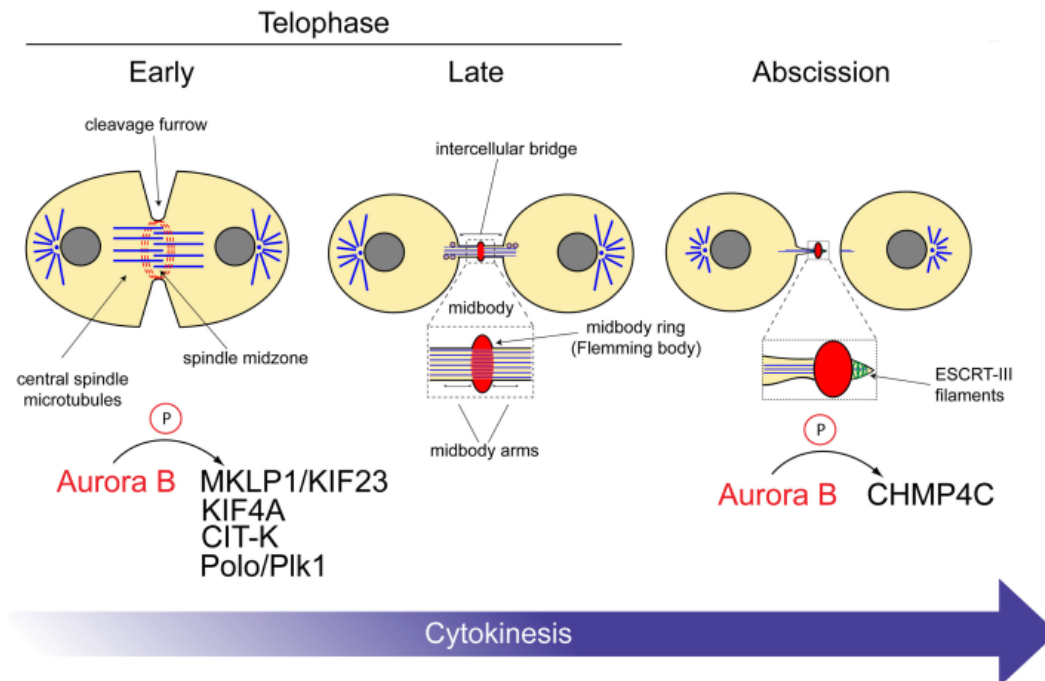


Figura 11. Fosforilación de CHMP4C por AurKB durante la citocinesis. Durante los estadios tempranos de la mitosis (telofase) AurKB fosforila a múltiples blancos de la maquinaria de mitosis, durante el proceso de citocinesis el principal blanco de AurKB es CHMP4C, esta fosforilación promueve la polimerización de ESCRT-III para llevar a cabo el proceso de separación de las células hijas. (Tomado de *Capalbo L. & Dávino P., 2015*)

Debido a que AurKB es una cinasa reguladora del ciclo celular durante un proceso de infección algunos virus como Epstein Barr y HCV toman el control de esta enzima para su beneficio promoviendo su estabilidad o destrucción.

Epstein Barr (EBV) pertenece a la familia de los γ -herpesvirus y establece una infección de por vida en la mayoría de la población adulta, la infección suele ser asintomática pero en pacientes inmunosuprimidos puede contribuir al desarrollo de enfermedades linfoproliferativas y tumores epiteliales. El mecanismo por el cual EBV induce estas alteraciones está relacionado con la actividad de la proteína EBNA3C, un factor de transcripción viral el cual se ha demostrado que induce un incremento en la transcripción del mensajero de AurKB a través de la potenciación de su promotor. Además de lo anterior, estabiliza a AurKB reduciendo la ubiquitinación de la enzima. Esta estabilización mantiene la actividad cinasa “encendida” y provoca la fosforilación y degradación de p53 así como de p73, además se cree que pudiera fosforilar la proteína pRb, contribuyendo a la proliferación y transformación de células B (148, 149).

En el caso de otros virus de RNA como influenza, se llevó a cabo un “screening” genómico y se detectó que Hesperidina, un inhibidor específico de AurKB es capaz de restringir la replicación de influenza A y B de aislados clínicos e incluso de cepas resistentes a Oseltamivir®, el fármaco de uso actual para prevención y tratamiento de la infección por este virus(150).

Por su parte, de los flavivirus el único miembro en el cual se ha reportado la participación de AurKB es el virus de la Hepatitis C (HCV), durante la replicación del virus la proteína del “core” (cápside) interacciona con AurKB uniéndose al sitio activo de esta lo que resulta en disminución en la actividad de la enzima.

De esta manera la proteína de la cápside durante la infección desregula la expresión de NF- κ B y la proteína pro inflamatoria COX-2 (ambas proteínas tienen efecto antiapoptótico y antiproliferativo). Pero cuando la actividad cinasa de AurKB es inhibida induce un aumento en la capacidad infecciosa de HCV caso contrario cuando la expresión de AurKB se elimina ya que afecta directamente la expresión de la cápside y la progenie de HCV.

Finalmente, la sobreexpresión de la enzima disminuye la expresión de la proteína viral y de partículas infecciosas. De esta manera se plantea que regular la actividad cinasa de AurKB puede influenciar negativamente en la vía inflamatoria al inicio de la infección por HCV lo cual beneficia el ciclo de replicación viral (151).

En contraparte, durante la mitosis la actividad de AurKB debe de ser finamente regulada para evitar la progresión aberrante del ciclo celular, la vía por la cual se inactiva AurKB no es del todo conocida pero se sabe que participan proteínas como IK cuya función es reclutar a la protein fosfatasa 2A (PP2A) lo cual induce la inactivación de AurKB(152). A su vez, se ha reportado que la activación de AurKB utilizando ácido okadaico promueve su interacción con la protein fosfatasa 1 PP1, funcionando ambas fosfatasas como reguladores negativos de la actividad de AurKB (153).

13. JUSTIFICACION

Debido a que actualmente no se cuenta con una vacuna o esquema farmacológico efectivo contra DENV, el estudio de proteínas del huésped que participen en el ciclo replicativo podría ayudar al desarrollo de nuevos fármacos.

La Aurora Cinasa B y las HDAC participan en el ciclo replicativo de otros virus como EBV, HIV, HSV y otros flavivirus como HCV. Por lo tanto analizar la relevancia y función de estas enzimas durante el ciclo replicativo DENV 2 nos permitirá conocer su papel en la patogenia de la enfermedad e identificar nuevos blancos terapéuticos o profilácticos para combatir la infección por DENV.

14. HIPOTESIS

La función de las HDAC y la actividad catalítica de Aurora Cinasa B son importantes para el ciclo de replicación de DENV 2.

15. OBJETIVOS

15.1 Objetivo General

- Analizar la importancia de Aurora Cinasa B y HDACs durante el ciclo de replicación de DENV 2.

15.2 Objetivos particulares

- Determinar la participación de HDAC's en el ciclo replicativo de DENV.
- Analizar la participación de la Aurora cinasa B en el ciclo replicativo de DENV.
- Examinar el comportamiento y localización de proteínas virales en los complejos de replicación durante el tratamiento con los inhibidores de HDAC y Aurora Cinasa B.

16. MATERIAL Y MÉTODOS.

16.1 Cultivo celular y cepa viral.

La línea celular hepática Huh-7 (ATCC PTA8561) se cultivó en medio esencial DMEM suplementado con 8% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, penicilina (5×10^4 U/ml), estreptomicina (50 µg/ml) y fungizona a 37°C y 5% de CO₂ (Medio completo). La propagación del DENV serotipo 2 cepa Nueva Guinea fue realizada en cerebro de ratones lactantes y el título de las preparaciones virales fue determinado por ensayo de focos.

16.2 Anticuerpos y fármacos

El inhibidor de Aurora cinasa B, ZM447439 (N-[4-[[6-Methoxy-7-[3-(4-morpholinyl)-propoxy]-4-quinazoliny]amino]phenyl]benzamide) sintetizado por AstraZeneca fue adquirido en la casa comercial Tocris Bioscience y fue disuelto en DMSO para preparar un stock a una concentración de 9 mM. El inhibidor de HDAC butirato de sodio (BuNa) fue adquirido en la casa comercial Sigma-Aldrich y fue diluido en agua para obtener un stock al 1 M.

Se utilizaron anticuerpos α -Histona H3 ab107799 (1:5000 WB/1:1000/IF), α -Histona H3S10p ab14955 (1:5000 WB y 1:1000/IF), α -Histona H3K9ac ab12179 (1:5000/WB y 1:1000/IF). α -Aurora B 232p ab115793 (1:1000/WB y 1:200/IF), α -AuroraB Invitrogen 36-5200 (1:1000/WB y 1:200/IF), α -NS4A GTX124249 (1:200/IF), α -NS3 GTX124252 (1:1000/WB y 1:200/IF), α -E 4G2 clona Hb 119 (1:200/Citometría e IF), α -prM-E 2H2 Sobrenadante de Hibridoma (1:200/Focos, IFs y Citometría), α -dsRNA 1:200 (donado por el Dr. Mariano García Blanco), α -cápside 1:500 (Donado por la Dra. Andrea Gamarnik,) α -Mouse IgG acoplado a HRP Cell Signall 7076S (1:5000), α -Rabbit acoplado a HRP Cell Signall 7074S (1:5000).

16.3 Extracción y enriquecimiento de Histonas con ácido sulfúrico.

Se partió de aproximadamente 1×10^7 millones de células Huh-7 (una placa p100 confluyente) fueron levantadas con Tripsina-EDTA y lavadas con PBS 1X centrifugándolas a 900 RPM durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron lisadas con 1 mL de buffer de lisis hipotónico frío (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1.5

mM MgCl₂, 1 mM KCl y 1 mM de DTT) durante 30 min. a 4°C con movimiento constante para permitir la lisis de las células. Transcurrido el tiempo, las células fueron centrifugadas a 10 000 g por 10 min a 4°C para obtener la fracción nuclear. Posteriormente, los núcleos se resuspendieron en buffer hipotónico a temperatura ambiente y puestos sobre un colchón de sacarosa 0.34 M y centrifugarse a 10 000 rpm durante 5 min a 4°C sin freno, de esta manera se elimina la fracción citoplasmática. Este paso se repitió en dos ocasiones. El botón obtenido se resuspendió en 400 µL de H₂SO₄ 0.2 M (0.4 N) y se dejó toda la noche en movimiento constante a 4°C, es en este paso en donde se enriqueció la fracción de histonas.

Al día siguiente, los núcleos fueron centrifugados a 16 000 g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se recuperó cuidadosamente, se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 132 µL de ácido tricloroacético al 100%. El tubo se incubó en hielo durante 30 minutos para permitir la precipitación de las histonas. Transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron a 16 000 g durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y al pellet obtenido se le agregaron 400 µL de acetona fría (-20 °C) para centrifugar de la misma manera que el paso anterior. Finalmente, se descartó la acetona y los residuos se dejaron evaporar del tubo durante 5 minutos en hielo. El pellet fue resuspendido en 100 µL de agua inyectable adicionando cocktail inhibidor de proteasas, fosfatasa (PhosStop, Roche.) y deacetilasas (BuNa 100 mM). La presente metodología es una modificación de *Shechter D. et al, 2007 (154)*.

16.4 Análisis de modificaciones postraduccionales de la histona H3

Para llevar a cabo el ensayo de ELISA para analizar las modificaciones postraduccionales en la histona H3 partimos de histonas extraídas y enriquecidas utilizando el método de extracción ácida. Las histonas fueron cuantificadas con el método de BCA (BCA protein assay, Thermo Fisher) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez conocida la concentración de histonas se realizó una dilución de tal manera que a cada pozo de la placa para ELISA contuviera 100 ng/mL de proteína. Brevemente, se agregaron 49 µL de solución AB a cada pozo que corresponde al blanco del ensayo, 49 µL de la solución AB y 1 µL

de la dilución de proteína [100 ng/mL] a los pozos control al igual que a los pozos que correspondían a las muestras problema, la placa se cubrió con una película adhesiva (para evitar la evaporación de la muestra) y se incubó durante 120 min a 37 °C. Posteriormente, se retiró la solución que contenía las histonas y cada pozo se lavó con 150 µL de buffer de lavado (WB). Para llevar a cabo la unión de anticuerpo secundario se agregaron 50 µL de buffer DA por pozo y la placa se cubrió con aluminio incubándose a temperatura ambiente por 60 min. La solución DA se retiró y la placa se lavó 4 veces con 150 µL por pozo de WB. Para el proceso de revelado se agregaron 100 µL DS a cada pozo y se incubaron entre 1 y 10 minutos protegidos de la luz monitoreando el cambio de color (Azul) en los pozos, para detener la reacción se agregaron 100 µL de solución de stop (SS) a cada pozo y finalmente la placa fue leída a 450 nm en el lector Elx808 Absorbance Multiplate Reader. Para calcular el porcentaje de histonas modificadas se realizaron las siguientes ecuaciones proporcionadas por el fabricante:

a) Para el cálculo de la cantidad de H3 modificada (ng/µL)

$$\frac{D.O \text{ de la muestra} - D.O \text{ del blanco}/S}{D.O \text{ del control} - D.O \text{ del blanco}/P} \times 1000 = H3 \text{ total o modificada} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \text{ de proteína} \right)$$

S: cantidad de proteína cargada en ng.

P: cantidad de proteína control en ng (25 ng).

b) Para calcular el porcentaje de histonas modificadas (%)

$$\frac{\text{Cantidad de H3 modificada} \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \text{ de proteína}}{\text{Cantidad de Histona H3 total} \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \text{ de proteína}} \times 100 = \% \text{ de histona H3 modificada}$$

16.5 Ensayos de metabolismo y viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad para las diferentes concentraciones de ZM447439 se realizaron con el kit cell titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Se probaron las concentraciones de 0 µM (Vehículo-DMSO-), 1 µM, 5 µM, 10 µM y 15 µM del inhibidor en el cultivo de células Huh-7 por 24 hrs. Transcurrido este tiempo, se realizó el ensayo que consiste en determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad celular. El fundamento

de la prueba se encuentra en la reducción de la sal inerte de tetrazolio (*[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]*) el cual es bio-reducido por las células a formazán, un producto coloreado soluble en el medio de cultivo. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos en donde se retiró el medio de cultivo celular y se agregó una mezcla que contenía 50 µl del medio correspondiente a la línea celular y 10 µl de la solución cell titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay dentro de cada pozo. Las células con la mezcla se incubaron durante una hora a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. La absorbancia se determinó a 490 nm en el lector de placas biotec (Elx808 Absorbance Multiplate Reader) siendo la absorbancia registrada proporcional al número de células viables.

Para el ensayo de viabilidad con (IP) se utilizaron células Huh-7 crecidas en placa de 24 pozos a una confluencia de ~80 % y se probaron las concentraciones antes mencionadas. Las células se trataron con ZM447439 durante 24 horas y posteriormente fueron levantadas con Tripsina-EDTA para a continuación inactivarlas con DMEM al 7% de suero, se centrifugaron 5 minutos a 900 RPM y se lavaron con PBS 1X estéril. Se preparó la solución de trabajo de IP (1 mg/mL) y se resuspendió el botón en 100 µL de esta solución, se incubaron durante 15 min a 37 °C protegidas de la Luz directa. Las células fueron leídas en el citómetro BD LSRFortessa, 10 000 eventos con el filtro PE-Rojo Texas. Los datos fueron analizados con el Software FlowJo V10.

16.6 Ensayo de focos para titulación de virus.

Los ensayos de focos se realizaron en células Huh-7 crecidas al 90% en placas de 96 pozos. Se realizaron diluciones limitantes de base 10 en medio Hanks (135 µL de medio y 15 µL de virus) hasta la dilución 8 para extractos de cerebro y dilución 4 para sobrenadantes. Las células se infectaron con 50 µL de cada dilución durante 2 hrs a 37 °C y posteriormente se adicionó medio completo al 10% de SFB durante 48 hrs. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el medio y las células se fijaron con 50 µL de PFA al 4% durante 20 minutos a 4°C, se permeabilizaron con solución PermWash (PBS 1X, SFB 1% y saponina 0.02%) durante 20 minutos, se

lavarón con 50µL de PermWash (PW) dos veces y se tiñeron con el anticuerpo primario (2H2 1:200) toda la noche a 4°C. Al día siguiente la monocapa se lavó 3 veces con 50-100 µL de PermWash y se tiñeron con el anticuerpo secundario FITC o Alexa 488 durante 2 hrs a temperatura ambiente protegidas de la Luz. Los focos fueron contados en el microscopio de epifluorescencia y el título viral se obtuvo empleando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{de placas a la dilucion correspondiente} \times 1000}{50} = \text{Título viral (UFF)}$$

16.7 Citometría de flujo para análisis de células infectadas por DENV.

Células Huh-7 fueron crecidas en placas de 24 pozos, hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80% fueron infectadas con DENV 2 durante 2 horas en medio DMEM al 1% de SFB sin antibióticos a 37 °C y 5% DE CO₂ (Medio de infección). Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el medio con virus y la monocapa se lavó con medio de infección y se agregaron a la monocapa 500 µL de medio completo con las distintas concentraciones del inhibidor de aurora cinasa B ZM447439 por 24 o 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento las células fueron levantadas con Tripsina-EDTA que posteriormente se inactivó con Medio completo. Las células se centrifugaron a 900 RPM durante 5 minutos, se lavaron con PBS 1X y se fijaron con 200 µL de PFA al 4% durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavaron con 1 mL de PBS 1X centrifugándolas a 2500 RPM durante 5 minutos. Se permeabilizaron con solución PW durante 20 minutos TA y una vez concluido el tiempo se lavaron con 500 µL de solución PW a 2500 RPM durante 5 minutos (En adelante, todos los pasos de lavado se realizaron bajo estas condiciones). Las células se tiñeron con el anticuerpo 2H2 toda la noche a 4°C y transcurrido el tiempo se lavaron 2 veces y se tiñeron con el anticuerpo secundario (Alexa 405 o Alexa 488). Las células fueron leídas en el citómetro BD LSRFortessa, adquiriendo 10 000 eventos utilizando el filtro FITC o Pacific Blue. Los datos fueron analizados con el Software FlowJo V10.

16.8 Determinación del antígeno viral NS1.

Para la determinación del antígeno viral NS1 se utilizó el kit comercial platelia Dengue NS1 Ag (BIORAD) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el kit consiste en un ensayo de ELISA de tipo Sandwich para la detección cualitativa y semicuantitativa del antígeno viral NS1 el cual utiliza anticuerpos monoclonales de ratón para su detección y revelado. La determinación de NS1 se llevó a cabo según recomendaciones del fabricante registrándose la absorbancia a 459 nm en el lector de placas Biotek ELx808 Absorbance Microplate Reader.

16.9 Ensayos de inhibición sobre células Huh-7 y su efecto sobre el ciclo viral.

Células Huh-7 fueron crecidas en placas de 24 pozos, cuando alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80% fueron infectadas con DENV 2 durante 2 horas en medio DMEM al 1% de SFB sin antibióticos a 37 °C y 5% DE CO₂. Posteriormente, el medio con virus fue retirado y remplazado con medio conteniendo las distintas concentraciones de ZM447439 (0 µM, 1 µM y 5 µM) durante 24 y/o 48 horas. Las células y el sobrenadante fueron manipuladas y/o almacenados para realizar distintas técnicas mencionadas.

16.10 Ensayos de luciferasa

Los ensayos de luciferasa se siguieron conforme a las instrucciones del fabricante, brevemente: las células Vero R4 fueron tratadas durante 24 y 48 h con ZM447439, posteriormente, fueron lavadas con PBS 1X y lisadas con el buffer de lisis, a continuación a las células lisadas se les agregó el substrato para luciferasa y las muestras fueron leídas en el Luminómetro. Los resultados fueron analizados en el software GraphPad Prism 6.

16.11 Ensayos de Inmunofluorescencia.

Se utilizaron tres esquemas distintos para la tinción celular. En el primero de ellos, las células Huh-7 se crecieron sobre laminillas y se utilizaron al alcanzar una confluencia aproximada del 50%, y se trataron durante 24 h a concentraciones de 0 µM, 1 µM y 5 µM de ZM447439. Posteriormente, las células fueron teñidas fijadas con p-formaldehído (PFA) al 4% por 20 min a TA y se permeabilizaron con acetona

fría durante 3 min con posteriores lavados con PBS 1X. El bloqueo de las preparaciones se llevó a cabo con solución de bloqueo por 45 min a 37 °C. Las monocapas fueron lavadas tres veces con PBS 1X y teñidas con el anticuerpo primario correspondiente toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se lavaron con PBS 1X y fueron teñidas con un anticuerpo secundario acoplado a fluorocromo por 2 h a TA. Las preparaciones se montaron con ayuda de VECTASHIELD Mounting Medium con DAPI (Vector Laboratories) y sellaron con esmalte para uñas, se almacenaron a 4 °C hasta su revisión en el microscopio.

16.12 Ensayos de Western Blot

Una vez terminada la electroforesis ya sea de sobrenadantes o proteínas celulares totales como se indica arriba, se omite el proceso de tñido/desteñido y se procede a transferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa mediante una cámara de transferencia semihúmeda (Bio Rad Power Pac 1000) a 19 Volts durante 45 min. La membrana de nitrocelulosa se tiñó reversiblemente con Rojo de Ponceau 5 minutos y bloqueó con una mezcla de TBS-Tween 0.1% mas 10% de Leche descremada durante 45 min a 37°C en agitación constante. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo correspondiente, toda la noche a 4 °C en agitación constante. Transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.1% varias veces para después incubar las membranas con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti conejo acoplado a Peroxidasa (HRP) durante 2 h a temperatura ambiente. Para revelar las membranas a través de la actividad peroxidasa se usó el kit West-Femto de Pierce.

