

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**Dengue virus puede entrar y salir de células epiteliales por la superficie
apical y basolateral afectando el complejo de unión apical**

Tesis que presenta:

Liliana Ramírez Hernández

Para Obtener el Grado de:

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de:

Infectómica y Patogénesis Molecular

Director de tesis:

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

ASESORES

DRA. ABIGAIL BETANZOS FERNÁNDEZ

Catedrática CONACYT. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.
Cinvestav-IPN, Zacatenco. México, D.F.

DRA. ANA LORENA GUTIÉRREZ ESCOLANO

Profesora Titular. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.
Cinvestav-IPN, Zacatenco. México, D.F.

DR. JUAN ERNESTO LUDERT LEÓN

Profesor Titular. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. Cinvestav-
IPN, Zacatenco. México, D.F.

DR. VIANNEY ORTÍZ NAVARRETE

Profesor Titular. Departamento de Biomedicina Molecular. Cinvestav-
IPN, Zacatenco. México, D.F.

DR. JUAN SANTIAGO SALAS BENITO

Profesor Titular. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Instituto Politécnico
Nacional. México, D.F.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres.

Para la realización del estudio de Doctorado, se obtuvo la beca número 332868 por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), institución a la cual se le agradece el apoyo económico brindado durante el desarrollo de dicho estudio.

Agradecimientos profesionales

A la Dra. Rosa Ma. Del Ángel por dirigir mi trabajo y por todas las enseñanzas obtenidas en su laboratorio.

A mis asesores la Dra. Abigail Betanzos, la Dra. Ana Lorena Gutiérrez, el Dr. Juan E. Ludert, el Dr. Vianney Ortíz y al Dr. Juan Salas por sus sugerencias, comentarios y apoyo brindado.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y enriquecimiento de aprendizaje.

A la Dra. Patricia Cuellar, a Fernando Medina y a Jaime Zarco por su apoyo técnico.

Y a todos aquéllos que en algún momento me brindaron su apoyo, cariño y amistad y que han contribuido de una u otra manera para que me encuentre en este momento de mi vida.

Dedicatorias

A mi familia:

Por todo el apoyo
que me han brindado a lo largo de mi vida,
por su cariño brindado
y por sus sabios consejos
que me han orientado en cada momento.

A Dios:

Por prestarme
vida y salud.

Y a mis amigos:

Por todo su apoyo
a lo largo de este tiempo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
I. ANTECEDENTES GENERALES.....	1
1.1	
Epidemiología.....	1
1.2 Manifestaciones clínicas de la enfermedad por DENV.....	2
1.3 Características de DENV.....	2
1.4 Ciclo replicativo de DENV.....	4
1.5 Características de los epitelios.....	6
1.6 Características y funciones de las uniones estrechas.....	8
1.7 Composición molecular de las UEs.....	11
 1.7.1 Claudinas.....	11
 1.7.2 Ocludinas.....	12

1.7.3 JAMs y CAR.....	12
1.7.4 La familia Zonula occludens (ZO)	12
1.8 Características y funciones de las uniones adherentes.....	13
1.8.1 Cadherinas.....	13
1.8.2 Cateninas.....	14
1.8.3 Nectinas y proteínas tipo nectina (Nect)	14
1.8.4 Afadina.....	14
II. ANTECEDENTES PARTICULARES.....	15
2.1 Algunos virus y las proteínas del complejo de unión apical.....	15
2.1.1 Virus y su interacción con las uniones estrechas.....	15
2.1.2 Virus y su interacción con las uniones adherentes.....	16
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVOS.....	20
5.1 Objetivo general.....	20
5.2 Objetivos particulares.....	20

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Reactivos y anticuerpos.....	22
Células.....	22
Propagación viral.....	23
Ensayos de plaqueo.....	24
Infección de células MDCK y Huh-7.....	24
Citometría de flujo.....	25
Medición de la proteína NS1 secretada.....	25
Medición de la TEER en monocapas de MDCK.....	26
Infección polarizada de DENV.....	26
Ensayo de flujo paracelular.....	26
Ensayo de difusión de lípidos de membrana.....	27
Ensayos de inmunofluorescencia.....	27
SDS-PAGE y Western blot.....	28
Ensayos de viabilidad celular.....	28
Análisis estadístico.....	29
VIII. RESULTADOS.....	30

La infección por DENV no provoca citotoxicidad en células MDCK.....	30
Las células MDCK son permisivas a la infección por DENV.....	31
DENV establece una infección productiva en células MDCK.....	32
Las células Huh-7 son permisivas a la infección por DENV.....	33
DENV infecta tanto la membrana apical como la basolateral de las células MDCK, pero la infección tardía conduce a la secreción preferencial de la proteína viral NS1 hacia la superficie apical.....	36
DENV induce una respuesta en la TEER bifásica acompañada de un incremento en la permeabilidad celular.....	37
DENV altera la función de barrera.....	39
La infección por DENV afecta la localización subcelular de las proteínas claudina-1, ZO-1 y ZO-2.....	40
La infección por DENV resulta en la degradación de un subgrupo de proteínas del CUA.....	42
IX. DISCUSIÓN.....	43
X. CONCLUSIONES.....	50
XI. PERSPECTIVAS.....	51
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico
BHK	Células de riñón de hámster recién nacido
BSA	Albúmina sérica bovina
BSEP	Proteína de exportación de sal biliar
C	Proteína de la cápside
CaCl₂	Cloruro de calcio
Caco-2	Células epiteliales de adenocarcinoma colorectal
CCHFV	Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo
CHIKV	Virus Chikungunya
cm²	Centímetro cuadrado
CO₂	Dióxido de Carbono
CUA	Complejo de unión apical
DC-SIGN	Molécula de adhesión de células dendríticas
DCs	Células dendríticas
DENV	Virus del dengue
DMEM	Medio modificado Dulbecco
DS	Dengue severo
E	Proteína de envoltura
ECP	Efecto citopático
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FD	Fiebre por dengue
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramos
h	Hora
h.p.i.	Horas post-infección
HCl	Ácido clorhídrico
HCV	Virus de la hepatitis C

HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etanosulfónico]
HMGB1	Proteína de alta movilidad del grupo de caja 1
HRP	Peroxidasa del rábano
Huh-7	Línea celular derivada de hepatocitos diferenciados a partir de un carcinoma celular
HUVEC	Células endoteliales de la vena del cordón umbilical
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
JAM	Moléculas adherentes de unión
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
l	Litro
LDLR	Receptor de lipoproteína de baja densidad
M	Proteína de membrana
M	Molar
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MDCK	Células epiteliales de riñón Mardin-Darby
mg	Miligramos
MIF	Factor inhibidor de macrófagos
min	Minutos
MIP-1α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1- α
MIP-β	Proteína inflamatoria de macrófagos 1- β
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección

MR	Receptor de manosa
Na-piruvato	Piruvato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
nmol	Nanomol
NS	Proteína no estructural
OMS	Organización mundial de la salud
ORF	Marco de lectura abierto
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBST	PBS-tween
PET	Poliéster
PFA	Paraformaldehído
PGE2	Prostaglandinas E2
pH	Potencial hidrógeno
pr	Péptido de premembrana
RANTES	Citocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación.
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SFB	Suero fetal bovino
sNS1	Proteína no estructural-1 soluble
TEER	Resistencia eléctrica transepitelial
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

U	Unidades
UAs	Uniones adherentes
UEs	Uniones estrechas
UPF	Unidades formadoras de placas líticas
WNV	Virus del oeste del nilo
µg	Microgramo
µl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
Figura 1	Epidemiología mundial de DENV	1
Figura 2	Estructura y genoma de DENV	3
Figura 3	Ciclo replicativo de DENV	6
Figura 4	Representación esquemática de un epitelio y de las rutas de transporte a través de las monocapas	8
Figura 5	Las uniones estrechas pueden ser observadas por microscopía y por inmunofluorescencia.	9
Figura 6	Modelo de las funciones de las uniones estrechas	10
Figura 7	Principales componentes de las uniones estrechas	11
Figura 8	Componentes de las uniones adherentes	13
Figura 9	Los virus utilizan a proteínas del CUA como receptores	16
Figura 10	Viabilidad celular de células MDCK infectadas con DENV	30
Figura 11	DENV infecta a las células MDCK	31
Figura 12	DENV establece una infección productiva en células MDCK	33
Figura 13	Viabilidad celular de células Huh-7 infectadas con DENV	34
Figura 14	Infección por DENV en células Huh-7	36
Figura 15	ECP de células Huh-7 infectadas con DENV	36
Figura 16	DENV entra a las células MDCK en una manera no polarizada	37