16.13 Construcciones de Aurora Cinasa B

Para realizar las construcciones de AurKB putativa y mutantes se utilizó la secuencia de referencia NM_004217.3 depositada en GenBank. La secuencia fue amplificada a partir de RNA total extraído de células Huh-7 con el Kit *Gen Elute Mammalian total RNA miniprep* (Sigma-Aldrich) para posteriormente realizar la reacción de retrotranscripción con el kit *cDNA Eco Dry premix poli-A* (Takara, clontech). El cDNA se utilizó para amplificar la secuencia de AurKb utilizando los

primers F: 5'-caccATGGCCCAGAAGGAGAAC-3' y R: 5'-CGGGAAGTTAGACAGCGG-3' con las siguientes condiciones de reacción: 98°C 30', 98°C 10', 57.3°C 30', 72°C 1:30 (25 ciclos), extensión final de 72°C por 3:00, para amplificar un producto de PCR de 1304 pb y se observó en un gel de agarosa al 1% (90V por 42 min en buffer TAE).

Posteriormente, el producto de PCR fue tratado con la enzima Dpn1 (*New England Biolabs*) para eliminar el DNA molde metilado. El producto fue incubado 15 minutos a 37°C con 1 µL de la enzima seguido de un paso de inactivación por 5 minutos a 80°C. El producto tratado se insertó en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Brevemente: el vector y el producto se mezclaron con solución salina y agua y se incubaron 30 min a temperatura ambiente (25°C), 2 µL de la reacción de clonación se mezclaron con 50 µL de bacterias competentes *E. coli* estellar (Takara, Clontech) y fueron incubadas en hielo durante 30 min. Al finalizar el tiempo de incubación las bacterias fueron sometidas a choque térmico (42°C, 45') e incubadas en hielo por 5 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 50 µL de medio SOC seguido de una incubación por 1 h a 37 °C a una velocidad de 200 rpm. Finalmente las células fueron sembradas por estría masiva en una placa de agar con 100 µL de ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C.

Se comprobó que las colonias resistentes a ampicilina fueran positivas para el inserto mediante PCR colony utilizando los primers estándar F: T7 y R: bGH. El plásmido se purificó utilizando el Kit GenElute Plasmid mini prep (Sigma-Aldrich) siguiendo las condiciones del fabricante.

16.14 Ensayo de mutagénesis dirigida

Para realizar las mutantes de Aurora Cinasa B, se utilizó el Kit Q5 *Site-Directed mutagenesis* (New England Biolabs). El protocolo se realizó con las recomendaciones del fabricante utilizando como templado el plásmido para AurKB. Los primers para mutagenesis y la temperatura de alineamiento de estos fueron

diseñados utilizando el software NEBaseChanger.ned.com. Los primers resultantes se enlistan en la siguiente tabla 2.

La reacción de mutagenesis se realizó bajo las siguientes condiciones: 98°C 30', 98°C 10', 64°C/70°C/62.6°C 30' (106m, 200m y 232 respectivamente), 72°C 5:00 (25 ciclos), extensión final de 72°C por 5:00, 8°C ∞.

El producto de la reacción fue tratado con la Mezcla *KLD Mix* (New England BioLabs) utilizando 0.5 µL del producto de PCR, 2.5 µL del buffer de reacción 2X KLD, 0.5 µL de 10X KLD Enzyme Mix y 1.5 µL agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 22°C durante 5 min, finalmente, el volumen total de la mezcla se utilizó para transformar bacterias competentes utilizando el método antes descrito.

Tabla 2.
Primers diseñados para el ensayo de mutagenesis dirigida

Oligo	Secuencia	Mutación
F: AurKB106mK/R	5' GTGGCGCTCA _g GGTCCTCTTC 3'	K / R
R: AurKB106mK/R	5' GATGAAATGGCTTTTCTTCTCCC 3'	AAA/AGA
F: AurKB200mD/H	5' GATTCACAGAcACATAAAGCCAGAAAATC 3'	D / F
R: AurKB200mD/H	5' ACCTTCTTCCCATGGCAG 3'	GAC/CAC
F: AurKB232mT/A	5' GAGGAGGAAG _g CAATGTGTGGCAC 3'	T / A
R: AurKB232mT/A	5' AGGGAGGGCGCATGCACA 3'	ACA/GCA

Se realizó *PCR colony* de la manera anteriormente descrita para comprobar la presencia de las mutaciones en el plásmido. Finalmente, el plásmido fue enviado a secuenciación para corroborar la identidad de mutación utilizando los primers estándar F: T7 y R: bGH (SourceBioScience, Nottingham, UK).

El análisis de las secuencias y plásmidos fue realizado en los Softwares: SnapGene Viewer V. 4.0.5, FinchTV y MEGA7.

17. RESULTADOS

17.1 Análisis de la fosforilación y acetilación de la Histona H3 durante la infección por DENV 2 en células Huh-7.

Inicialmente se analizó el efecto que tenía la infección por DENV 2 en la fosforilación y acetilación de la histona H3 en células Huh-7 a las 24 y 48 h.p.i. Para esto, se llevó a cabo un ensayo de ELISA utilizando el Kit EpiQuik Histone H3 Modification Multiplex Assay (Epigentek, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El resultado del ensayo mostró una disminución importante en la acetilación de la lisina 9 y 18 a las 24 y 48 h.p.i. con DENV 2, siendo más evidente en la lisina 9 (H3K9ac) a las 24 h.p.i. Esta marca es removida principalmente por la deacetilasa de histona 1, la cual puede ser inhibida por el butirato de sodio (**Figura 12 A**).

En el caso de la fosforilación, se analizaron la serina 10 y 28, observándose una disminución en los niveles de fosforilación principalmente a las 24 h.p.i en la serina 10 la cual es regulada por la Aurora Cinasa B, y se sabe que tiene un papel importante en la replicación de HCV (**Figura 12 B**).

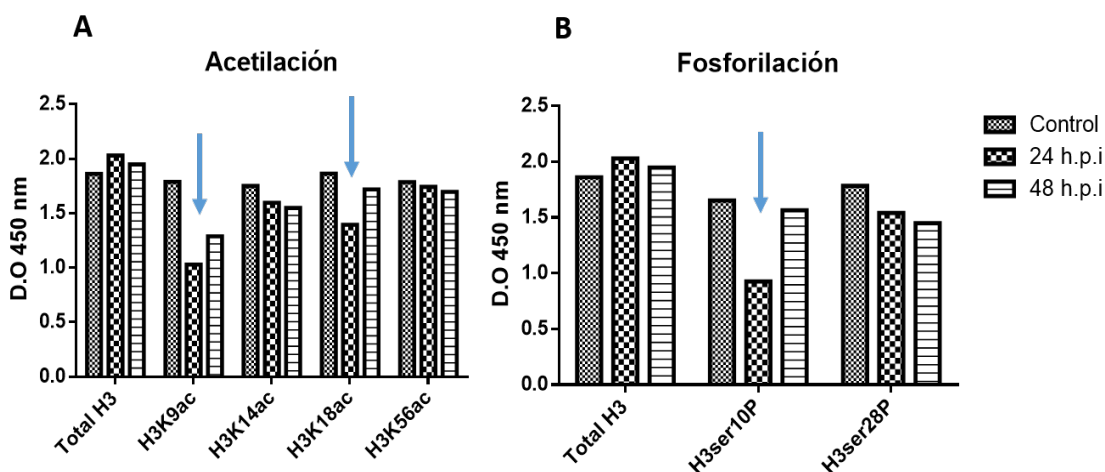


Figura 12. Modificaciones postraduccionales en la histona H3. Se analizaron las modificaciones postraduccionales en la Histona H3 durante la infección por DENV 2 por 24 y 48 como una primera aproximación. Se observa una disminución en los niveles de acetilación (Lisina 9 y 18) y fosforilación (Serina 10) a las 24 h.p.i.

El resultado nos sugiere que durante la infección por DENV 2 se llevan modificaciones epigenéticas relacionadas a activación transcripcional (Acetilación) y regulación del ciclo celular (Fosforilación).

17.2 Efecto del butirato de sodio sobre el metabolismo/viabilidad de las células Huh-7.

Con la finalidad de determinar si la presencia de inhibidor de decetilasas de histona de clase I, Butirato de Sodio (BuNa), modificaba el metabolismo/viabilidad de la línea celular Huh-7 estas se expusieron a distintas concentraciones del fármaco (desde 1 mM hasta 10 mM) durante 24 h a través y se midió la reducción de MTS a MTT, midiendo así la actividad mitocondrial de las células tratadas. La concentración más alta utilizada (10 mM) fue seleccionada con referencia en trabajos previos en donde a esta concentración se observaba muerte celular (155)

Ninguna de las concentraciones empleadas altera el metabolismo/viabilidad de nuestra línea celular cuando se comparan frente al control. Por lo que para llevar a cabo nuestros ensayos se decidió evaluar el efecto de las concentraciones de 2 mM, 4 mM y 6 mM de BuNa (**Figura 13**),

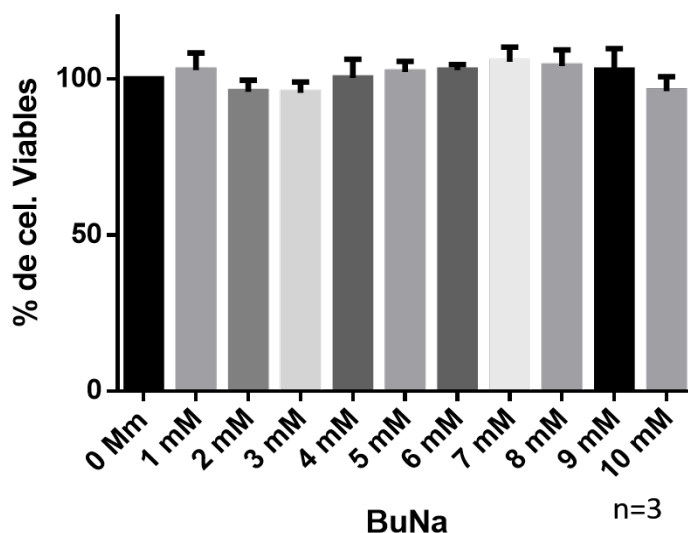


Figura 13. Ensayos de Metabolismo/Viabilidad celular durante el tratamiento con BuNa. Los ensayos de reducción de MTS durante el tratamiento de la línea celular Huh-7 no tuvieron efecto negativo en el metabolismo/viabilidad durante 24 h de tratamiento. La presencia de BuNa no modifica el metabolismo celular a ninguna de las concentraciones probadas. La grafica muestra el promedio de tres experimentos independientes.

17.3 Ensayo de focos para análisis de la progenie viral durante el tratamiento con BuNa

Una vez comprobado que las concentraciones seleccionadas del fármaco no interferían con la viabilidad celular procedimos a analizar si el BuNa podría afectar la producción de partículas virales a través de ensayo de focos del sobrenadante obtenido a las 24 h de tratamiento e infección.

En el resultado se observó que a las 24 h las concentraciones de 4 mM y 6 mM afectaban la producción de partículas virales en un 83% y 54% respectivamente ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente) (**Figura 14**) mientras que la concentración menor no afectó significativamente la producción de estas. Este resultado parece indicar que la inhibición de las HDACs de clase I a través del butirato de sodio a las concentraciones usadas, afecta la producción de partículas virales de DENV 2.

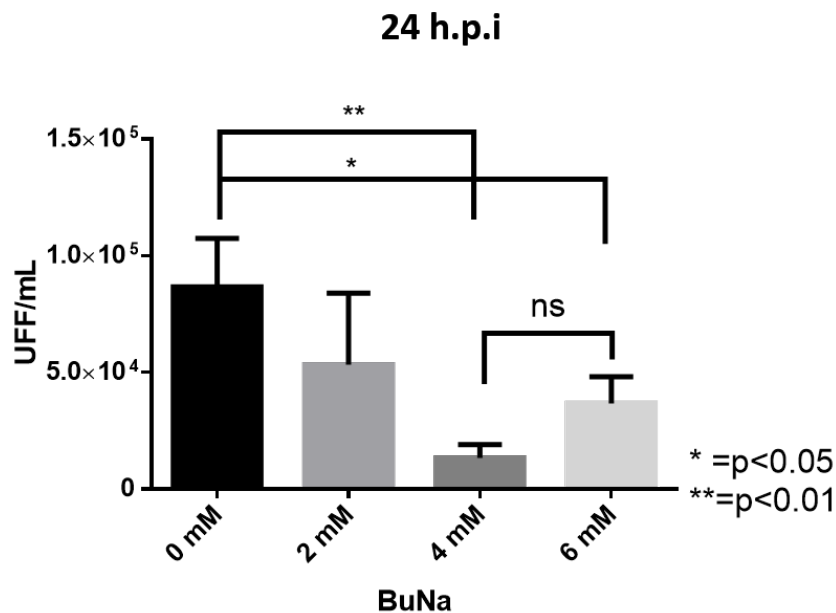


Figura 14. Ensayo de focos del sobrenadante de células infectadas con DENV 2 y tratadas con BuNa. Las células Huh-7 fueron infectadas y tratadas durante 24 h con BuNa para posteriormente medir por ensayo de focos la producción de partículas virales. **UFF:** unidades formadoras de focos. La grafica muestra el promedio de tres experimentos independientes.

17.4 Ensayos de luciferasa en células tratadas con Butirato de sodio.

Para analizar sobre paso de la replicación viral pudiera estar actuando BuNa se utilizó un sistema de replicón el cual contiene únicamente en las proteínas no estructurales de DENV 4 acopladas al gen reportero para Luciferasa y que se expresa en células Vero, este ensayo nos permite analizar la replicación del genoma viral en presencia de BuNa. La actividad luciferasa fue medida con el kit Luciferase Assay System (Promega).

Las células Vero se trataron por 24 y 48 h con 2,4 y 6 mM de BuNa y se analizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, el resultado mostró que tanto a las 24 como 48 h de tratamiento las concentraciones de 4 y 6 mM modificaban negativamente la replicación del genoma viral siendo el efecto dependiente de la concentración y del tiempo. El efecto fue más evidente a las 48 h de tratamiento y sugiere que la actividad de las HDAC de clase I es importante para la replicación del genoma de DENV 2 (**Figura 15**).

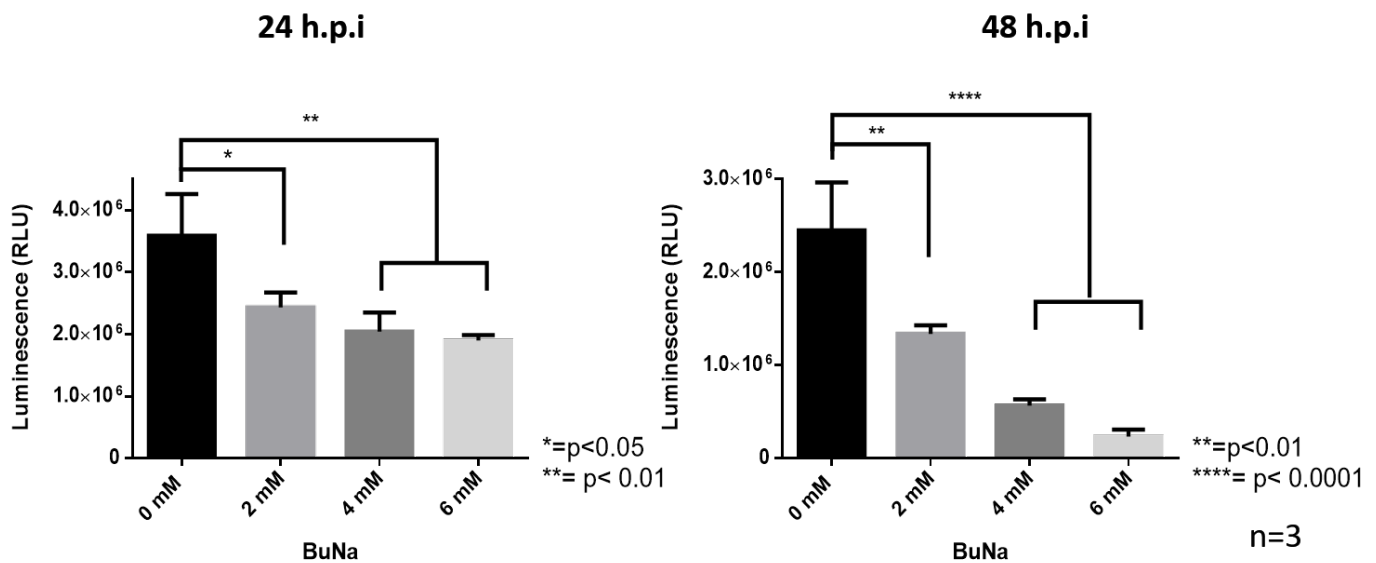


Figura 15. Inhibición de la replicación de DENV por BuNa. Se llevaron a cabo ensayos de luciferasa a las 24 y 48 h de tratamiento con BuNa. A y B) BuNa inhibe la replicación de DENV de manera dependiente de concentración y de tiempo. La grafica muestra el promedio de tres experimentos independientes.

La importancia de la acetilación/deacetilación se ha demostrado principalmente en la infección por VIH, en donde la inhibición de HDACs de clase I ha demostrado inducir la expresión del genoma proviral permitiendo así la ubicación y eliminación de los reservorios virales por parte del sistema inmune del huésped (156, 157).

En el presente trabajo observamos que la inhibición de estas enzimas con BuNa interviene en el ciclo de replicación de DENV, lo cual sugiere que las HDACs de clase I pueden ser importantes para la replicación viral, de manera particular en la síntesis del genoma de DENV 2.

17.5 Ensayos de viabilidad a distintas concentraciones de ZM447439

Se conocen una amplia gama de inhibidores para Aurora Kinasa B, tanto específicos como generales que afectan también la actividad de los otros miembros de la familia. De entre ellos los más usados en la investigación y que se conoce su mecanismo de acción y efecto son Hesperadina, AZD1152 y ZM447439, debido a que este último ya había sido utilizado en ensayos con HCV (Flavivirus) y de que varios artículos experimentales reportan su acción específica sobre AurKB sin interferir con otras proteínas del ciclo celular como cdc2, cdc5, MPAK o ciclina B, es por esto que ZM447439 fue seleccionado como inhibidor de la actividad cinasa de AurKB durante la infección por DENV 2 (158).

AurKB es considerado uno de los reguladores maestros del ciclo celular, por lo cual inhibir su actividad enzimática puede comprometer la viabilidad o el metabolismo celular, para descartar lo anterior realizamos ensayos de viabilidad con yoduro de propidio y analizamos el metabolismo celular a través de la reducción de MTS en las células tratadas durante 24 y 48 horas.

Para realizar ambos ensayos se consultó la literatura y se seleccionaron las concentraciones de 0 μ M, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M de ZM447439 siendo 0 μ M el vehículo (DMSO). Como se puede observar en la **figura 16 A** que corresponde a la viabilidad medida con yoduro de propidio, solo a la concentración más alta usada que fue de 15 μ M existe un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de células

mueras comparadas con las células no tratadas. También encontramos que el DMSO no interfirió con la integridad celular.

Por su parte, al medir el metabolismo celular a través de la reducción de MTS (**Figura 16 B**) ninguna de las concentraciones utilizadas del fármaco o el vehículo mostraron alteración estadísticamente significativa frente a células no tratadas. Ambos resultados indican que se pueden utilizar concentraciones menores a 15 μM de ZM447439 para inhibir AurKB sin afectar metabolismo o viabilidad de la línea celular Huh-7. Es por esto que se decidió utilizar las ZM447439 a concentraciones de 0 μM , 1 μM y 5 μM .

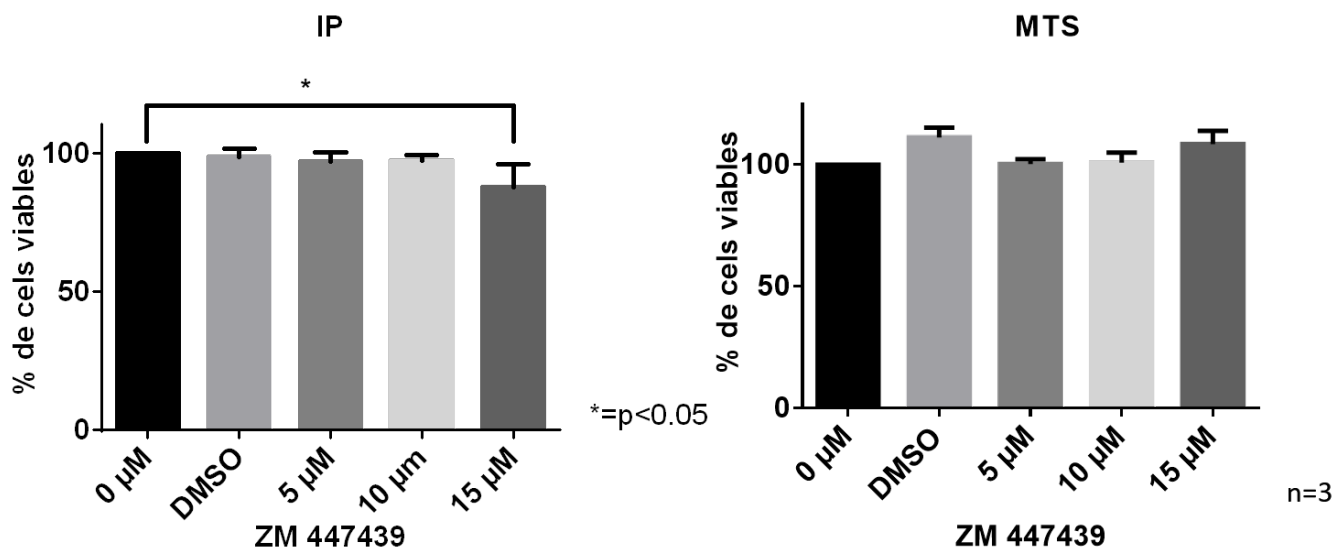


Figura 16. Ensayos de Metabolismo y Viabilidad celular durante el tratamiento con ZM447439. A) ensayos de yoduro de propidio (IP) para el análisis de la viabilidad celular en presencia de ZM447439. B) Ensayos de reducción de MTS a MTT para evaluar el metabolismo de las células tratadas con ZM447439.

17.6 Inhibición de la actividad catalítica de AurKB durante el tratamiento con ZM447439

La fosforilación de los residuos de serina 10 y 28 de la histona H3 es una de las funciones que se han descrito para AurKB, es por esto que se quiso analizar si efectivamente el tratamiento con ZM447439 inhibía la actividad cinasa de AurKB,

para lo anterior se realizó un ensayo de Western Blot (WB) para detectar la fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (H3S10p) a las 24 h de tratamiento. Se extrajeron histonas por el método descrito en materiales y métodos y se sometieron 5 μ g de proteína a SDS-PAGE al 16%.

El resultado del WB muestra que en cualquiera de las concentraciones usadas de ZM447439 la fosforilación de la histona H3 disminuye. Como control de carga se utilizó la histona H3 total y además se analizó la acetilación del residuo lisina 9 de la histona H3, en este último, se observó un ligero aumento en la

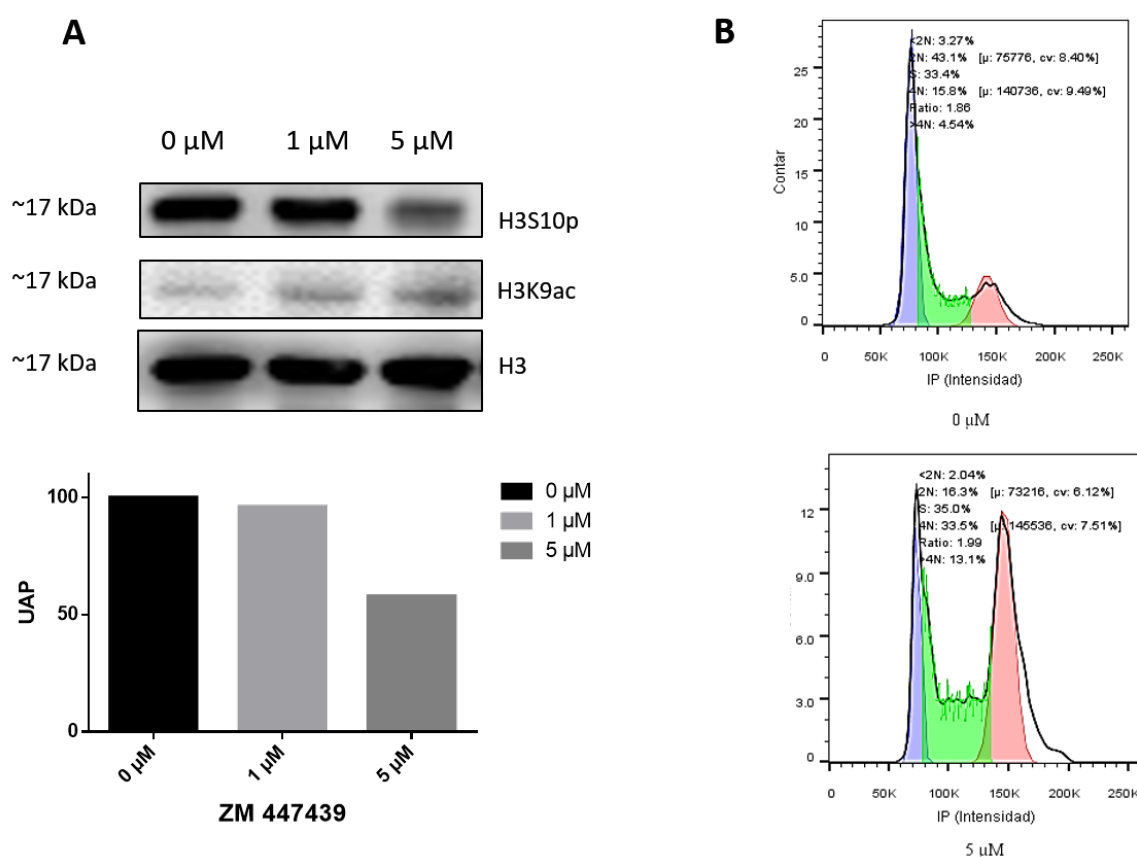


Figura 17. Ensayos de la actividad inhibitoria de ZM447439 sobre AurKB. Para evidenciar acción de ZM447439 se llevaron a cabo A) ensayos de western blot anti H3S10p, ya que la fosforilación de este residuo es llevada a cabo por AurKB y B) se analizó el ciclo celular en presencia de 5 μ M de ZM447439 observándose un aumento en la población detenida en la fase G2/M. **UAP:** Unidad arbitraria de proteína.

presencia de la marca. De esta manera comprobamos que el tratamiento con ZM447439 inhibía la actividad cinasa de AurKB disminuyendo los niveles de

fosforilación de la histona H3 de manera específica sin alterar al menos otro tipo de marca epigenética en la histona H3 (**Figura 17 A**).

Otra manera de comprobar que el tratamiento con ZM447439 funcionaba sobre la actividad de AurKB fue analizar el ciclo celular ya que AurKB es necesaria para la transición de la fase G2/M de este. Para tal objetivo células Huh-7 tratadas con ZM447439 durante 24 horas se levantaron y tiñeron con una solución de yoduro de propidio y RNAsa durante 15 minutos para analizar el ciclo celular por Citometría. El resultado fue un aumento en el porcentaje de células detenidas en fase G2/M a la concentración de 5 μ M de ZM447439 (**Figura 17 B**).

Ambos resultados nos indicaron que ZM447439 inhibe efectivamente a AurKB a los tiempos y concentraciones empleadas.

17.7 Análisis la progenie viral durante el tratamiento con ZM447439.

Para analizar si la inhibición de AurKB afectaba la producción de partículas virales se determinó el título del virus en el sobrenadante de las células mediante ensayo de focos.

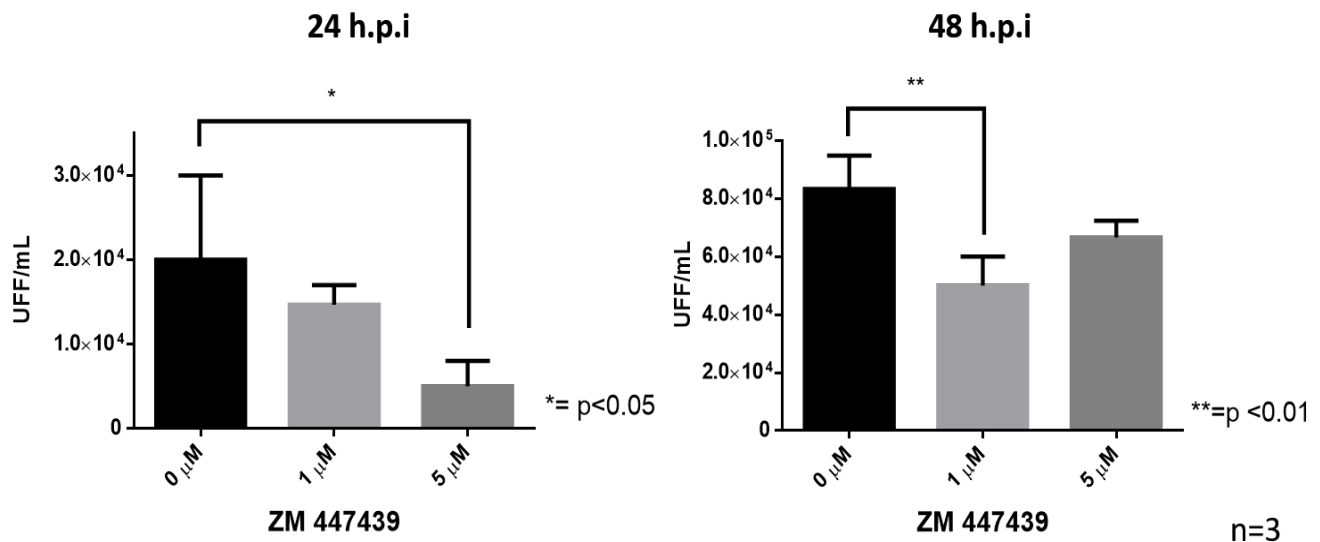


Figura 18. Análisis de la progenie viral durante la inhibición de AurKB. Se analizó la producción de partículas infecciosas de las células tratadas con ZM447439 durante A) 24 h y B) 48 h. **UFF:** Unidades formadoras de focos. Las gráficas muestran la suma de 3 experimentos independientes.

Para esto, infectamos y tratamos células Huh-7 durante 24 y 48 h con las concentraciones antes mencionadas de ZM447439, posteriormente, se analizó la producción de progenie viral. Como se observa en la **figura 18 A** a las 24 h únicamente existe disminución en la producción de partículas virales cuando las células son tratadas con 1 μM de ZM447439 ($p < 0.05$). Caso contrario, sucede a las 48 h en donde solo en células tratadas con 5 μM del fármaco se encontró que la

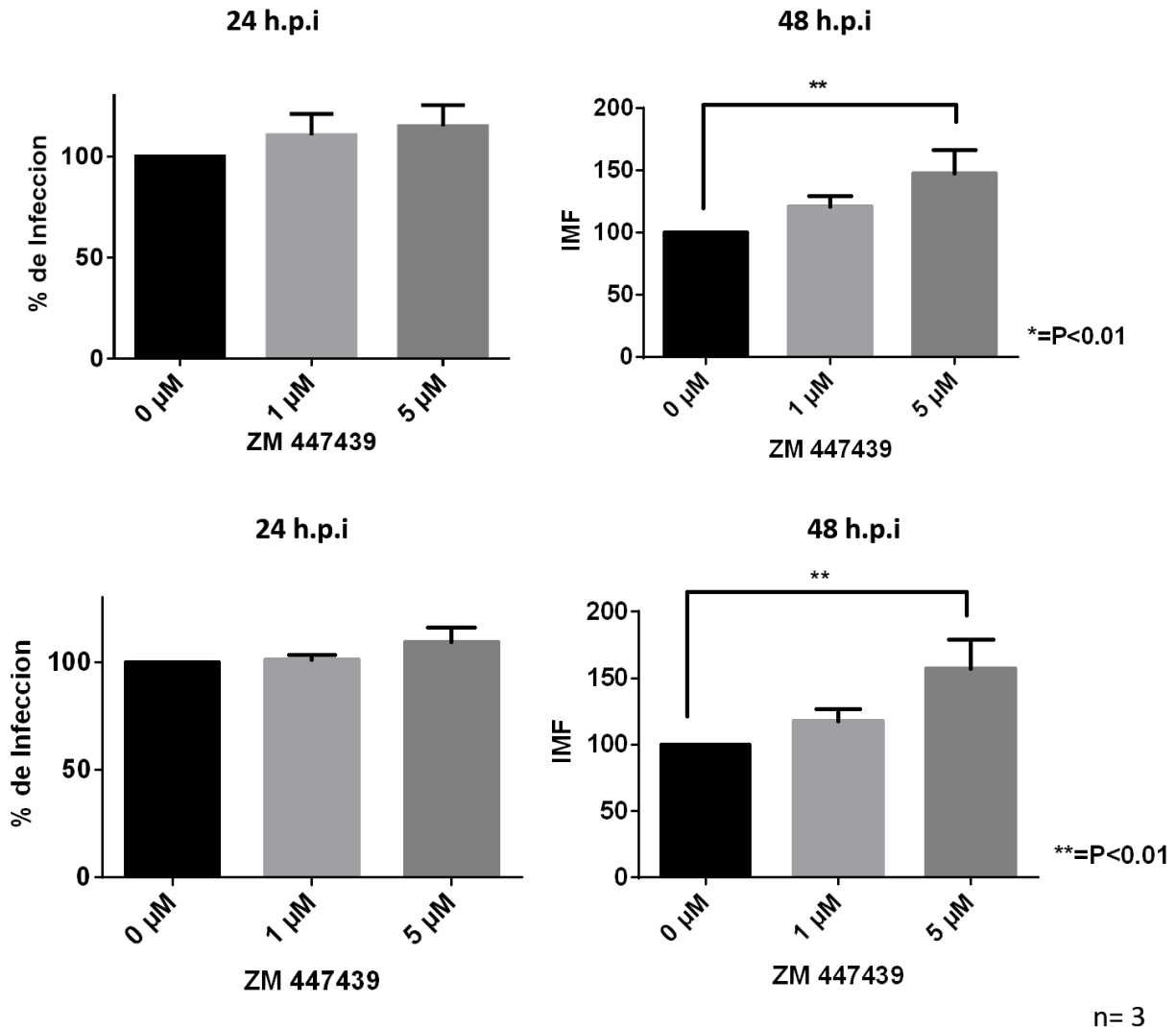


Figura 19. El tratamiento con ZM447439 no modifica el porcentaje de células infectadas pero si la IMF. Las células Huh-7 se infectaron con DENV2 en ausencia o en presencia de ZM447439 y a las 24 y 48 h.p.i. se determinó el porcentaje de células infectadas (A) o la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) (B). La gráfica representa los resultados de 3 experimentos independientes.

disminución de la progenie viral es estadísticamente significativa ($p < 0.01$), de esta manera la inhibición de la actividad cinasa de AurKB afecta la producción de partículas virales de DENV 2 a las 24 y 48 h.p.i., lo siguiente en analizar es el porcentaje de células infectadas y el paso del ciclo replicativo con el cual ZM447439 podría interferir (**Figura 18 B**).

17.8 Análisis de infección de células tratadas con ZM44743.

Las células Huh-7 fueron infectadas con DENV 2 y tratadas con 0 μM , 1 μM y 5 μM de ZM447439 durante 24 y 48 h para posteriormente analizar el porcentaje relativo de células infectadas así como la intensidad media de fluorescencia (IMF) por Citometría de flujo.

A los tiempos que se analizaron se observó que en las células infectadas y tratadas no había alteración estadísticamente significativa en el porcentaje relativo de células infectadas en ninguno de los tiempos analizados (**Figura 19 A y 19 B**), pero, posteriormente al analizar la Intensidad Media de Fluorescencia de estas células se encontró que aumentaba únicamente en aquellas que habían sido tratadas con 5 μM tanto a las 24 como 48 horas (**Figura 19 B**). Este resultado sugiere que si bien el tratamiento no induce un aumento de las células infectadas por alguna razón si induce un incremento estadísticamente significativo ($P < 0.01$ en la fluorescencia de estas cuando son tratadas con 5 μM de ZM447439).

17.9 Alteración en la traducción de proteínas virales durante la inhibición de AurKB

Una vez que observamos que la inhibición de la actividad de AurKB inducía un aumento en la IMF de las células infectadas y una disminución en la producción de progenie viral procedimos a analizar la traducción de las proteínas mediante la detección de la proteasa NS3 por western blot y la secreción de NS1 a través del kit platelia Dengue NS1 Ag (BIORAD), ya la traducción es un paso necesario para la formación de partículas infecciosas durante el proceso de infección.

Como se observa en la **figura 20** la traducción de NS3 no se ve alterada a las 24 o 48 h en ninguna de las concentraciones de ZM447439 usadas, comparadas

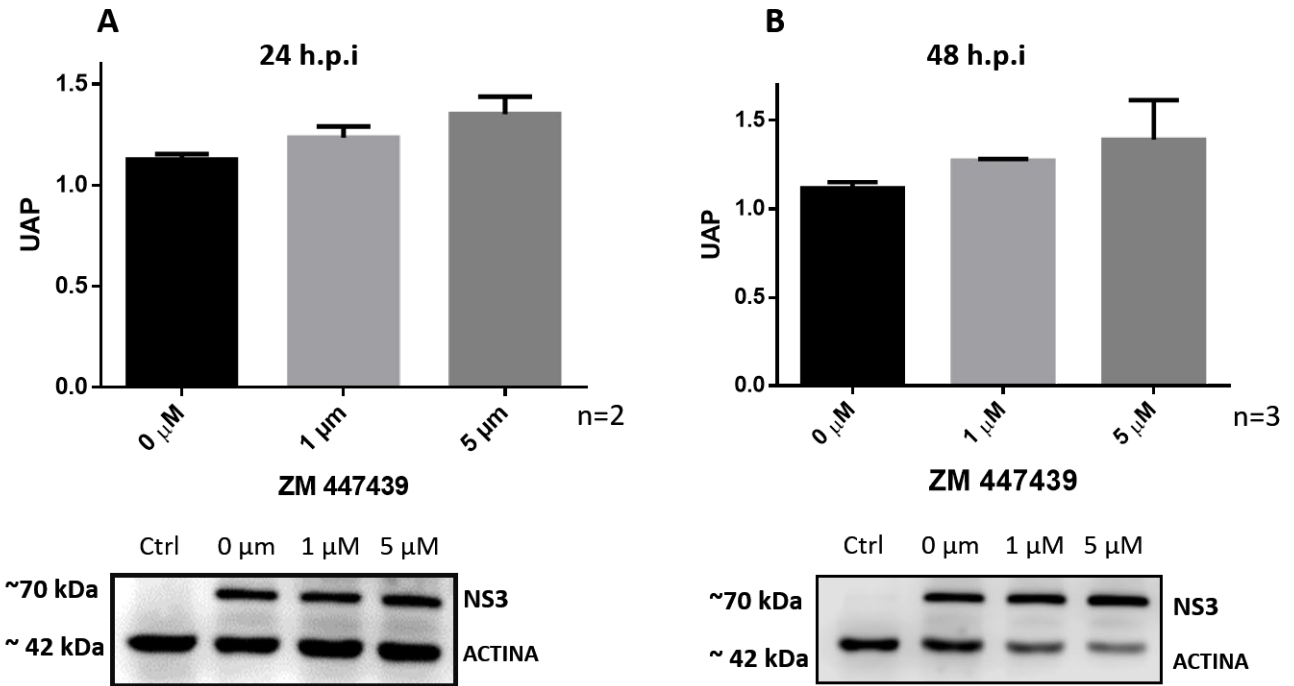


Figura 20. La inhibición de AurKB no modifica la expresión de la proteasa viral NS3. Se analizó la producción de proteína viral (NS3) en presencia de ZM447439 a las A) 24 y b) 48 h.p.i. sin observarse modificación en la expresión a ninguno de los tiempos y/o concentraciones usadas. **UAP:** unidad arbitraria de proteína. Las gráficas muestran la suma de 3 experimentos independientes.

frente al control, si bien existe un ligero aumento en cada una de los tratamientos este no es estadísticamente significativo

Posterior a esto, se procedió a cuantificar la secreción de la proteína NS1 en el sobrenadantes de las células infectadas y tratadas y tampoco se encontró alguna alteración estadísticamente significativa, lo que sugiere que el tratamiento con ZM447439 no afecta la vía secretora (**Figura 21**).

17.10 ZM447439 no altera la replicación del genoma viral utilizando el sistema de replicón de DENV en células Vero.

Para determinar el efecto de la inhibición de AurKB en la replicación del genoma de DENV se utilizó un sistema de replicón en células Vero. Las células fueron tratadas durante 24 y 48 h con ZM447439 y posteriormente se lisaron para

obtener un extracto proteico en el cual se midió la expresión del gen reportero para luciferasa siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega).

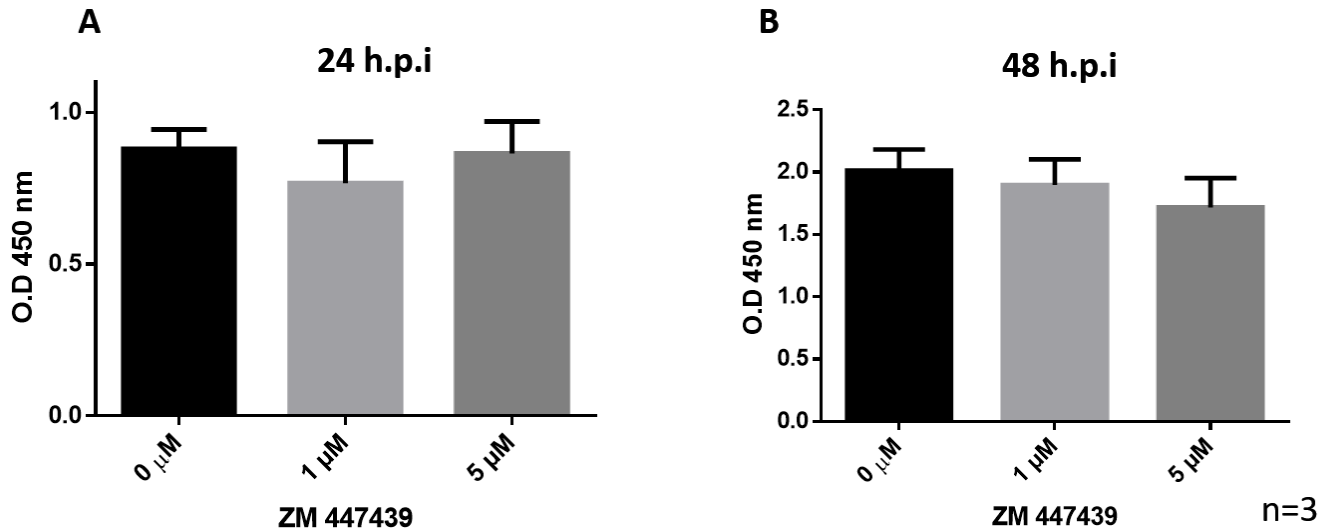


Figura 21. Secreción de la proteína viral NS1. La inhibición de AurKB no modifica la producción NS1 ni altera la vía secretora de la proteína a las A) 24h o B) 48 h. Las gráficas muestran la suma de 3 experimentos independientes.