Figura 17	DENV altera la TEER en células MDCK infectadas apicalmente	39
Figura 18	DENV altera la función de barrera de las uniones estrechas	40
Figura 19	DENV deslocaliza a proteínas de las UEs en células MDCK	41
Figura 20	DENV afecta la integridad de algunas proteínas del CUA en células MDCK	42
Figura 21	Modelo de la infección por DENV en células MDCK	49

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
Tabla 1	Funciones de las proteínas de DENV	3
Tabla 2	Interacción de algunos virus patogénicos con componentes del CUA	17

RESUMEN

Dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más relevante en el mundo. Se estima que 390 millones de infecciones de dengue ocurren cada año. La infección por el virus del dengue (DENV) puede ser asintomática o puede producir una enfermedad febril conocida como fiebre por dengue (FD) o una forma severa de la infección conocida como dengue severo (DS). En algunos virus, la entrada y salida de éstos desde las células, ocurre en un dominio específico de las células endoteliales y epiteliales polarizadas. Así, en este estudio, investigamos si la entrada y salida de DENV era polarizada en células epiteliales. También, evaluamos el efecto de la infección por DENV sobre las uniones celulares de células epiteliales. Para nuestros estudios, usamos la línea celular epitelial MDCK, la cual sirve como un excelente modelo para estudiar una barrera funcional debido a la presencia de un complejo de unión apical (CUA). Evaluamos la infección polarizada de DENV en esta línea celular, a través de ensayos en Transwell y mostramos que la entrada y salida de DENV desde las células MDCK, es bipolar. Adicionalmente, realizamos ensayos de flujo paracelular, de difusión de lípidos de membrana, inmunofluorescencias y ensayos de Western blot para evaluar la integridad del CUA durante la infección por DENV. Observamos que DENV alteró las funciones de barrera a tiempos tardíos de infección, causando una alteración en la TEER, una degradación y deslocalización de un subgrupo de proteínas de las UEs y UAs en las células evaluadas. El presente estudio contribuye a entender cómo DENV escapa de los epitelios para causar una infección productiva, así como provee herramientas en los mecanismos de patogénesis de DENV.

ABSTRACT

Dengue is the most relevant mosquito-borne viral disease in the world. It has been estimated that 390 million infections of dengue occur each year. Dengue virus (DENV) infection can be asymptomatic or can produce a self-limited febrile illness called dengue fever (DF) or a severe form of the infection called severe dengue. In some viruses, the entry and egress from cells, occur in a specific domain of polarized endothelial and epithelial cells. Thus, in this study, we investigated whether the entry and release of DENV was polarized in epithelial cells. Also, we evaluated the effect of DENV infection on cellular junctions of epithelial cells. For our studies, we used MDCK epithelial cell line, which serve as an excellent model to study a functional barrier due to the presence of an apical junctional complex (AJC). We evaluated the polarized infection of DENV in this cell line, through Transwell assays and we showed that entry and release of DENV from MDCK cells, is bipolar. Additionally, we performed paracellular flux, diffusion of membrane lipid, immunofluorescence and immunoblotting assays to evaluate the integrity of the AJC during a DENV infection. We observed that DENV altered the barrier functions at later stages of infection by causing an alteration in the TEER, a perturbation in the fence function of epithelial cells and finally, a degradation and a delocalization of a number of TJ and AJ proteins in cells tested. The present study contributes to understand how DENV escapes from epitheliums in order to cause a productive infection, as well as, provides insights into the mechanism of DENV pathogenesis.

INTRODUCCIÓN

Dengue es la enfermedad arboviral más prevalente en humanos, causada por alguno de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV1-4), el cual es transmitido por la picadura del mosquito hembra *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Actualmente, la incidencia global de infecciones por DENV ha aumentado 30 veces en los últimos 50 años, poniendo en riesgo a más de la mitad de la población mundial, conduciendo a un impacto considerable en los servicios de salud, así como enormes costos socioeconómicos.

I. ANTECEDENTES GENERALES

1.1 Epidemiología

Dengue es endémico en más de 100 países, incluyendo regiones en el sureste de Asia, América, el Pacífico oeste, África y en el Mediterráneo oriental (**Fig. 1**). Se estima que 4 billones de personas están en riesgo de infección por DENV y que anualmente 390 millones de personas son infectadas, de los cuales 300 millones son infecciones asintomáticas, pero que pueden contribuir en la transmisión. Cerca de 100 millones son infecciones sintomáticas, siendo el 5% (500 000) casos clínicos por dengue severo (DS), de los cuales el 2.5% pueden conducir a la muerte (Guzman and Harris, 2015; Pang et al., 2017).