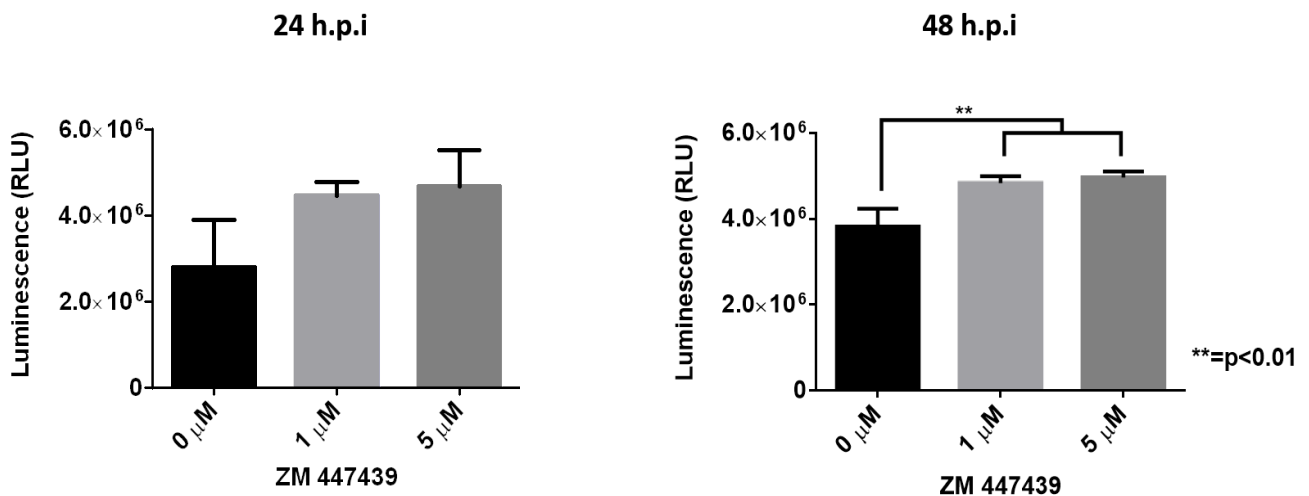


Figura 22. Ensayo de luciferasa para medir la replicación del genoma viral durante la inhibición de AurKB. A) a las 24 h.p.i. no se observa modificación en la replicación del genoma viral en cambio a las B) 48 h.p.i. ambas concentraciones de ZM447439 incrementan la replicación del genoma de DENV. **RLU:** Relative luminescence unit. Las gráficas muestran la suma de 3 experimentos independientes.

Durante las primeras 24 h de tratamiento no hay modificación estadísticamente significativa en la actividad de luciferasa cuando se comparan las células tratadas frente el control (**Figura 22**). En cambio a las 48 h post-tratamiento ambas concentraciones usadas de ZM447439 (1 μ M y 5 μ M) causan un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) en la señal de luciferasa lo cual indica que el tratamiento induce un aumento en la replicación del genoma viral y en la traducción de proteínas. Esto en parte puede explicar el aumento en la IMF observado en el ensayo de Citometría.

17.11 La inhibición de AurKB altera la integridad de los complejos de replicación.

Una vez analizada la producción de progenie viral durante el tratamiento con ZM447439 y observarse una disminución pero sin alterar el porcentaje relativo de células infectadas y la producción de proteínas virales, la siguiente pregunta a responder fue observar los complejos de replicación a través de microscopía confocal. Para realizar esto células infectadas y tratadas durante 24 y 48 h fueron teñidas con anticuerpo anti-NS4A y anti-dsRNA, ambos componentes esenciales de los complejos replicativos de DENV. En la **Figura 23 A** se muestra la distribución normal de NS4A (en rojo) y dsRNA (Verde) colocalizando (Amarillo) de manera perinuclear (núcleos teñidos con DAPI) (**Figura 24 A**).

A las 24 h de tratamiento con 1 μ M de ZM447439 se observan cambios en la distribución de NS4A y dsRNA y aunque aún se muestran perinucleares ya no se observa una colocalización tan fuerte como la observada en el control, **Figura 23 B** y **Figura 24 B**. Cuando las células son tratadas con 5 μ M del fármaco se observa una mayor dispersión tanto de NS4A y dsRNA y por lo tanto una marcada descolocalización (**Figura 23 C** y **Figura 24 C**) lo cual nos indica que la integridad de los complejos replicativos durante la inhibición de AurKB se encuentra comprometida. Este mismo efecto de reducción de la colocalización también se observa a las 48 horas, (**Figura 25 B** y **C**).

Ambos resultados muestran que al inhibir la actividad cinasa de AurKB se altera la distribución de los complejos replicativos, lo cual se deduce por la reducción en el patrón de colocación de la proteína NS4A y el RNA de doble cadena viral, siendo NS4A necesaria para la formación de los complejos de replicación y el dsRNA residente de los CRs. Por tanto, es posible sugerir que la inhibición de AurKB por ZM447439 desestabiliza los complejos de replicación y podría afectar procesos virales como ensamble y/o morfogénesis viral.

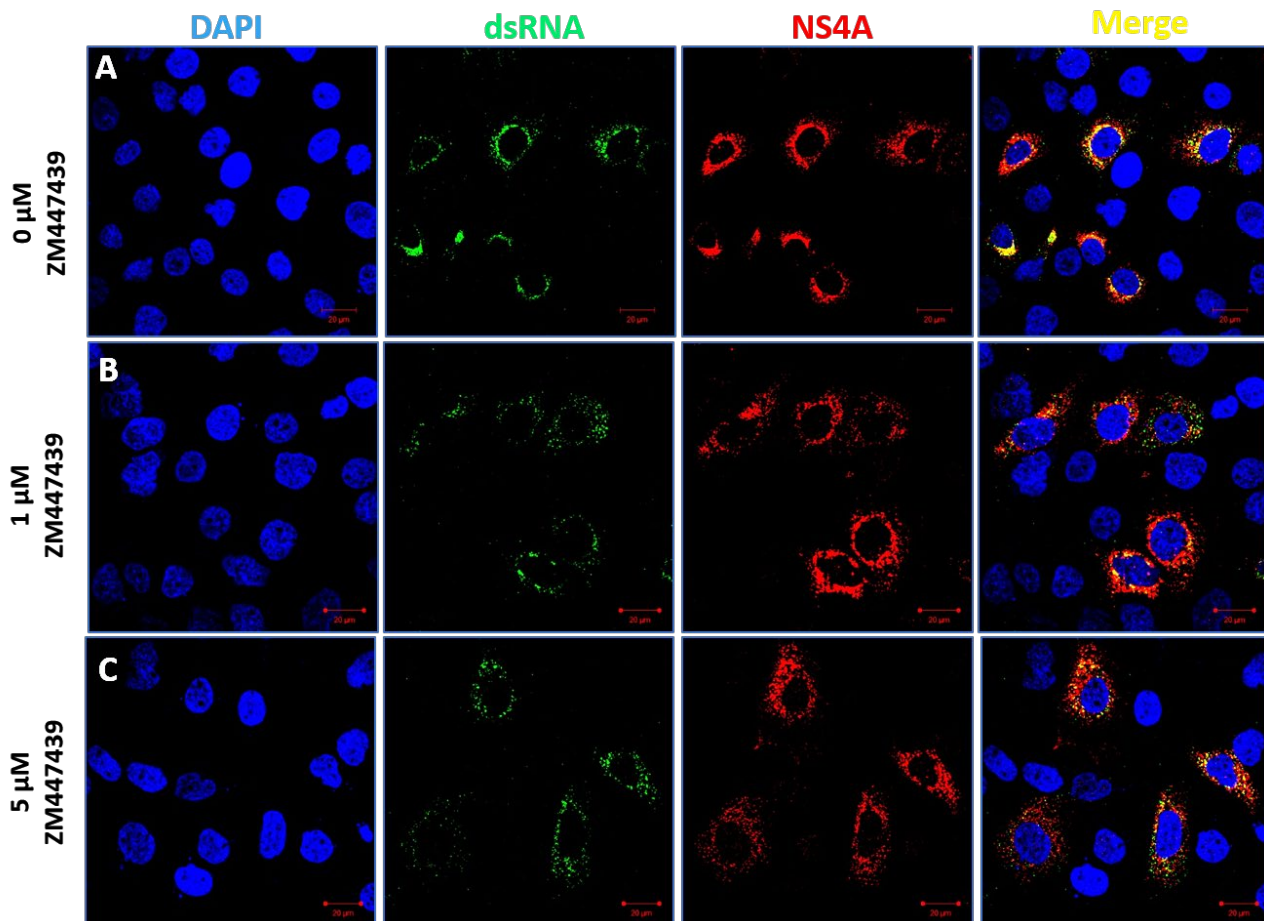


Figura 23. Complejos de replicación teñidos con NS4A y dsRNA durante la inhibición de AurKB por 24 h. NS4A y dsRNA son componentes virales presentes en los complejos de replicación durante el ciclo de replicación de DENV. Las células Huh-7 infectadas y tratadas o no con diferentes concentraciones de ZM447439 fueron teñidas a las 24 h.p.i. con anticuerpos anti-NS4A (verde) y anti-dsRNA (rojo) y las células se analizaron por microscopía confocal. Imágenes representativas se muestran en la figura.

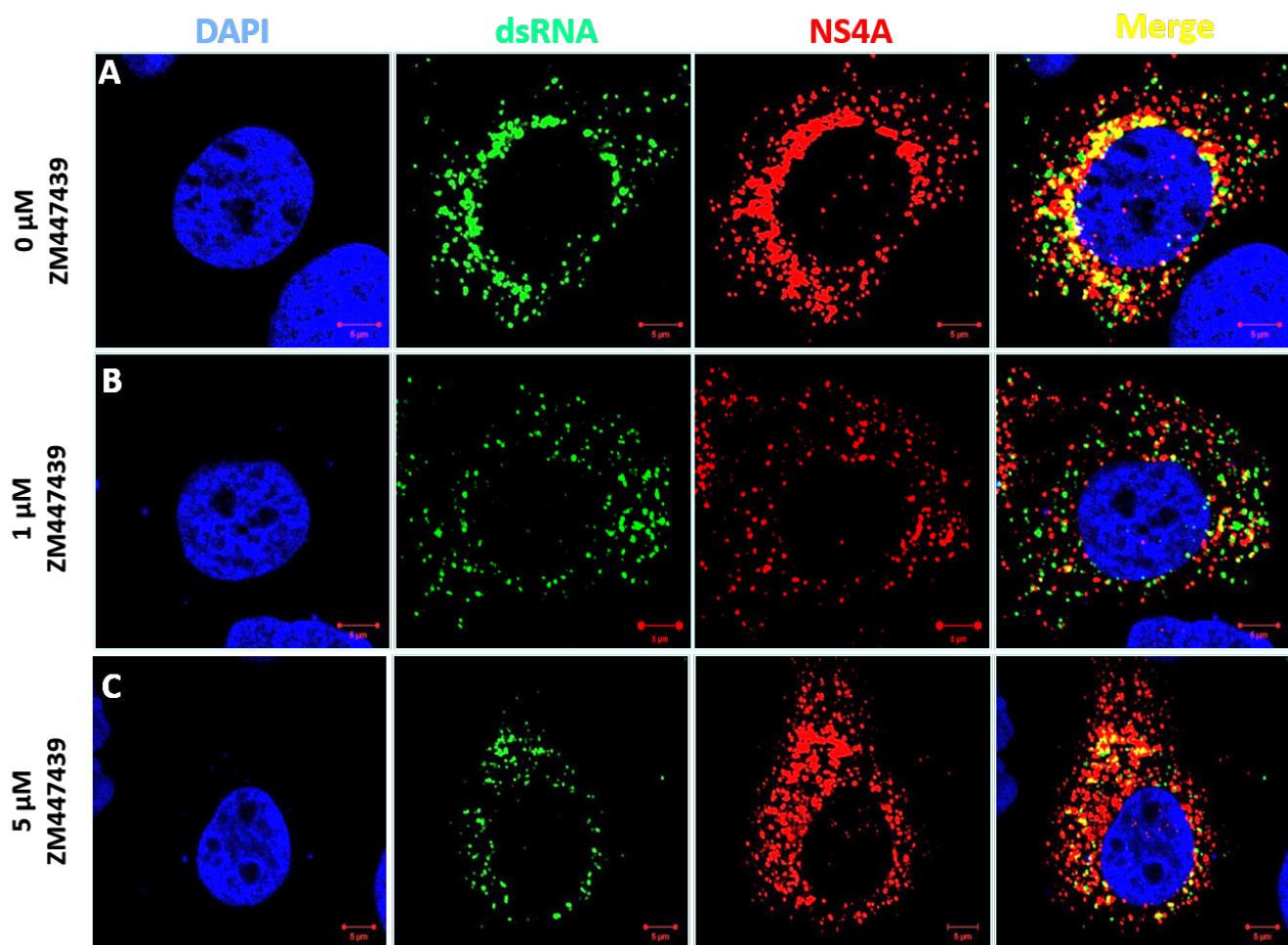


Figura 24. Deslocalización de componentes de complejo de replicación durante inhibición de AurKB por 24 h. A) La distribución de complejos de replicación en ausencia de ZM447439 se observan perinucleares mientras que en presencia del fármaco B y C) los complejos de replicación se distribuyen en el citoplasma de la célula.

17.12 La inhibición de AurKB modifica la localización de proteínas Estructurales

Hasta el momento se ha analizado la localización y distribución de los componentes del CR que comprenden proteínas no estructurales, sin embargo, también fue de nuestro interés analizar proteínas estructurales como la de la envoltura (E). Para esto se utilizó el anticuerpo 4G2 que reconoce el dominio DII de la proteína y que es responsable de llevar a cabo la fusión de la membrana viral con la endosomal, Este dominio está altamente conservado entre los flavivirus.

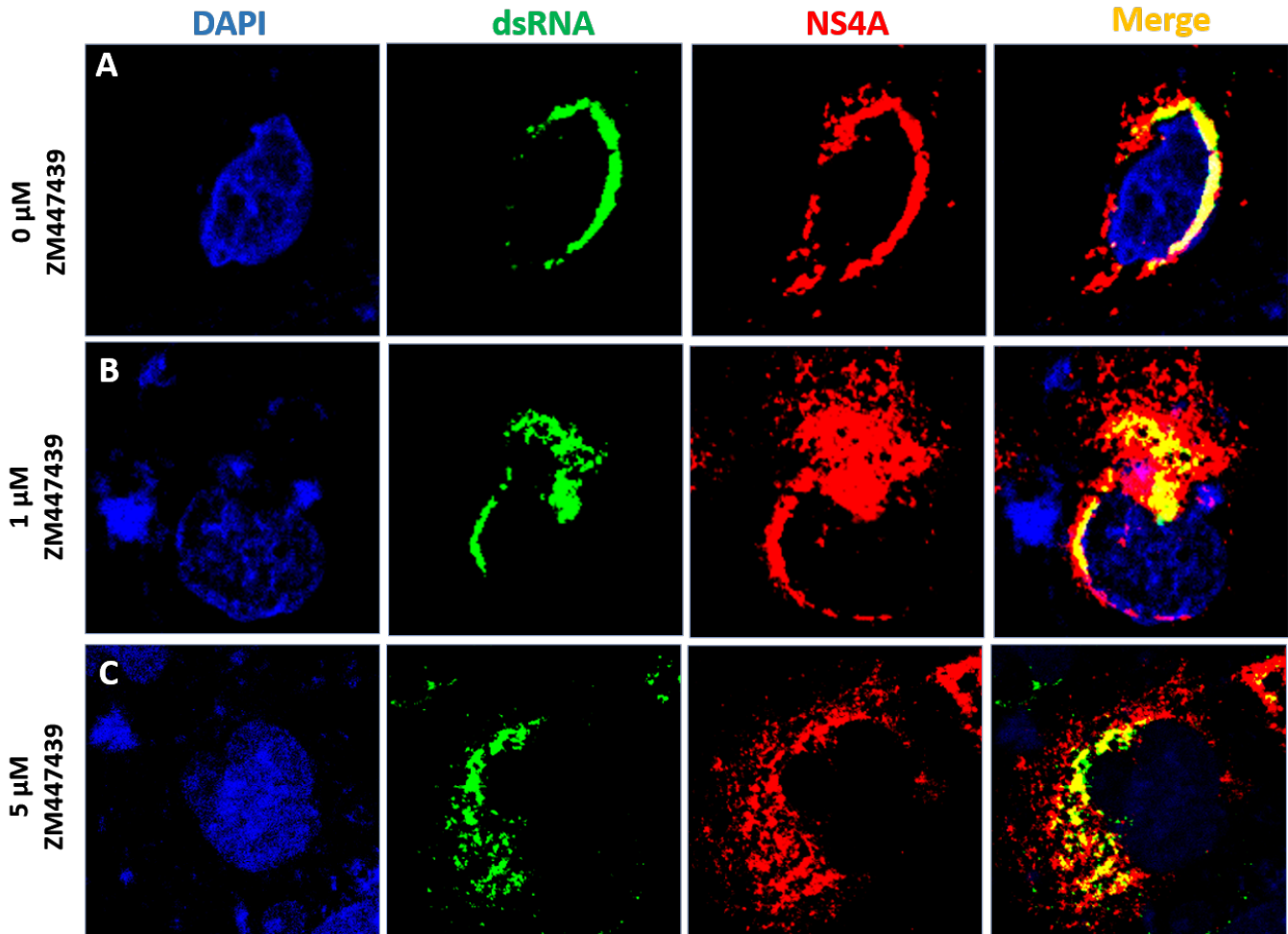


Figura 25. Modificación de los complejos replicativos a las 48 h de inhibición de AurKB. Imágenes representativas de células Huh-7 infectadas y tratadas (panel B y C) o no (panel A) con diferentes concentraciones de ZM447439 fueron teñidas a las 48 h.p.i. con anticuerpos anti-NS4A (verde) y anti-dsRNA (rojo) y analizadas por microscopía confocal.

Para este ensayo, se utilizaron células Huh-7 siguiendo las mismas condiciones de infección y tratamiento que los ensayos de inmunofluorescencia mostrados anteriormente durante 24 h; las células se tiñeron con anticuerpo 4G2 (anti-E) y anti-NS3. En las células control se observó la señal para ambas proteínas alrededor del núcleo, en cambio algunas de las células tratadas con 1 y 5 μM de ZM447439 se observó dispersión de la señal para E (Verde) así como para NS3 (Roja) en el citoplasma, de una manera muy similar a lo observado con NS4A y dsRNA (Figura 26 y 27).

17.13 ZM447439 modifica la localización de la proteína de la cápside

Se sabe que para llevar a cabo los procesos de ensamblaje y morfogénesis viral es necesaria la participación de la proteína C y su presencia en complejos de replicación. Para analizar la localización de la proteína de la cápside durante la inhibición de AurkB células infectadas y tratadas con ZM44739 las cuales fueron teñidas con el anticuerpo anti-Cápside y anti-dsRNA y analizadas mediante microscopia confocal.

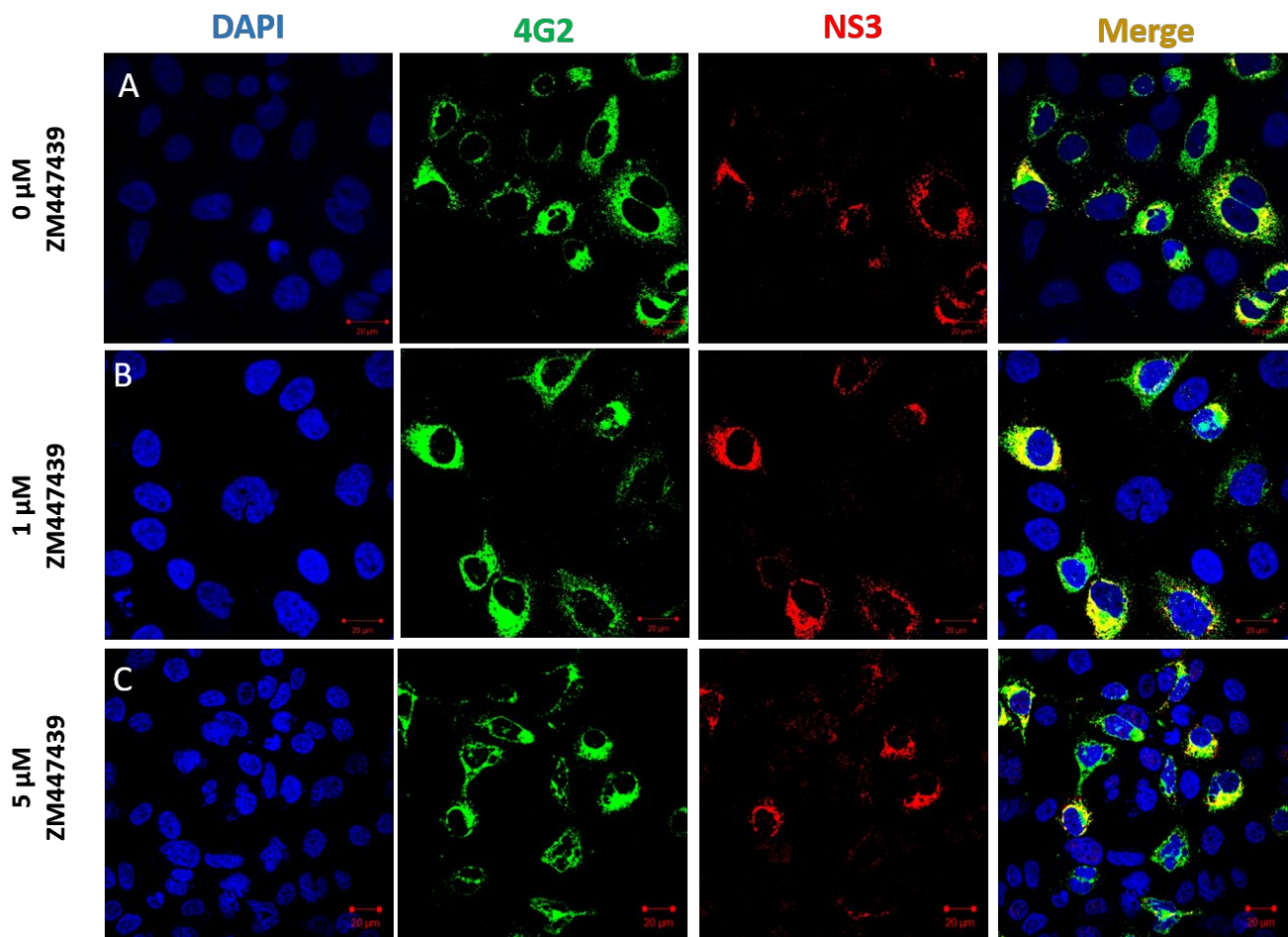


Figura 26. Distribución de la proteína E y NS3 en presencia de ZM447439 durante 24 h. En presencia de ZM447439, la distribución de la proteína E (Verde) y NS3 (Rojo) cambia en algunas células en comparación con el control. Se muestran imágenes representativas del experimento

Existen reportes que indican que la cápside de DENV puede migrar a núcleo durante el ciclo de replicación ya que cuenta con tres secuencias de localización nuclear. En nuestros ensayos observamos que en las células control (**Figura 28 A y Figura 29 A**) la mayoría de la proteína C se encuentra alrededor del núcleo colocalizando con el RNA de doble cadena viral, lo cual era esperado puesto que es justamente en los complejos de replicación en donde se localiza la cápside para llevar a cabo sus funciones en el ensamble viral. Caso contrario sucede durante el tratamiento con 1 y 5 μM de ZM447439 en donde la mayoría de la marca para la

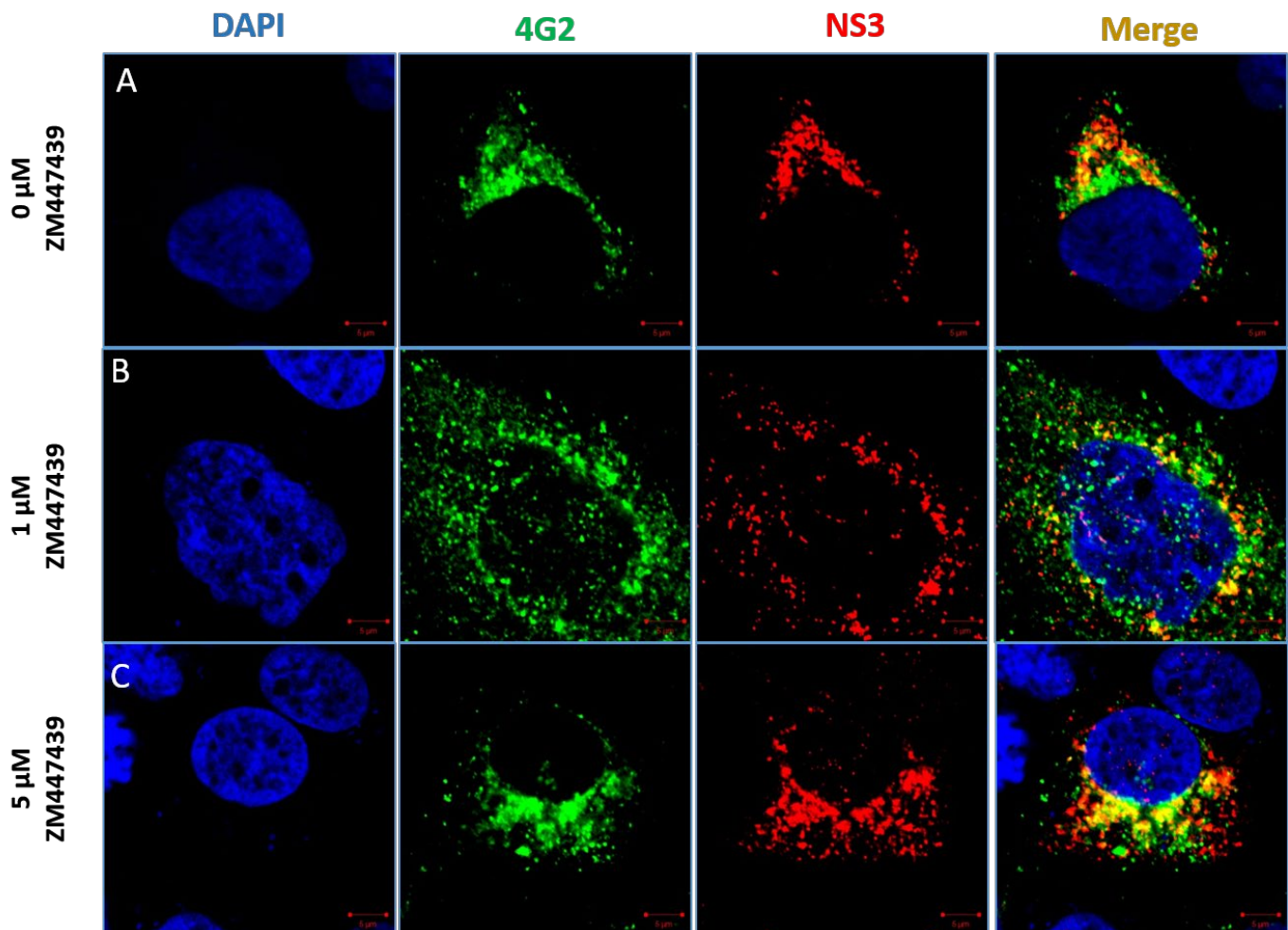


Figura 27. Distribución de la proteína E y NS3 durante la inhibición de AurKB por 24 h. Durante la inhibición de AurKB la proteína estructural E y la proteasa viral NS3 se dispersan en el citoplasma de la célula.

cápside se encuentra dentro del núcleo de la célula (Figura 28 B-C y Figura 29 B-C).

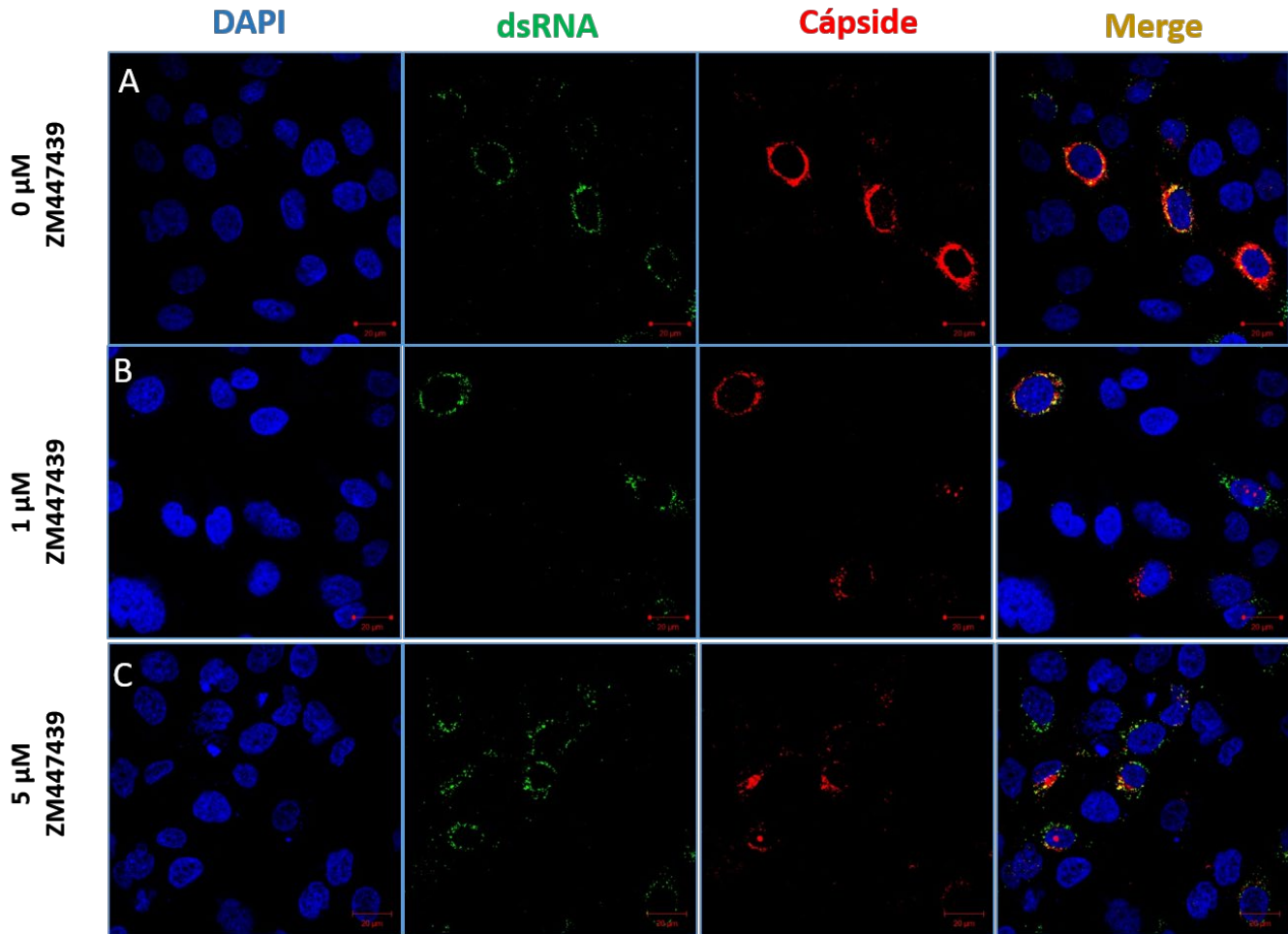


Figura 28. La proteína de la cápside modifica su localización durante el tratamiento por 24 h con ZM447439. La proteína de la cápside (Rojo) migra a núcleo en presencia de ZM447439 mientras que en el control se mantiene en su mayoría de forma perinuclear.

17.14 Inmunomarcaje de los complejos de replicación para microscopía electrónica

Una vez analizado que la integridad de los complejos de replicación se encontraba comprometida durante la inhibición de AurKB se procedió a analizar estas estructuras a través de inmunomarcaje para microscopía electrónica. Para esto las células fueron teñidas con anticuerpo anti-NS4A y anti-dsRNA (RNA de doble cadena viral).

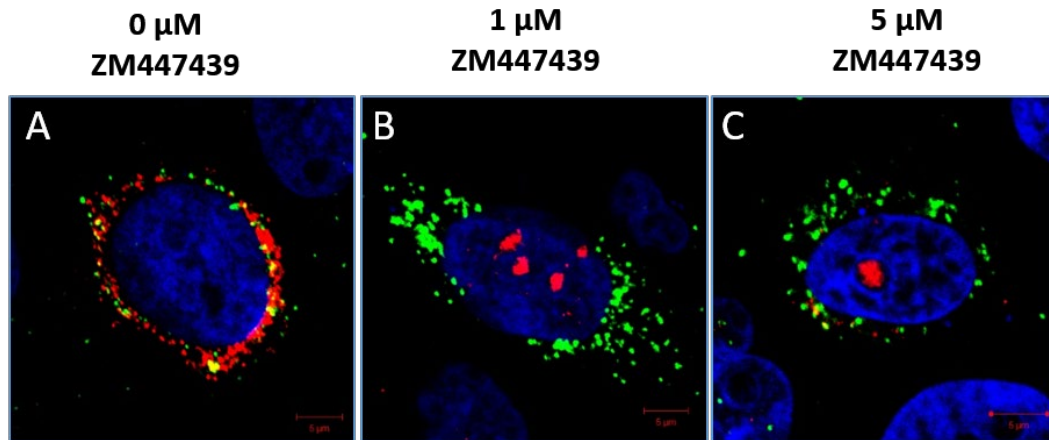


Figura 29. En presencia de ZM447439 la proteína de la cápside se localiza en el núcleo de las células infectadas. A las 24 h de tratamiento e infección se observa en A) la distribución alrededor del núcleo de la proteína de la cápside (Rojo) y de dsRNA (Verde), en contraste, B,C) en las células tratadas con ZM447439 la proteína localiza de manera nuclear principalmente. El núcleo fue teñido con DAPI.

En la **Figura 30** observamos el resultado del ensayo, en la sección A de la figura las células control no infectadas ni tratadas con el inhibidor de AurKB y se puede observar la membrana nuclear y parte del retículo endoplásmico. En la **figura 30 B** se observa marca tanto para NS4A (Triángulos blancos) y el RNA de doble cadena (Triángulos negros) principalmente en las membranas del retículo endoplásmico donde típicamente se encuentran los complejos de replicación.

En el caso de las células tratadas con 1 μ M de ZM447439 se encuentra marca de ambos componentes virales en las membranas del retículo y prácticamente en todo el citoplasma de la célula infectada, ahora bien, solo existen un par de puntos para NS4A y dsRNA que colocalizan (triángulos vacíos), se puede observar que la marca para NS4A (Triángulos blancos) pareciera acumularse en algunas zonas muy distintas de aquellas en donde se detecta al RNA de doble cadena (Triángulos negros). Finalmente, durante el tratamiento con 5 μ M del inhibidor de AurKB se observa una distribución de ambos componentes virales en todo el citoplasma de la célula observando el mismo patrón mencionado para la condición anterior, en este caso se observa que NS4A se encuentra localizada en membranas de organelos y en la membrana celular.

La deslocalización de la marca para NS4A y dsRNA, componentes esenciales de los complejos de replicación, fue confirmada por microscopía electrónica en un patrón muy similar al observado por microscopia confocal. De esta manera el tratamiento con ZM447439 afecta la organización de los complejos de replicación al inhibir la actividad de AurKB.

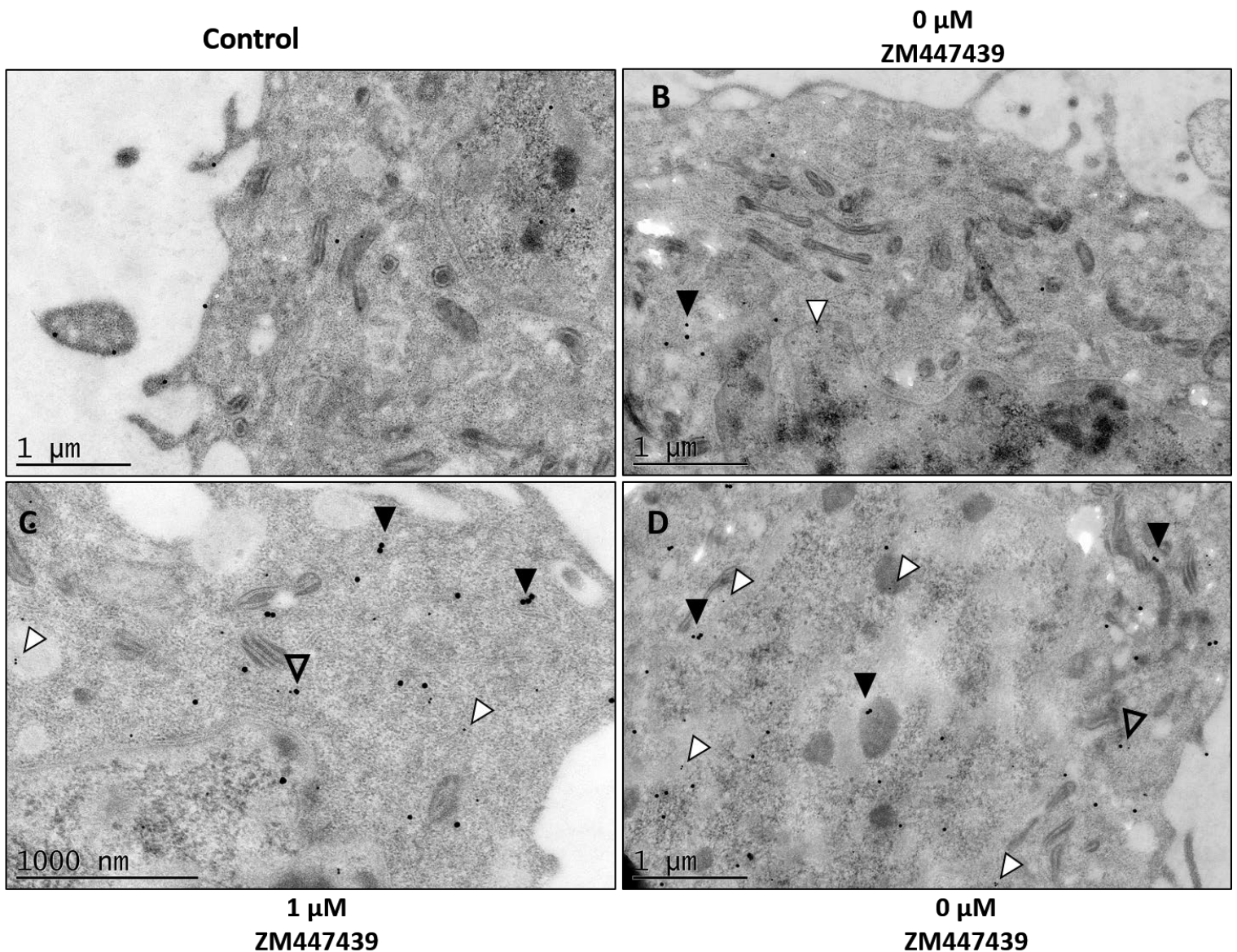


Figura 30. Inmunomarcaje de NS4A y dsRNA en microscopía electrónica. A) células control. B) Células infectadas con DENV 2 en donde se observa la marca para NS4A (triángulos blancos) y dsRNA (triángulos negros) acumuladas alrededor del nuclear. C y D) En el caso de las células infectadas, la marca para ambos componentes virales se observa dispersa en el citoplasma de la célula.

18. DISCUSIÓN

La infección por DENV es un problema de salud pública en los países endémicos para los mosquitos vectores, *Aedes aegypti* y *A. albopictus*. Hasta el momento no se cuenta con un régimen farmacológico para combatir la infección y a pesar de que actualmente se encuentra aprobada una vacuna (Dengvaxia®, Sanofi Pasteur) en algunos países de Asia y América latina (159) esta no ha demostrado proteger de manera efectiva y equitativa frente a todos los serotipos de DENV (160).

Recientemente, la casa productora de la vacuna comunicó, con base en resultados actuales, que la vacuna solo protege a aquellas personas que han sido previamente expuestas al virus, sin embargo aquellas que nunca se han infectado y que son vacunadas pueden desarrollar cuadros graves de la enfermedad (160). Esta asociación causó el retiro del mercado de la vacuna en Malasia en 2017.

Por tanto, el desarrollo de nuevos fármacos o blancos para combatir la infección por DENV continúa siendo un tópico de interés para la investigación actual. Debido a esto, en el presente trabajo se analizó el papel e importancia que pudieran tener proteínas del huésped sobre el ciclo de replicación de DENV 2, en específico las HDACs y Aurora Cinasa B, las cuales juegan un papel importante en la modificación de la expresión transcripcional y la regulación del ciclo celular respectivamente.

Los inhibidores para HDAC como BuNa, Tricostatina A (TSA) entre otros, pueden ser efectivos contra virus de importancia pública como VIH y los flavivirus JEV y HCV e incluso algunos de ellos como Vorinostat se encuentran en fase de pruebas clínicas (101, 161, 162). El mecanismo de acción difiere entre cada tipo de virus y puede ir desde inducir la expresión de proteínas virales para que este pueda ser detectado en células infectadas por el sistema inmune como es el caso de VIH hasta la disminución en la síntesis de genoma viral como ocurre en JEV o a través de la alteración en la expresión de genes del huésped como el mecanismo de SAHA sobre HCV (100).

Debido a los antecedentes nos planteamos analizar si BuNa, un inhibidor de las desacetilasas de histonas de clase I y IIa y determinar si la hiperacetilación de las histonas afecta el ciclo de replicación de DENV 2 en células Huh-7. Para ello, lo primero que hicimos fue analizar la viabilidad celular en presencia del fármaco y así, seleccionar las concentraciones con las que se realizarían los ensayos. Además del ensayo antes mencionado, es necesario analizar el efecto de BuNa sobre la acetilación de las histonas en nuestra línea celular midiendo la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 o de alguna otra regulada por HDACs de clase I y IIa.