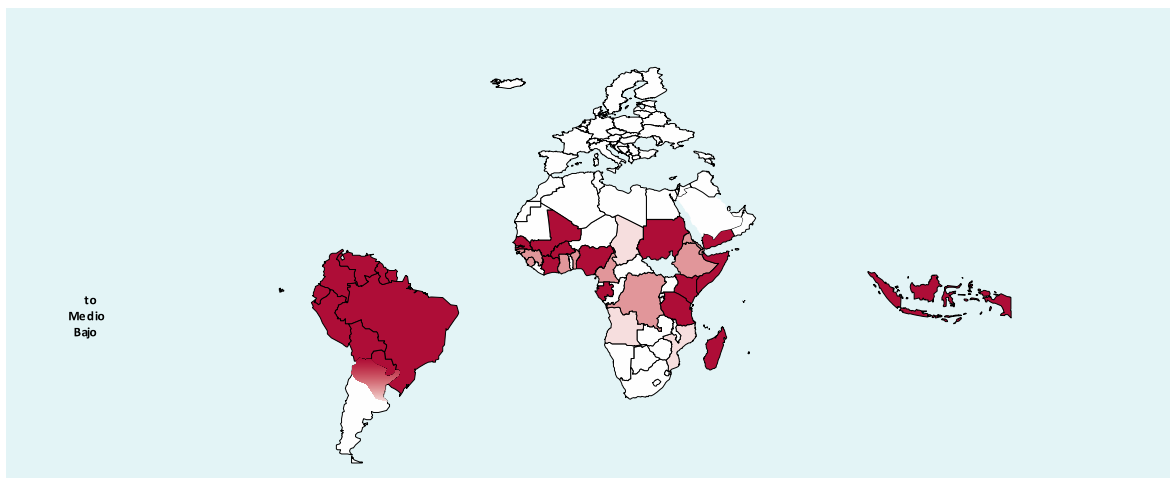


Figura 1. Epidemiología mundial de DENV. En color rojo se muestra la presencia de dengue alrededor del mundo (Guzman and Harris, 2015).

1.2 Manifestaciones clínicas de la enfermedad por DENV

Después de un periodo de incubación de 4 a 8 días, la infección por DENV puede resultar en una enfermedad desapercibida (75% de infecciones asintomáticas) o puede conducir a una serie de manifestaciones clínicas que van desde la fiebre por dengue (FD) hasta el dengue severo (DS) (Diamond and Pierson, 2015; Guzman and Harris, 2015). En el 2009, la OMS realizó una nueva clasificación clínica para la enfermedad por DENV, siendo dengue con o sin signos de alarma o dengue severo (Guzman et al., 2016). La FD se presenta con la aparición repentina de fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares y articulares y rash, los cuales típicamente desaparecen entre los 7 a 14 días de su aparición (Diamond and Pierson, 2015). La mayoría de los pacientes se recuperan satisfactoriamente, sólo una fracción de pacientes, después de la defervescencia, evolucionan a dengue severo, el cual se caracteriza principalmente por la salida de plasma, aumento en la permeabilidad capilar, acompañada por trombocitopenia y manifestaciones hemorrágicas en la piel y el tracto gastrointestinal. La rápida pérdida de líquidos causa hemoconcentración e hipotensión, lo cual puede conducir a un choque hipovolémico y falla multiorgánica, llevando finalmente a la muerte (Diamond and Pierson, 2015; Guzman and Harris, 2015; Katzelnick et al., 2017).

1.3 Características de DENV

DENV pertenece al género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*. Es un virus envuelto, esférico con un diámetro de aproximadamente 50 nm. El genoma comprende aproximadamente 11 kb de una cadena positiva de ARN, la cual codifica una poliproteína, ésta a su vez codifica diez proteínas. Las tres proteínas estructurales codificadas por el genoma son la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E) y la proteína de la cápside (C); mientras que las siete proteínas no estructurales son NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (**Fig. 2, Tabla 1**) (Khetarpal and Khanna, 2016).