El ensayo de viabilidad demostró que exponiendo las células a concentraciones desde 1 mM hasta 10 mM de BuNa no se afectaba negativamente la viabilidad, sin embargo, se decidió utilizar las concentraciones de 2, 4 y 6 mM. Los resultados de viabilidad contrastan con los reportes previos en donde en distintas líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano: MCF-7, MDA-MB-468 y MCF-10 el tratamiento con 10 y 20 mM de BuNa durante 24 h redujo la viabilidad cerca de un 43% (155), sugiriendo que distintas líneas celulares muestran diferente resistencia al tratamiento con BuNa.

Para analizar el efecto de BuNa sobre el ciclo de replicación de DENV inicialmente se realizaron ensayos de formación de focos utilizando el sobrenadante de células infectadas y tratadas con 2, 4 y 6 mM de BuNa durante 24 h y observamos que las concentraciones de 4 y 6 mM disminuían de manera significativa la producción de partículas virales (una disminución del 83% y 54% respectivamente).

En otros flavivirus como JEV se ha demostrado que la inhibición de HDAC 6 con tubacina y tubastatina causa una inhibición de la replicación del genoma viral lo cual se cree se debe a que la inhibición de HDAC6 induce una hiperacetilación de la proteína Hsp-90 lo que interfiere con su interacción con la polimerasa viral NS5. Otro mecanismo que intenta explicar lo observado involucra la inhibición del transporte de componentes virales en la célula, lo que afecta la producción de partículas virales (99). Ambos mecanismos podrían corroborarse analizando la producción de progenie viral.

Teniendo esto en mente, procedimos a investigar la replicación del genoma viral utilizando el sistema de replicón para DENV en donde la actividad de luciferasa del replicón es un indicativo de la eficiencia de replicación viral. Estos ensayos nos mostraron que el BuNa inhibe la síntesis y traducción del genoma de DENV disminuye de manera significativa tanto a las 24 y 48 h y que este efecto es dependiente del tiempo y concentración del inhibidor. Por lo que la inhibición de HDACs de clase I y IIa parece ser importante para la replicación del genoma viral a través de un mecanismo desconocido.

Con estos ensayos, demostramos que el butirato de sodio a través de la inhibición de HDACs puede interferir con la síntesis del genoma y proteína viral teniendo como consecuencia la disminución en la producción de partículas virales de DENV. Por otra parte, se ha visto que la inhibición de HDAC con TSA induce la expresión de interferón β (INF- β), lo que confiere un estado antiviral en células infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) que previamente había reprimido la síntesis del INF- β (163). El efecto del BuNa en la producción de INF- β no se ha evaluado en nuestro sistema, sin embargo, si podría ser uno de los elementos que contribuya a la inhibición de la infección inducida por el fármaco.

Además de la participación de las deacetilasas en la infección por DENV, también evaluamos la importancia de la Aurora Cinasa B (AurKB). Es bien sabido que las cinasas juegan un papel importante en la regulación de procesos celulares como el metabolismo, vías de señalización, transporte intracelular, crecimiento y ciclo celular. De la misma manera, los virus fosforilan sus proteínas durante infección para favorecer proceso como la replicación viral, localización subcélular, entrada, ensamble o salida. Entre los virus en los cuales se ha observado la importancia de las cinasas encontramos al virus de la encefalitis japonesa (JEV), Hepatitis C (HCV), Influenza (H7N9), virus Lasa (LASV), Ébola (EBOV), Marburg (MARV), Sarampión, Rabia, entre otros. Y la mayoría de la evidencia se ha obtenido en ensayos *In vitro* (121, 164-169).

Aurora cinasa B pertenece a la familia de las aurora cinasas las cuales pertenecen a la clase de Serin/treonin cinasas y son consideradas reguladores

maestros del ciclo celular, principalmente de la fase G2/M expresándose principalmente en tejidos en proliferación.

Esta enzima ha demostrado ser importante para el ciclo de replicación de algunos virus como EBV, además también se ha demostrado que la inhibición de la enzima puede afectar la replicación del virus de influenza y de HCV (150, 151).

Debido a estos antecedentes y basándonos en hecho de que esta enzima participa en la fosforilación de la H3 que muestra cambios en sus niveles de fosforilación durante infección con DENV, decidimos analizar si AurKB jugaba un papel en el ciclo de replicación de DENV 2. Para ello, se seleccionó el inhibidor específico de AurKB ZM447439 el cual es un fármaco competitivo de ATP para AurKB *In vitro*. Inicialmente realizamos ensayos de viabilidad y metabolismo celular para comprobar que la inhibición de AurKB no afectaba ninguno de estos dos aspectos en nuestra línea celular. Aunque en el ensayo de viabilidad, la concentración más alta utilizada demostró ser citotóxica, curiosamente el metabolismo celular no se alteró a esta misma concentración. Mediante microscopía pudimos observar que el tratamiento con ZM447439 inhibía la proliferación de las células Huh-7 más que causar su muerte.

Existen reportes previos en donde el tratamiento durante 72 h con 5 μ M de ZM447439 induce apoptosis en células de Carcinoma de colon humano (HCT-116) o a concentraciones de 2 μ M inhiben la proliferación de células de carcinoma de cérvix (SiHa). Para el caso de células hepáticas, solo existe evidencia en la línea HepG2 en donde utilizan ZM447439 en cotratamiento con dimetil arsénico trivalente [DMA (III)], y se observó que AurKB modifica su localización dentro de la célula (170-172).

Debido a que en la mayoría de referencias revisadas utilizaban concentraciones menores a 10 μ M de ZM447439 decidimos utilizar únicamente 1 y 5 μ M para nuestros ensayos con células Huh-7 .

Una vez establecidas las concentraciones para los ensayos procedimos a comprobar la eficiencia de la inhibición de la actividad cinasa de AurKB a través

ZM447439. Ya que no se contaba con un método directo para medir la actividad cinasa de AurKB, esta se midió de manera indirecta a través de la fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (H3S10p) por ensayos de Western Blot. Al mismo tiempo también se midió la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac) para analizar si la inhibición de AurKB afectaba la acetilación de la misma histona, todo esto comparado frente a la histona H3 total.

En los resultados se observó una disminución en la señal de H3S10p dependiente de la concentración de ZM447439, siendo los 5 μ M la concentración en donde se observó la mayor disminución de H3S10p. Otra manera de demostrar la inhibición de AurKB fue analizar el ciclo celular en donde encontramos un aumento en la población en fase G2/M, lo cual concuerda con lo observado por *Kumari & cols* utilizando el mismo inhibidor para AurKB durante 24 h en una línea celular de osteosarcoma U-2 OS(173). Ambos resultados nos indicaron que nuestro fármaco inhibía la actividad cinasa de AurKB en la línea Huh-7 a las concentraciones empleadas.

Una vez confirmado lo anterior, procedimos a realizar los ensayos de infección viral y el tratamiento con ZM447439, en donde observamos que a las 24 h.p.i el tratamiento con 5 μ M del fármaco inducía una disminución en la progenie viral del 68%, el cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y a las 48 h.p.i. la presencia de 1 μ M del inhibidor produjo la reducción de un 40% en la progenie viral ($p < 0.01$).

Estos resultados se pueden deber a dos cuestiones: I) que la vida media del fármaco, la cual no ha sido reportada en líneas celulares, sea menor a 48 h o II) se ha observado que en HCV si se inhibe completamente la enzima con ZM447439, la producción de partículas virales disminuía, esto a razón de que aparentemente se necesita una regulación en la actividad de la enzima mas no su completa inhibición (151).

La Citometría de flujo es otra metodología que utilizamos para analizar el impacto de la inhibición de AurKB sobre la replicación de DENV 2. Se realizaron dos tipos de análisis, el primero de ellos fue cuantificar el porcentaje relativo (PR) de

células infectadas y el segundo medir la Intensidad media de fluorescencia (IMF) de estas mismas células tanto a las 24 como 48 h de tratamiento.

La cuantificación del PR demostró que no existía disminución o incremento en el número de las células infectadas a ninguno de los tiempos analizados, pero el análisis de la IMF reveló que en estas mismas células la IMF aumentaba cuando eran tratadas con 5 μ M de ZM447439 tanto a las 24 como 48 h.

Cuando los resultados de este ensayo se contrastan con los del ensayo de focos, observamos que si bien el número de células infectadas no varían, si lo hace la cantidad de virus que es secretado es menor. El que las células aumenten su IMF y secreten menos virus podría indicar que se está llevando a cabo un proceso de acumulación de componentes virales previos al ensamble dentro de la célula o que se está alterando el proceso de salida viral.

Existen reportes previos en donde se ha observado que el silenciamiento de cinasas como AAK1 (AP2-associated protein kinase 1) y GAK (Cyclin G-associated kinase) inhibe la producción de partículas virales de DENV. Ambas cinasas regulan las vías de endocitosis y transporte de la red Golgi a través de las proteínas AP2 y en el caso de GAK su inhibición específica inhibe la entrada y ensamble viral de HCV (121, 174).

Una vez que nos planteamos que podría ocurrir un fenómeno de acumulación de componentes virales dentro de las células infectadas decidimos analizar la producción de la proteasa viral NS3 y la secreción de la proteína NS1 y observar si la expresión/secreción de estas variaba durante la inhibición de AurKB.

Inicialmente, observamos que la expresión de la proteasa NS3 no variaba a las 24 o 48 h.p.i. y que la secreción de NS1 tampoco se veía alterada a ambos tiempos. De este último resultado también se puede deducir de manera indirecta que la inhibición de AurKB no altera la vía de secreción de la proteína NS1, esto es importante ya que respalda la hipótesis de que durante la inhibición de AurKB se afecta el proceso de ensamble/morfogénesis de DENV y no de secreción de NS1.

En otros trabajos se han obtenido resultados similares a los nuestros: por ejemplo, la inhibición de cinasas en la infección por JEV, a pesar de inhibir/ afectar la replicación o producción de partículas virales no afectan la producción de proteínas o la síntesis de genoma viral (164).

Teniendo este antecedente presente, procedimos a comprobar si la replicación del genoma viral se modificaba durante el tratamiento con ZM447439, para esto utilizamos el sistema de replicón que contiene solo las proteínas no estructurales de DENV 4 acopladas al gen reportero para luciferasa, así la actividad de esta última nos indica el estado la síntesis proteica y la síntesis del genoma viral.

Como resultado de este ensayo obtuvimos que a 24 h de tratamiento, independientemente de la concentración de ZM447439 no se modificaba la síntesis del genoma viral, en comparación con las 48 h en donde existe un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) en la síntesis del genoma de DENV.

En 2011 *García blanco & cols.* demostraron que un inhibidor inespecífico de cinasas, el compuesto SFV785, afectaba el ensamble y la producción de partículas infecciosas de DENV sin alterar la síntesis de proteínas y genoma viral, algo similar a lo que observamos, con la ventaja de que nosotros únicamente inhibimos a AurKB de manera específica (123).

El proceso de ensamble/morfogénesis viral se lleva a cabo en invaginaciones del retículo endoplásmico conocidas como complejos replicativos o de replicación (CR), en estas estructuras se encuentran todos los componentes virales y celulares necesarios para la producción de nuevas partículas virales. Debido a su importancia para el ciclo de replicación de DENV y en concordancia con nuestras observaciones, procedimos a analizar la integridad y distribución de estas estructuras mediante ensayos de microscopía confocal, tiñendo la proteína NS4A y el RNA de doble cadena (dsRNA) los cuales son componentes esenciales para la formación y función de los CRs.

Como esperábamos, en nuestros resultados obtuvimos que en las células control la señal para NS4A y dsRNA se encuentra perinuclear colocalizando entre

sí en el merge, mientras que en los tratamientos la señal para ambos componentes virales se observa dispersa en el citoplasma de la célula perdiendo la colocalización entre ellas tanto a la concentración de 1 y 5 μM de ZM44749.

Este fenómeno también se observa a las 48 h.p.i. lo cual indica que la inhibición de AurKB no impacta en la producción de proteínas ni en la síntesis de RNA de doble cadena como se observó anteriormente en los ensayos de Western Blot y en los ensayos de luciferasa con el replicón de DENV.

La pérdida de colocalización de NS4A y dsRNA puede afectar la función correcta de los CRs y por lo tanto interferir en el proceso de ensamble/morfogénesis viral, Estas observaciones parecen indicar que la inhibición de la AurKB está interfiriendo con el funcionamiento de los CRs y que probablemente esto afecte el ensamble/morfogénesis viral.

También utilizamos inmunomarcaje para microscopía electrónica contra la proteína NS4A y el dsRNA viral, en este ensayo pudimos observar como el tratamiento con ZM447439 induce la dispersión de ambos componentes virales de una manera muy similar a lo que se observa por Inmunofluorescencia. Este resultado confirmó el comportamiento observado anteriormente de NS4A y dsRNA.

A continuación analizamos la localización de las proteínas estructurales virales durante el tratamiento. Específicamente analizamos la localización de la proteína de la cápside (C) y de la envoltura (E) por Inmunofluorescencia. La cápside es una proteína viral importante para los procesos de ensamble/ morfogénesis de DENV, ya que es la primera que debe asociarse al RNA viral para iniciar la morfogénesis. Interesantemente, en ausencia de ZM447439, C se puede observar con su clásica localización perinuclear sin embargo, en presencia de ambas concentraciones del inhibidor de AurKB la marca de C se localiza casi en su totalidad al núcleo de la célula, y por lo tanto, reduciendo su colocalización con el dsRNA.

Para la proteína E, no pudimos ver un cambio significativo en su localización después del tratamiento con el fármaco.

Se ha reportado, que la proteína de la cápside de DENV contiene señales de localización nuclear y que su movilización al núcleo de las células infectadas es dinámica durante la replicación viral y que estas secuencias de localización nuclear son esenciales para su interacción con proteínas celulares como DAXX o nucleolina (20, 21).

Ahora bien, su papel en núcleo no es del todo conocido pero se cree que puede actuar como una chaperona de RNA y se ha demostrado en ensayos *in vitro* que es capaz de unirse a DNA genómico, plasmidico y a las histonas del nucleosoma impidiendo la formación de esta estructura (20, 21, 23).

El hecho de que la proteína de la cápside se localice casi en su totalidad a núcleo puede implicar dos situaciones: I) que el mecanismo de salida de la proteína se vea afectado por la inhibición de AurKB o la acción de ZM447439 y II) que existe una menor disponibilidad de la cápside para llevar a cabo los procesos de Ensamble/Morfogénesis en los CRs.

Esto último explicaría en parte por qué encontramos una disminución de partículas virales en sobrenadante de las células tratadas y dado que no se modifica la producción de proteínas o genoma viral justificaría el aumento en la IMF de las células pero sin modificar el número de células infectadas.

Durante su actividad en el ciclo celular, AurKB interactúa con la proteína CHMP4C la cual es un componente nuclear del complejo ESCRT-III, este complejo ha demostrado ser importante en el proceso de morfogénesis de los flavivirus. El mecanismo que se ha propuesto implica a las proteínas del complejo ESCRT como necesarias para la formación de partículas virales a través del estrangulamiento de la membrana durante el "*budding*" viral de HCV, YFV, JEV y DENV (175-178).

En otros reportes, durante la inhibición de AurKB se ha reportado otro tipo de efectos en la célula como la inducción de autofagia, apoptosis e inducción de gránulos de estrés además del arresto del ciclo celular comentado anteriormente.

El conjunto de datos presentados aquí nos llevan a plantear una posible estrategia que seguiría a la inhibición de AurKB y que involucra la falta fosforilación

de CHMP4C teniendo como resultado la no activación del complejo ESCRT, cuya consecuencia directa serían defectos en la salida de DENV del retículo. Lo anterior explicaría la disminución en la progenie viral observada por focos pero sin la alteración en la síntesis de proteína y genoma viral.

La vía por la cual la inhibición de la actividad de AurKB o la presencia de ZM447439 modifica la distribución de los CRs y tanto de proteínas virales no estructurales como estructurales requiere de otros ensayos para poder tener datos concluyentes. Es conocido que las proteínas dependiendo de las modificaciones postraduccionales que se lleven a cabo en ellas (como la fosforilación) pueden modificar su localización o su actividad, esto podría explicar en parte el efecto que observamos por Inmunofluorescencia y microscopía electrónica sobre las proteínas virales.

Otra proteína altamente regulada por AurKB es la vimentina la cual forma parte de los filamentos intermedios de tipo III y que anteriormente ha demostrado ser importante para el ensamble y soporte de los complejos de replicación de DENV 2. Durante el proceso de citocinesis, la vimentina es fosforilada por AurKB en la serina 72 (aunque se han descrito al menos 8 sitios) y de esta manera la cinasa induce la despolimerización de la vimentina y la segregación de esta, permitiendo así la progresión de la citocinesis celular (179, 180). Esto puede plantearse como otro posible mecanismo por el cual la inhibición de AurKB modifique la localización de componentes virales residentes de los complejos de replicación sin alterar la síntesis y replicación viral. Para comprobar esto será necesario analizar la distribución/localización subcelular de vimentina durante la inhibición de AurKB.

Existe evidencia experimental en donde se demuestra que la inhibición de AurKB y HDACs por tricostatina A (TSA) funcionan de manera independiente y sinérgica activando a pTEN lo que reduce la fosforilación de AKT y esto a su vez afecta la fosforilación de mTOR.

Es bien sabido que mTOR es una serin/treonin cinasa cuya función es integrar múltiples señales que afectan la disponibilidad de factores de crecimiento, energía y nutrientes celulares. Durante la infección por DENV mTOR es activado a

través de la AMPK para inducir lipofagia y beneficiar su replicación (120, 181). Por otra parte también se sabe que AKT es activado durante la infección de DENV, así cuando se inhibe esta cinasa con el fármaco AR-12, además de disminuir la actividad de GRP78, afecta de manera importante la replicación de los cuatro serotipos de DENV (182, 183).

Esto puede ser una ruta de conversión, en donde tanto la actividad de AurKB y de las HDAC es importante para la regulación de vías metabólicas necesarias y explotadas por DENV 2 y que podrían participar en los fenómenos que describimos en el presente trabajo.

19. CONCLUSIONES

- Al inhibir la actividad cinasa de AurKB se afecta la producción de partículas virales sin alterar la síntesis de proteína o genoma viral.
- La actividad Cinasa de AurKB es esencial para la correcta formación y distribución de los complejos replicativos de DENV así como para la localización de la proteína de la cápside.
- La inhibición de HDACs interfiere con la replicación y traducción del genoma viral así como la producción de nuevas partículas virales.

20. PERSPECTIVAS

- ❖ Analizar si el tratamiento con BuNa modifica la distribución de los complejos replicativos de DENV 2.
- ❖ Realizar RNA-seq en las células tratadas con BuNa para analizar durante el tratamiento que mensajeros cambian su expresión.
- ❖ Cuantificar la producción de partículas virales extra e intracelularmente para analizar el proceso de salida viral durante la inhibición de AurKB.
- ❖ Realizar qRT-PCR del RNA viral de manera extra e intracelular para observar alteraciones en salida viral en presencia de ZM447439.
- ❖ Realizar Western Blot contra componentes de ESCRT-III para determinar si es este el mecanismo por el cual AurKB está llevando a cabo su efecto.
- ❖ Analizar el efecto de las clonas mutantes de AurKB durante la infección por DENV 2.

21. PRESENTACION EN CONGRESOS

IX Congreso Nacional de Virología

Morelos 2015

Memorias

22 al 25 de septiembre de 2015

Hotel Hacienda Vista Hermosa
Puente de Ixtla, Morelos

Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Virus

Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.

<http://www.ibt.unam.mx/virologia9>

virología9@gmail.com

ALTERACIONES EPIGENÉTICAS DURANTE LA INFECCIÓN POR VIRUS DENGUE

Olais J. H.¹, Ruiz-Jiménez F.¹, Hernández-Rivas R²., Del Ángel R. M.¹

¹ Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN.

² Departamento de Biomedicina Molecular Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN.

Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, 07360 México, D.F. Tel. 55 5747 3800 Ext. 5647. jholais@gmail.com

Dengue es el principal Arbovirus transmitido a humanos calculándose alrededor de novecientos millones de infecciones y más de doscientas mil muertes al año. Hasta el momento no se tiene un esquema de vacunación o tratamiento exitoso para los pacientes, debido a esto es importante conocer los mecanismos moleculares que permiten el establecimiento de la infección por el virus y la progresión a cualquiera de sus formas clínicas. La respuesta inmune de la célula huésped frente a la infección por virus dengue ha sido ampliamente estudiada y descrita a nivel de interacción proteica, reconocimiento de material genético viral y activación de receptores de superficie. Los antes mencionados dependen de manera directa o indirecta de mecanismos epigenéticos que controlan la expresión génica, en especial aquellos que involucran modificaciones en las histonas que forman parte del nucleosoma. Debido a esto, nos planteamos como objetivo analizar las posibles alteraciones inducidas por DENV en las histonas de la célula huésped y el posible efecto que tienen durante el ciclo de replicación viral, tomando en cuenta marcas de fosforilación, acetilación y metilación. Durante la infección con DENV observamos modificaciones en histonas que tienen relación con represión transcripcional y regulación del ciclo celular. De manera interesante, estas, resultaron modularse de manera diferencial a las 24 y 48 de después de la infección. Debido a que durante la infección encontramos disminución en los niveles de acetilación de la histona H3, utilizamos un inhibidor de deacetilasas de histona (HDAC's) lo que causó una reducción en el título viral. Este resultado sugiere que esta modificación (Acetilación) o proteínas con actividad HDAC participan durante la replicación viral. Este hallazgo da pie al desarrollo inhibidores selectivos de HDAC's para inhibir la infección por DENV y permite ampliar el conocimiento que se tiene de la interacción de virus dengue con su huésped.



35TH ANNUAL MEETING

American Society for Virology SCIENTIFIC PROGRAM & ABSTRACTS

Virginia Tech
Blacksburg, Virginia
June 18–22, 2016



ABSTRACTS

than RNA recombination *in vivo*. The chimeric RNA was not detected when the transcript with the consensus sequences deleted or with a highly processive thermostable RT indicating that the 9-nt sequences serves as a hot spot for RT template switching. This study demonstrated that template switch occurs at homologous sequences between cellular and viral RNA during reverse transcription.

W40-9

AGO2 KNOCKOUT HUH 7.5 CELLS SUPPORT EFFICIENT HEPATITIS C VIRUS REPLICATION.

Yalena Amador-Canizares, Joyce A. Wilson
University of Saskatchewan

A liver-specific microRNA, miR-122, protects the HCV genome from degradation and promotes its replication by a poorly understood mechanism. Argonaute (Ago) proteins are host multifunctional proteins involved in the activity of miRNAs, and are also necessary for miR-122 promotion of the HCV life cycle. Humans express 4 Ago isoforms, Ago1, 2, 3 and 4, and Ago2 has generally been viewed as the primary Ago involved in the HCV life cycle. To investigate the specific role of Ago2 and to determine the impact of the other Ago isoforms in the HCV life-cycle we have generated Ago2 knockout cells using CRISPR/Cas9 technology. We have generated two cell lines with confirmed biallelic indel mutations in the Ago2 gene and both showed undetectable levels of Ago2 expression by Western blot. We also confirmed that the Ago2 knockout cells were devoid of knockdown activity by assaying for siRNA directed cleavage activity. Somewhat unexpectedly, Ago2 knockout cells support HCV replication to levels similar to wild-type cells. This indicates that the other human Ago isoforms (Ago1, 3 and/or 4) are able to sustain high levels of HCV replication in the absence of Ago2, and that at least one, but potentially all, of the other Ago proteins can mediate miR-122 promotion of the HCV life cycle. At present, we are generating cell lines in which combinations of all 4 Ago isoforms are knocked out in order to assess the roles of each Ago isoform in the HCV life cycle, and generate an Ago null cell line to be used for trans-complementation assays to investigate the mechanism by which Ago and miR-122 promote the HCV life cycle.

W40-10

HEPATITIS C VIRUS MUTANTS ESCAPE SIRNA KNOCKDOWN BY USURPING THE SIRNA AS A MIR-122-MIMIC

Joyce A. Wilson, Adam Huys, Rasika D. Kunden, Michael Schinold, Patricia A. Thibault, Halim Adams
University of Saskatchewan

Efficient replication of HCV requires annealing of a liver specific miRNA, miR-122 to two binding sites on the 5' terminal sequences of the HCV genome. To better understand the role of the multifunctional and highly conserved 5' terminal sequence in HCV replication we characterize the impact of single nucleotide changes within this region. We used siRNAs knockdown and virus escape from knockdown as mutagenic tool to generate 33 replication competent mutant genomes having deletions or point mutations in the 5' terminal sequence. Analyses of the mutant viruses revealed two categories of mutant virus phenotypes. Viruses having deletions or point mutations within the 9-nucleotides that separate the two miR-122 seed-binding sites exhibiting high replicative fitness and variable resistance to the siRNA. This suggests that this region is relatively tolerant to point mutations. Viruses having mutations within the first miR-122 seed-binding site had lower replicative fitness, presumably due to failure to bind miR-122, but their replication efficiency was enhanced to varying levels by the siRNA. Thus, these mutant viruses appeared to have gained the ability to use the siRNA as a miR-122 mimic. One mutant in particular exhibited very little response to miR-122 but when stimulated by the siRNA replicated almost as efficiently as wild type virus, and thus appears to be almost completely dependent on

the siRNA. All of mutant genomes that could use the siRNA as a miR-122-mimic had perfect sequence complementarity between nucleotides 1-8 of siRNA and the sequence separating the miR-122 sites and we speculate this region forms a new seed-binding site for siRNA annealing, which allows it to promote HCV replication as a miR-122 mimic. These findings reveal that neither miR-122 nor its specific annealing location in the HCV 5' UTR are essential for efficient small RNA promotion of HCV replication.

W40-11

HISTONE DEACETYLASE INHIBITION IMPAIRS DENGUE VIRUS REPLICATION

José H. Pérez Olais, Fernando Ruiz Jiménez, Liliana Ramírez Hernández, Cinthia L. Dionicio Rodríguez, R. Hernandez-Rivas, R.M. Del Angel
CINVESTAV-JPN

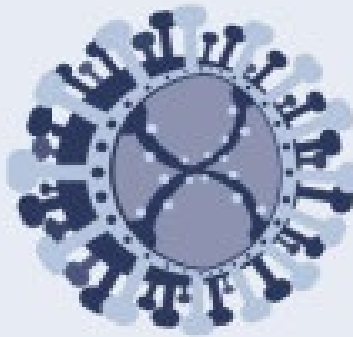
Dengue is the most important mosquito-borne viral disease in the world. The infection with any of the 4 dengue virus serotypes (DENV) produces a wide range of clinical conditions ranging from the mild form called dengue fever to the more severe form known as dengue hemorrhagic fever that may progress into dengue shock syndrome. During DENV infection changes in host cell gene expression has been described. Some of the genes expressed during infection are involved in viral pathogenesis and replication, however the mechanisms implicated in the expression of those genes are until now not fully understood. It is likely that epigenetics mechanisms such as histones acetylation, methylation and phosphorylation are related to this process. For this reason, the aim of this study was to analyze epigenetics marks in histone H3 during DENV 2 infection in HepG2 cells. Cells were infected at a MOI of 3 and assays carried out at 24 hrs post infection. Using a EpiQuik™ Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (Epigentek), a reduction in histone H3 acetylation and an increase in H3 methylation were observed. The reduction in acetylation levels of H3 histone during infection was confirmed by Western-blotting. Sodium butyrate (BuNa), a histone deacetylase inhibitor (iHDACs), inhibits viral replication at 24 h.p.i, suggesting that deacetylation is required for viral infection. Furthermore, the possible alteration in the cell gene expression profile induced by DENV 2 infection in the absence or presence of BuNa is currently analyzed using whole-transcriptome high-throughput sequencing (RNA-seq). Changes in transcripts expression will be validated by RT-qPCR. The results obtain up to now suggest that DENV 2 infection alters the epigenetic programming of the host cells to promote viral replication and suggest possible therapeutic targets to fight infection or prevent progression to severe dengue.

W41-1

INFLUENZA A VIRUS AVOIDS CAP-SNATCHING TRANSCRIPTS ESSENTIAL FOR VIRAL REPLICATION

Zuleyma Peralta, Romain Fenouil, Alexander Rialdi, Arvin Lagda, Ryan O'Hanlon, Megan Shaw, Ivan Marazzi, Harm vanBakel
Icahn School of Medicine at Mount Sinai

Influenza A virus (IAV) is a major respiratory pathogen that causes severe illness and mortality worldwide. IAV critically depends on host factors for multiple functions that are not encoded by the viral genome. Notably, the IAV RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) complex lacks intrinsic 7-methylguanosine (m7G) capping activity and instead "snatches" the 5'm7G caps and the adjacent 10-15nts of host transcripts to prime viral mRNA production, allowing viral transcripts to be recognized by the host translation machinery. Capsnatching selectivity, its function in the timing of infection, and its effects on host gene expression still remain unclear. We developed a new Capsnatch-Seq sequencing method that allows us to simultaneously assay both host and viral transcriptomes in a single experiment. We used this technique to study the progression of IAV infection in A549 cells and determined that the RdRP complex has



X CONGRESO NACIONAL DE VIROLOGÍA

“Dra. Blanca Lilia Barrón”

24 al 27 de octubre 2017
Chautla, Puebla

Book of Abstracts

Elucidating the role of the Aurora Kinase B during the replicative cycle of DENV 2

*Olais J. Humberto. 1, Ruiz-Jiménez F.3, Calderón-García E.1, Hurtado-Monzón Arianna M.1, Hernández-Rivas R.2, Del Ángel R. M.*1*

1 Infectomics and Molecular Pathogenesis Department,
Centre for Research and Advanced Studies-IPN.

2 Molecular Biomedicine Department, Centre for Research and Advanced Studies-IPN.

3 Molecular Virology, School of Life Sciences, the Nottingham University, Nottingham, UK.

Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Gustavo A. Madero, San Pedro Zacatenco, 07360

México, D.F. Tel. 55 5747 3800 Ext. 5647. jholais@gmail.com

Keywords: Dengue, Aurora Kinase B, Replicative Complex

Flaviviruses, such as Dengue (DENV), Zika, Yellow Fever, Japanese Encephalitis and West Nile are the causative pathogens of infections with high morbidity rates. The last estimation indicated that ~370 millions of people are infected by DENV per year and almost 90 million develop different clinic forms of the infection. The interaction between viral and host proteins play important functions during DENV replicative cycle. The study of these interactions could be useful to develop antiviral, therapeutic or prophylactic drugs.

In previous work we observed a decrease in the phosphorylation of serine 10 and 28 of histone H3 during the DENV 2 infection, both marks are controlled mainly by the Aurora Kinase B (AurKB). In the present work, we analyzed the role of AurKB during DENV 2 infection in Huh-7 cell line. Initially, we used the AurKB inhibitor called ZM 447439. Interestingly, we observed an increase in the % of cells infected by Flow cytometry but no alteration in viral protein NS3 production/NS1 secretion or in genome replication was observed. At structural level, the presence of the inhibitor induced the formation of structures surrounded by a lipid bilayer like stress granules. By confocal microscopy, alteration in the co-localization of dsRNA and NS4A in the replicative complex and the migration of the Capsid protein to nucleus was also observed. Altogether these results, suggest that AurKB activity is necessary for a correct replicative complex formation and this enzyme could be considered as a target for antiviral design.

22. REFERENCIAS

1. **Viruses ICoTo.** 2017. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed 12/12/.
2. **WHO.** 2009. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. WHO, Geneva, Switzerland.
3. **Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB.** 2016. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers* **2**:16055.
4. **Rico-Hesse R.** 2010. Dengue virus virulence and transmission determinants. *Curr Top Microbiol Immunol* **338**:45-55.
5. **Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B.** 2012. Dengue. *N Engl J Med* **366**:1423-1432.
6. **Cucunawangsih, Lugito NPH.** 2017. Trends of Dengue Disease Epidemiology. *Virology (Auckl)* **8**:1178122X17695836.
7. **Lok SM.** 2016. The Interplay of Dengue Virus Morphological Diversity and Human Antibodies. *Trends Microbiol* **24**:284-293.
8. **Oliveira ER, Mohana-Borges R, de Alencastro RB, Horta BA.** 2017. The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Res* **227**:115-123.
9. **Brand C, Bisailon M, Geiss BJ.** 2017. Organization of the Flavivirus RNA replicase complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **8**.
10. **Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, Coutard B, Decroly E, de Lamballerie X, Gould EA, Grard G, Grimes JM, Hilgenfeld R, Jansson AM, Malet H, Mancini EJ, Mastrangelo E, Mattevi A, Milani M, Moureau G, Neyts J, Owens RJ, Ren J, Selisko B, Speroni S, Steuber H, Stuart DI, Unge T, Bolognesi M.** 2010. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res* **87**:125-148.
11. **Markoff L.** 2003. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res* **59**:177-228.
12. **Schuessler A, Funk A, Lazear HM, Cooper DA, Torres S, Daffis S, Jha BK, Kumagai Y, Takeuchi O, Hertzog P, Silverman R, Akira S, Barton DJ, Diamond MS, Khromykh AA.** 2012. West Nile virus noncoding subgenomic RNA contributes to viral evasion of the type I interferon-mediated antiviral response. *J Virol* **86**:5708-5718.
13. **Chang RY, Hsu TW, Chen YL, Liu SF, Tsai YJ, Lin YT, Chen YS, Fan YH.** 2013. Japanese encephalitis virus non-coding RNA inhibits activation of interferon by blocking nuclear translocation of interferon regulatory factor 3. *Vet Microbiol* **166**:11-21.
14. **Chapman EG, Costantino DA, Rabe JL, Moon SL, Wilusz J, Nix JC, Kieft JS.** 2014. The structural basis of pathogenic subgenomic flavivirus RNA (sflRNA) production. *Science* **344**:307-310.
15. **Ng WC, Soto-Acosta R, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA, Ooi EE.** 2017. The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses* **9**.
16. **Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV.** 2005. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* **339**:200-212.
17. **Villordo SM, Alvarez DE, Gamarnik AV.** 2010. A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication. *RNA* **16**:2325-2335.
18. **Villordo SM, Filomatori CV, Sanchez-Vargas I, Blair CD, Gamarnik AV.** 2015. Dengue virus RNA structure specialization facilitates host adaptation. *PLoS Pathog* **11**:e1004604.
19. **Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB.** 2004. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3414-3419.
20. **Netsawang J, Noisakran S, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Wongwiwat W, Malasit P, Yenchitsomanus PT, Limjindaporn T.** 2010. Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Res* **147**:275-283.

21. **Balinsky CA, Schmeisser H, Ganesan S, Singh K, Pierson TC, Zoon KC.** 2013. Nucleolin interacts with the dengue virus capsid protein and plays a role in formation of infectious virus particles. *J Virol* **87**:13094-13106.
22. **Wiwanitkit S, Wiwanitkit V.** 2013. Dengue virus capsid protein and very low density lipoproteins. *Nanomedicine* **9**:1123.
23. **Colpitts TM, Barthel S, Wang P, Fikrig E.** 2011. Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells. *PLoS One* **6**:e24365.
24. **Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assuncao-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV.** 2009. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* **5**:e1000632.
25. **Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM.** 2011. Partial maturation: an immune-evasion strategy of dengue virus? *Trends Microbiol* **19**:248-254.
26. **Fibriansah G, Ng TS, Kostyuchenko VA, Lee J, Lee S, Wang J, Lok SM.** 2013. Structural changes in dengue virus when exposed to a temperature of 37 degrees C. *J Virol* **87**:7585-7592.
27. **Perera R, Kuhn RJ.** 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* **11**:369-377.
28. **Wong SS, Haqshenas G, Gowans EJ, Mackenzie J.** 2012. The dengue virus M protein localises to the endoplasmic reticulum and forms oligomers. *FEBS Lett* **586**:1032-1037.
29. **Che P, Tang H, Li Q.** 2013. The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology* **446**:303-313.
30. **Wong SS, Chebib M, Haqshenas G, Loveland B, Gowans EJ.** 2011. Dengue virus PrM/M proteins fail to show pH-dependent ion channel activity in *Xenopus* oocytes. *Virology* **412**:83-90.
31. **Muller DA, Young PR.** 2013. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* **98**:192-208.
32. **Alcala AC, Hernandez-Bravo R, Medina F, Coll DS, Zambrano JL, Del Angel RM, Ludert JE.** 2017. The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted from infected mosquito cells via a non-classical caveolin-1-dependent pathway. *J Gen Virol* **98**:2088-2099.
33. **Chang HH, Shyu HF, Wang YM, Sun DS, Shyu RH, Tang SS, Huang YS.** 2002. Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): arginine-glycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. *J Infect Dis* **186**:743-751.
34. **Falconar AK.** 1997. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* **142**:897-916.
35. **Puerta-Guardo H, Glasner DR, Harris E.** 2016. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog* **12**:e1005738.
36. **Adikari TN, Gomes L, Wickramasinghe N, Salimi M, Wijesiriwardana N, Kamaladasa A, Shyamali NL, Ogg GS, Malavige GN.** 2016. Dengue NS1 antigen contributes to disease severity by inducing interleukin (IL)-10 by monocytes. *Clin Exp Immunol* **184**:90-100.
37. **Chen J, Ng MM, Chu JJ.** 2015. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog* **11**:e1005053.

38. **Modhiran N, Watterson D, Blumenthal A, Baxter AG, Young PR, Stacey KJ.** 2017. Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunol Cell Biol* **95**:491-495.
39. **Alayli F, Scholle F.** 2016. Dengue virus NS1 enhances viral replication and pro-inflammatory cytokine production in human dendritic cells. *Virology* **496**:227-236.
40. **Conde JN, da Silva EM, Allonso D, Coelho DR, Andrade ID, de Medeiros LN, Menezes JL, Barbosa AS, Mohana-Borges R.** 2016. Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins. *J Virol* **90**:9570-9581.
41. **Xie X, Gayen S, Kang C, Yuan Z, Shi PY.** 2013. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *J Virol* **87**:4609-4622.
42. **Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A.** 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:14333-14338.
43. **Wu RH, Tsai MH, Chao DY, Yueh A.** 2015. Scanning mutagenesis studies reveal a potential intramolecular interaction within the C-terminal half of dengue virus NS2A involved in viral RNA replication and virus assembly and secretion. *J Virol* **89**:4281-4295.
44. **Xie X, Zou J, Puttikhunt C, Yuan Z, Shi PY.** 2015. Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. *J Virol* **89**:1298-1313.
45. **Fajardo-Sanchez E, Galiano V, Villalain J.** 2017. Spontaneous membrane insertion of a dengue virus NS2A peptide. *Arch Biochem Biophys* **627**:56-66.
46. **Shrivastava G, Garcia-Cordero J, Leon-Juarez M, Oza G, Tapia-Ramirez J, Villegas-Sepulveda N, Cedillo-Barron L.** 2017. NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2. *Virulence* doi:10.1080/21505594.2017.1356540:1-7.
47. **Wu RH, Tsai MH, Tsai KN, Tian JN, Wu JS, Wu SY, Chern JH, Chen CH, Yueh A.** 2017. Mutagenesis of Dengue Virus Protein NS2A Revealed a Novel Domain Responsible for Virus-Induced Cytopathic Effect and Interactions between NS2A and NS2B Transmembrane Segments. *J Virol* **91**.
48. **Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ.** 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* **65**:2467-2475.
49. **Wu CF, Wang SH, Sun CM, Hu ST, Syu WJ.** 2003. Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *J Virol Methods* **114**:45-54.
50. **Anglero-Rodriguez YI, Pantoja P, Sariol CA.** 2014. Dengue virus subverts the interferon induction pathway via NS2B/3 protease-IkappaB kinase epsilon interaction. *Clin Vaccine Immunol* **21**:29-38.
51. **Aguirre S, Luthra P, Sanchez-Aparicio MT, Maestre AM, Patel J, Lamothe F, Fredericks AC, Tripathi S, Zhu T, Pintado-Silva J, Webb LG, Bernal-Rubio D, Solovyov A, Greenbaum B, Simon V, Basler CF, Mulder LC, Garcia-Sastre A, Fernandez-Sesma A.** 2017. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat Microbiol* **2**:17037.
52. **Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, Patel JR, Savage T, Gutman D, Maringer K, Bernal-Rubio D, Shabman RS, Simon V, Rodriguez-Madoz JR, Mulder LC, Barber GN, Fernandez-Sesma A.** 2012. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS Pathog* **8**:e1002934.
53. **Leon-Juarez M, Martinez-Castillo M, Shrivastava G, Garcia-Cordero J, Villegas-Sepulveda N, Mondragon-Castelan M, Mondragon-Flores R, Cedillo-Barron L.** 2016. Recombinant

- Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Virology* **13**:1.
54. **Luo D, Xu T, Hunke C, Gruber G, Vasudevan SG, Lescar J.** 2008. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol* **82**:173-183.
 55. **Yusof R, Clum S, Wetzel M, Murthy HM, Padmanabhan R.** 2000. Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro. *J Biol Chem* **275**:9963-9969.
 56. **Chandramouli S, Joseph JS, Daudenarde S, Gatchalian J, Cornillez-Ty C, Kuhn P.** 2010. Serotype-specific structural differences in the protease-cofactor complexes of the dengue virus family. *J Virol* **84**:3059-3067.
 57. **de Almeida H, Bastos IM, Ribeiro BM, Maigret B, Santana JM.** 2013. New binding site conformations of the dengue virus NS3 protease accessed by molecular dynamics simulation. *PLoS One* **8**:e72402.
 58. **Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R.** 1999. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol* **73**:3108-3116.
 59. **Xu T, Sampath A, Chao A, Wen D, Nanao M, Chene P, Vasudevan SG, Lescar J.** 2005. Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. *J Virol* **79**:10278-10288.
 60. **Patkar CG, Kuhn RJ.** 2008. Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. *J Virol* **82**:3342-3352.
 61. **Dong H, Chang DC, Hua MH, Lim SP, Chionh YH, Hia F, Lee YH, Kukkaro P, Lok SM, Dedon PC, Shi PY.** 2012. 2'-O methylation of internal adenosine by flavivirus NS5 methyltransferase. *PLoS Pathog* **8**:e1002642.
 62. **Tay MY, Smith K, Ng IH, Chan KW, Zhao Y, Ooi EE, Lescar J, Luo D, Jans DA, Forwood JK, Vasudevan SG.** 2016. The C-terminal 18 Amino Acid Region of Dengue Virus NS5 Regulates its Subcellular Localization and Contains a Conserved Arginine Residue Essential for Infectious Virus Production. *PLoS Pathog* **12**:e1005886.
 63. **Hannemann H, Sung PY, Chiu HC, Yousuf A, Bird J, Lim SP, Davidson AD.** 2013. Serotype-specific differences in dengue virus non-structural protein 5 nuclear localization. *J Biol Chem* **288**:22621-22635.
 64. **Tay MY, Fraser JE, Chan WK, Moreland NJ, Rathore AP, Wang C, Vasudevan SG, Jans DA.** 2013. Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1-4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Res* **99**:301-306.
 65. **Limon-Flores AY, Perez-Tapia M, Estrada-Garcia I, Vaughan G, Escobar-Gutierrez A, Calderon-Amador J, Herrera-Rodriguez SE, Brizuela-Garcia A, Heras-Chavarria M, Flores-Langarica A, Cedillo-Barron L, Flores-Romo L.** 2005. Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. *Int J Exp Pathol* **86**:323-334.
 66. **Duangkhae P, Erdos G, Ryman KD, Watkins SC, Falo LD, Jr., Marques ETA, Jr., Barratt-Boyes SM.** 2017. Interplay between Keratinocytes and Myeloid Cells Drives Dengue Virus Spread in Human Skin. *J Invest Dermatol* doi:10.1016/j.jid.2017.10.018.
 67. **Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA.** 2001. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol* **75**:3501-3508.
 68. **Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG,**

- Frankel SS.** 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* **6**:816-820.
69. **Mosso C, Galvan-Mendoza IJ, Ludert JE, del Angel RM.** 2008. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* **378**:193-199.
70. **Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J.** 2011. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses* **3**:160-171.
71. **Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM.** 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.
72. **Rothman AL.** 2011. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* **11**:532-543.
73. **Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM.** 2010. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci* **67**:2773-2786.
74. **Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L.** 2005. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res* **36**:425-435.
75. **Fischl W, Bartenschlager R.** 2011. Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. *Curr Opin Microbiol* **14**:470-475.
76. **Heaton NS, Randall G.** 2011. Dengue virus and autophagy. *Viruses* **3**:1332-1341.
77. **Soto-Acosta R, Mosso C, Cervantes-Salazar M, Puerta-Guardo H, Medina F, Favari L, Ludert JE, Del Angel RM.** 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.
78. **Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, Bhatt S, Katzelnick L, Howes RE, Battle KE, Simmons CP, Hay SI.** 2014. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol* **22**:138-146.
79. **Holmes EC, Twiddy SS.** 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* **3**:19-28.
80. **Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC.** 2000. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* **74**:3227-3234.
81. **Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V.** 2015. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India* **71**:67-70.
82. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI.** 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**:504-507.
83. **Narro J, Gómez H.** 1995. El dengue en México: un problema prioritario de salud pública. *Salud Pública de México* **37**:12-20.
84. **Navarrete J, Vázquez J, Vázquez J, Gómez H.** 2002. Epidemiología del Dengue y Dengue Hemorrágico en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). *Revista Peruana de Epidemiología* **10**:1-12.
85. **Dantes HG, Farfan-Ale JA, Sarti E.** 2014. Epidemiological trends of dengue disease in Mexico (2000-2011): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **8**:e3158.
86. **Bustos-Arriaga J, Garcia-Machorro J, Leon-Juarez M, Garcia-Cordero J, Santos-Argumedeo L, Flores-Romo L, Mendez-Cruz AR, Juarez-Delgado FJ, Cedillo-Barron L.** 2011. Activation of the innate immune response against DENV in normal non-transformed human fibroblasts. *PLoS Negl Trop Dis* **5**:e1420.
87. **Whitehorn J, Simmons CP.** 2011. The pathogenesis of dengue. *Vaccine* **29**:7221-7228.

88. **Munoz-Jordan JL, Fredericksen BL.** 2010. How flaviviruses activate and suppress the interferon response. *Viruses* **2**:676-691.
89. **Pagni S, Fernandez-Sesma A.** 2012. Evasion of the human innate immune system by dengue virus. *Immunol Res* **54**:152-159.
90. **Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ.** 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**:251-260.
91. **Luger K, Richmond TJ.** 1998. The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* **8**:140-146.
92. **Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE.** 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**:786-794.
93. **Strahl BD, Allis CD.** 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**:41-45.
94. **Berndsen CE, Denu JM.** 2008. Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* **18**:682-689.
95. **Roth SY, Denu JM, Allis CD.** 2001. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**:81-120.
96. **Seto E, Yoshida M.** 2014. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**:a018713.
97. **Inoue A, Fujimoto D.** 1969. Enzymatic deacetylation of histone. *Biochem Biophys Res Commun* **36**:146-150.
98. **Wu MY, Wu RC.** 2016. A Sensitive and Flexible Assay for Determining Histone Deacetylase 1 (HDAC1) Activity. *Methods Mol Biol* **1436**:3-13.
99. **Lu CY, Chang YC, Hua CH, Chuang C, Huang SH, Kung SH, Hour MJ, Lin CW.** 2017. Tubacin, an HDAC6 Selective Inhibitor, Reduces the Replication of the Japanese Encephalitis Virus via the Decrease of Viral RNA Synthesis. *Int J Mol Sci* **18**.
100. **Sato A, Saito Y, Sugiyama K, Sakasegawa N, Muramatsu T, Fukuda S, Yoneya M, Kimura M, Ebinuma H, Hibi T, Ikeda M, Kato N, Saito H.** 2013. Suppressive effect of the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on hepatitis C virus replication. *J Cell Biochem* **114**:1987-1996.
101. **Archin NM, Kirchherr JL, Sung JA, Clutton G, Sholtis K, Xu Y, Allard B, Stuelke E, Kashuba AD, Kuruc JD, Eron J, Gay CL, Goonetilleke N, Margolis DM.** 2017. Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency. *J Clin Invest* **127**:3126-3135.
102. **Meier JL.** 2001. Reactivation of the human cytomegalovirus major immediate-early regulatory region and viral replication in embryonal NTERA2 cells: role of trichostatin A, retinoic acid, and deletion of the 21-base-pair repeats and modulator. *J Virol* **75**:1581-1593.
103. **Murphy JC, Fischle W, Verdin E, Sinclair JH.** 2002. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J* **21**:1112-1120.
104. **Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, Levrero M.** 2006. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* **130**:823-837.
105. **Gruffat H, Manet E, Sergeant A.** 2002. MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. *EMBO Rep* **3**:141-146.
106. **Bryant H, Farrell PJ.** 2002. Signal Transduction and Transcription Factor Modification during Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency. *J Virol* **76**:10290-10298.
107. **Prigent C, Dimitrov S.** 2003. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* **116**:3677-3685.
108. **van Wely KH, Mora Gallardo C, Vann KR, Kutateladze TG.** 2017. Epigenetic countermarks in mitotic chromosome condensation. *Nucleus* **8**:144-149.

109. **Jacob T, Van den Broeke C, Favoreel HW.** 2011. Viral serine/threonine protein kinases. *J Virol* **85**:1158-1173.
110. **Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S.** 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**:1912-1934.
111. **Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM.** 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**:407-414.
112. **Mohl BP, Emmott E, Roy P.** 2017. Phosphoproteomic Analysis Reveals the Importance of Kinase Regulation During Orbivirus Infection. *Mol Cell Proteomics* **16**:1990-2005.
113. **Keating JA, Bhattacharya D, Rund SS, Hoover S, Dasgupta R, Lee SJ, Duffield GE, Striker R.** 2013. Mosquito protein kinase G phosphorylates flavivirus NS5 and alters flight behavior in *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *Vector Borne Zoonotic Dis* **13**:590-600.
114. **Keating JA, Bhattacharya D, Lim PY, Falk S, Weisblum B, Bernard KA, Sharma M, Kuhn RJ, Striker R.** 2013. West Nile virus methyltransferase domain interacts with protein kinase G. *Viol J* **10**:242.
115. **Bhattacharya D, Ansari IH, Striker R.** 2009. The flaviviral methyltransferase is a substrate of Casein Kinase 1. *Virus Res* **141**:101-104.
116. **Forwood JK, Brooks A, Briggs LJ, Xiao CY, Jans DA, Vasudevan SG.** 1999. The 37-amino-acid interdomain of dengue virus NS5 protein contains a functional NLS and inhibitory CK2 site. *Biochem Biophys Res Commun* **257**:731-737.
117. **Noppakunmongkolchai W, Poyomtip T, Jittawuttipoka T, Luplertlop N, Sakuntabhai A, Chimnarok S, Jirawatnotai S, Tohtong R.** 2016. Inhibition of protein kinase C promotes dengue virus replication. *Viol J* **13**:35.
118. **Limjindaporn T, Panaampon J, Malakar S, Noisakran S, Yenchitsomanus PT.** 2017. Tyrosine kinase/phosphatase inhibitors decrease dengue virus production in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **483**:58-63.
119. **Fraser JE, Wang C, Chan KW, Vasudevan SG, Jans DA.** 2016. Novel dengue virus inhibitor 4-HPR activates ATF4 independent of protein kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase and elevates levels of eIF2alpha phosphorylation in virus infected cells. *Antiviral Res* **130**:1-6.
120. **Jordan TX, Randall G.** 2017. Dengue Virus Activates the AMP Kinase-mTOR Axis To Stimulate a Proviral Lipophagy. *J Virol* **91**.
121. **Bekerman E, Neveu G, Shulla A, Brannan J, Pu SY, Wang S, Xiao F, Barouch-Bentov R, Bakken RR, Mateo R, Govero J, Nagamine CM, Diamond MS, De Jonghe S, Herdewijn P, Dye JM, Randall G, Einav S.** 2017. Anticancer kinase inhibitors impair intracellular viral trafficking and exert broad-spectrum antiviral effects. *J Clin Invest* **127**:1338-1352.
122. **Li Y, Xie J, Wu S, Xia J, Zhang P, Liu C, Zhang P, Huang X.** 2013. Protein kinase regulated by dsRNA downregulates the interferon production in dengue virus- and dsRNA-stimulated human lung epithelial cells. *PLoS One* **8**:e55108.
123. **Anwar A, Hosoya T, Leong KM, Onogi H, Okuno Y, Hiramatsu T, Koyama H, Suzuki M, Hagiwara M, Garcia-Blanco MA.** 2011. The kinase inhibitor SFV785 dislocates dengue virus envelope protein from the replication complex and blocks virus assembly. *PLoS One* **6**:e23246.
124. **Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H.** 1995. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* **81**:95-105.
125. **Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Sumi N, Okano Y.** 1998. Identification and characterization of STK12/Aik2: a human gene related to aurora of *Drosophila* and yeast IPL1. *Cytogenet Cell Genet* **82**:147-152.

126. **Tseng TC, Chen SH, Hsu YP, Tang TK.** 1998. Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *DNA Cell Biol* **17**:823-833.
127. **Nigg EA.** 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:21-32.
128. **Katayama H, Brinkley WR, Sen S.** 2003. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* **22**:451-464.
129. **Castro A, Vigneron S, Bernis C, Labbe JC, Prigent C, Lorca T.** 2002. The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO Rep* **3**:1209-1214.
130. **Nguyen HG, Chinnappan D, Urano T, Ravid K.** 2005. Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol Cell Biol* **25**:4977-4992.
131. **Crane R, Kloepfer A, Ruderman JV.** 2004. Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J Cell Sci* **117**:5975-5983.
132. **Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C.** 2007. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* **5**:1-10.
133. **Giet R, Prigent C.** 1999. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci* **112 (Pt 21)**:3591-3601.
134. **Shindo M, Nakano H, Kuroyanagi H, Shirasawa T, Mihara M, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Yagita H, Okumura K.** 1998. cDNA cloning, expression, subcellular localization, and chromosomal assignment of mammalian aurora homologues, aurora-related kinase (ARK) 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* **244**:285-292.
135. **Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC.** 2012. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**:789-803.
136. **Bishop JD, Schumacher JM.** 2002. Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem* **277**:27577-27580.
137. **Sessa F, Mapelli M, Ciferri C, Tarricone C, Areces LB, Schneider TR, Stukenberg PT, Musacchio A.** 2005. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell* **18**:379-391.
138. **Honda R, Korner R, Nigg EA.** 2003. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* **14**:3325-3341.
139. **Andrews PD, Ovechkina Y, Morrice N, Wagenbach M, Duncan K, Wordeman L, Swedlow JR.** 2004. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell* **6**:253-268.
140. **Lan W, Zhang X, Kline-Smith SL, Rosasco SE, Barrett-Wilt GA, Shabanowitz J, Hunt DF, Walczak CE, Stukenberg PT.** 2004. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol* **14**:273-286.
141. **Shandilya J, Medler KF, Roberts SG.** 2016. Regulation of AURORA B function by mitotic checkpoint protein MAD2. *Cell Cycle* **15**:2196-2201.
142. **Giet R, Glover DM.** 2001. Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* **152**:669-682.
143. **Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M.** 2002. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* **7**:11-17.
144. **Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD.** 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is

- governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**:279-291.
145. **Carlton JG, Caballe A, Agromayor M, Kloc M, Martin-Serrano J.** 2012. ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science* **336**:220-225.
 146. **Capalbo L, Montembault E, Takeda T, Bassi ZI, Glover DM, D'Avino PP.** 2012. The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biol* **2**:120070.
 147. **Weeks A, Agnihotri S, Lymer J, Chalil A, Diaz R, Isik S, Smith C, Rutka JT.** 2016. Epithelial Cell Transforming 2 and Aurora Kinase B Modulate Formation of Stress Granule-Containing Transcripts from Diverse Cellular Pathways in Astrocytoma Cells. *Am J Pathol* **186**:1674-1687.
 148. **Jha HC, Lu J, Saha A, Cai Q, Banerjee S, Prasad MA, Robertson ES.** 2013. EBNA3C-mediated regulation of aurora kinase B contributes to Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation through modulation of the activities of the retinoblastoma protein and apoptotic caspases. *J Virol* **87**:12121-12138.
 149. **Jha HC, Yang K, El-Naccache DW, Sun Z, Robertson ES.** 2015. EBNA3C regulates p53 through induction of Aurora kinase B. *Oncotarget* **6**:5788-5803.
 150. **Hu Y, Zhang J, Musharrafieh R, Hau R, Ma C, Wang J.** 2017. Chemical Genomics Approach Leads to the Identification of Hesperadin, an Aurora B Kinase Inhibitor, as a Broad-Spectrum Influenza Antiviral. *Int J Mol Sci* **18**.
 151. **Madejon A, Sheldon J, Francisco-Recuero I, Perales C, Dominguez-Beato M, Lasa M, Sanchez-Perez I, Muntane J, Domingo E, Garcia-Samaniego J, Sanchez-Pacheco A.** 2015. Hepatitis C virus-mediated Aurora B kinase inhibition modulates inflammatory pathway and viral infectivity. *J Hepatol* **63**:312-319.
 152. **Lee S, Jeong AL, Park JS, Han S, Jang CY, Kim KI, Kim Y, Park JH, Lim JS, Lee MS, Yang Y.** 2016. IK-guided PP2A suppresses Aurora B activity in the interphase of tumor cells. *Cell Mol Life Sci* **73**:3375-3386.
 153. **Sugiyama K, Sugiura K, Hara T, Sugimoto K, Shima H, Honda K, Furukawa K, Yamashita S, Urano T.** 2002. Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene* **21**:3103-3111.
 154. **Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB.** 2007. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* **2**:1445-1457.
 155. **Salimi V, Shahsavari Z, Safizadeh B, Hosseini A, Khademian N, Tavakoli-Yaraki M.** 2017. Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment. *Lipids Health Dis* **16**:208.
 156. **Zaikos TD, Painter MM, Sebastian NT, Terry VH, Collins KL.** 2018. Class 1-selective histone deacetylase inhibitors enhance HIV latency reversal while preserving the activity of HDAC isoforms necessary for maximal HIV gene expression. *J Virol* doi:10.1128/JVI.02110-17.
 157. **Imai K, Yamada K, Tamura M, Ochiai K, Okamoto T.** 2012. Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria. *Cell Mol Life Sci* **69**:2583-2592.
 158. **Gadea BB, Ruderman JV.** 2005. Aurora kinase inhibitor ZM447439 blocks chromosome-induced spindle assembly, the completion of chromosome condensation, and the establishment of the spindle integrity checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell* **16**:1305-1318.
 159. **Guy B, Noriega F, Ochiai RL, L'Azou M, Delore V, Skipetrova A, Verdier F, Coudeville L, Savarino S, Jackson N.** 2017. A recombinant live attenuated tetravalent vaccine for the prevention of dengue. *Expert Rev Vaccines* **16**:1-13.
 160. **Sanofi.** 2017. Sanofi updates information on dengue vaccine Paris, France.

161. **Romani B, Kamali Jamil R, Hamidi-Fard M, Rahimi P, Momen SB, Aghasadeghi MR, Allahbakhshi E.** 2016. HIV-1 Vpr reactivates latent HIV-1 provirus by inducing depletion of class I HDACs on chromatin. *Sci Rep* **6**:31924.
162. **Shirakawa K, Chavez L, Hakre S, Calvanese V, Verdin E.** 2013. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends Microbiol* **21**:277-285.
163. **Shestakova E, Bandu MT, Doly J, Bonnefoy E.** 2001. Inhibition of histone deacetylation induces constitutive derepression of the beta interferon promoter and confers antiviral activity. *J Virol* **75**:3444-3452.
164. **Raung SL, Chen SY, Liao SL, Chen JH, Chen CJ.** 2005. Tyrosine kinase inhibitors attenuate Japanese encephalitis virus-induced neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **327**:399-406.
165. **Mohr EL, McMullan LK, Lo MK, Spengler JR, Bergeron E, Albarino CG, Shrivastava-Ranjan P, Chiang CF, Nichol ST, Spiropoulou CF, Flint M.** 2015. Inhibitors of cellular kinases with broad-spectrum antiviral activity for hemorrhagic fever viruses. *Antiviral Res* **120**:40-47.
166. **Perwitasari O, Yan X, O'Donnell J, Johnson S, Tripp RA.** 2015. Repurposing Kinase Inhibitors as Antiviral Agents to Control Influenza A Virus Replication. *Assay Drug Dev Technol* **13**:638-649.
167. **Vijayan M, Seo YJ, Pritzl CJ, Squires SA, Alexander S, Hahm B.** 2014. Sphingosine kinase 1 regulates measles virus replication. *Virology* **450-451**:55-63.
168. **Hirata N, Suizu F, Matsuda-Lennikov M, Edamura T, Bala J, Noguchi M.** 2014. Inhibition of Akt kinase activity suppresses entry and replication of influenza virus. *Biochem Biophys Res Commun* **450**:891-898.
169. **Manjunatha V, Singh KP, Saminathan M, Singh R, Shivasharanappa N, Umeshappa CS, Dhama K, Manjunathareddy GB.** 2017. Inhibition of MEK-ERK1/2-MAP kinase signalling pathway reduces rabies virus induced pathologies in mouse model. *Microb Pathog* **112**:38-49.
170. **Li M, Jung A, Ganswindt U, Marini P, Friedl A, Daniel PT, Lauber K, Jendrossek V, Belka C.** 2010. Aurora kinase inhibitor ZM447439 induces apoptosis via mitochondrial pathways. *Biochem Pharmacol* **79**:122-129.
171. **Suzuki T, Miyazaki K, Kita K, Ochi T.** 2009. Trivalent dimethylarsenic compound induces histone H3 phosphorylation and abnormal localization of Aurora B kinase in HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **241**:275-282.
172. **Zhang L, Zhang S.** 2011. ZM447439, the Aurora kinase B inhibitor, suppresses the growth of cervical cancer SiHa cells and enhances the chemosensitivity to cisplatin. *J Obstet Gynaecol Res* **37**:591-600.
173. **Kumari G, Ulrich T, Krause M, Finkernagel F, Gaubatz S.** 2014. Induction of p21CIP1 protein and cell cycle arrest after inhibition of Aurora B kinase is attributed to aneuploidy and reactive oxygen species. *J Biol Chem* **289**:16072-16084.
174. **Kovackova S, Chang L, Bekerman E, Neveu G, Barouch-Bentov R, Chaikuad A, Heroven C, Sala M, De Jonghe S, Knapp S, Einav S, Herdewijn P.** 2015. Selective Inhibitors of Cyclin G Associated Kinase (GAK) as Anti-Hepatitis C Agents. *J Med Chem* **58**:3393-3410.
175. **Tabata K, Arimoto M, Arakawa M, Nara A, Saito K, Omori H, Arai A, Ishikawa T, Konishi E, Suzuki R, Matsuura Y, Morita E.** 2016. Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep* **16**:2339-2347.
176. **Chiou CT, Hu CC, Chen PH, Liao CL, Lin YL, Wang JJ.** 2003. Association of Japanese encephalitis virus NS3 protein with microtubules and tumour susceptibility gene 101 (TSG101) protein. *J Gen Virol* **84**:2795-2805.

177. **Carpp LN, Galler R, Bonaldo MC.** 2011. Interaction between the yellow fever virus nonstructural protein NS3 and the host protein Alix contributes to the release of infectious particles. *Microbes Infect* **13**:85-95.
178. **Corless L, Crump CM, Griffin SD, Harris M.** 2010. Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *J Gen Virol* **91**:362-372.
179. **Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, Nigg EA, Terada Y, Tatsuka M, Nagata K, Inagaki M.** 2003. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem* **278**:8526-8530.
180. **Teo CS, Chu JJ.** 2014. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. *J Virol* **88**:1897-1913.
181. **Wang C, Chen J, Cao W, Sun L, Sun H, Liu Y.** 2016. Aurora-B and HDAC synergistically regulate survival and proliferation of lymphoma cell via AKT, mTOR and Notch pathways. *Eur J Pharmacol* **779**:1-7.
182. **Chen HH, Chen CC, Lin YS, Chang PC, Lu ZY, Lin CF, Chen CL, Chang CP.** 2017. AR-12 suppresses dengue virus replication by down-regulation of PI3K/AKT and GRP78. *Antiviral Res* **142**:158-168.
183. **Lee CJ, Liao CL, Lin YL.** 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.