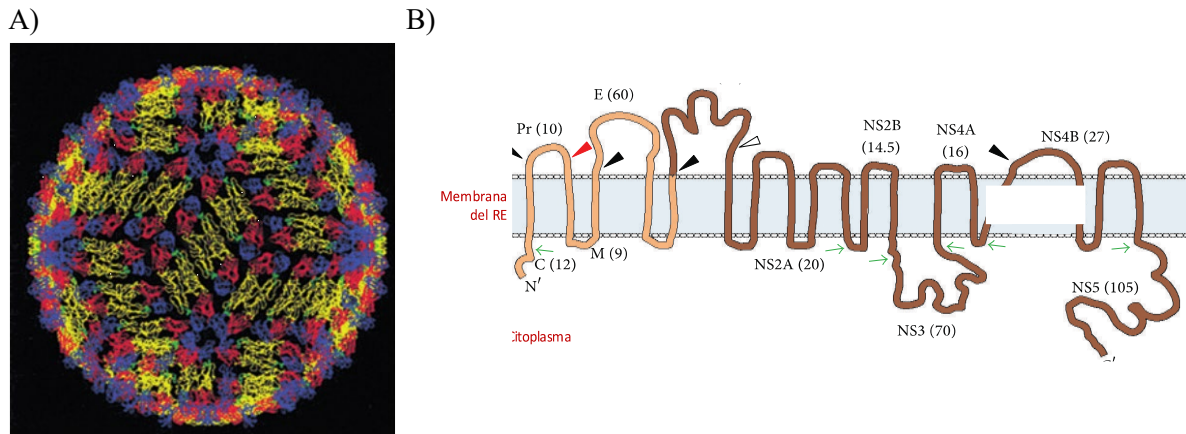


Figura 2. Estructura y genoma de DENV. (A) Partícula madura de DENV. (B) El ARN viral es traducido como una poliproteína sencilla constituida por componentes estructurales (café claro-C, prM y E) y por componentes no estructurales (café fuerte-NS1, 2A, 2B, 3, 4A y 5). Los símbolos C, prM, E y NS se refieren a proteína de la cápside, proteína precursora de membrana, proteína de envoltura y proteína no estructural respectivamente. La poliproteína es procesada por proteasas virales (flecha verde) y del huésped (flecha negra). Las proteínas estructurales prM y E, continúan ancladas a la cara del lumen de la membrana del retículo endoplásmico (RE). La proteína C se encuentra anclada a la cara citoplasmática de la membrana del RE. Posteriormente prM es cortada por la proteasa furina (flecha roja) en el péptido pr y en la proteína M. Las proteínas NS son procesadas principalmente por NS2B-NS3 (proteasa viral) en el citoplasma. El peso molecular aproximado (en kDa) de cada proteína está indicado entre paréntesis. (Khetarpal and Khanna, 2016; Screaton et al., 2015).

Tabla 1. Funciones de las proteínas de DENV (Guzman et al., 2016; Khetarpal and Khanna, 2016).

Proteína	Tamaño (kDa)	Función
<i>Proteínas estructurales</i>		
Cápside (C)	12	Une y estabiliza el ARN viral.
Premembrana/membrana (prM/M)	19	- El péptido pr funciona como una caperuza que protege la fusión del péptido sobre E, previniéndola fusión prematura. - M forma un canal iónico.

Envoltura (E)	60	- Reconoce y se une a la célula huésped. - Implicada en la fusión de las membranas virales y endosomales.
<i>Proteínas no estructurales</i>		
NS1	48	- Implicada en replicación viral. - NS1s activa el sistema inmune innato y está implicada en alteración vascular.
NS2A	20	Replicación viral y ensamble.
NS2B	14.5	Cofactor de la proteasa NS3.
NS3	70	- Serin proteasa corta la poliproteína viral. - Helicasa de ARN y RTPasa/NTPasa viral. - Inducción de apoptosis en células infectadas.
NS4A	16	Requerida para la formación de vesículas de replicación.
NS4B	27	- Interactúa con NS3. - Bloquea el señalamiento inducido por IFN- α/β ayudando al virus a que escape de la respuesta inmune innata del huésped.
NS5	105	- Metil transferasa. - ARN polimerasa dependiente de ARN. - Implicada en el bloqueo del sistema de IFN.

1.4 Ciclo replicativo de DENV

El virus del dengue puede existir en un número de formas diferentes dependiendo del grado de corte de la proteína prM por la furina. Las partículas de DENV que contienen totalmente a la proteína prM, no son infecciosas, mientras que todas aquellas partículas en las cuales prM ya fue procesada son totalmente maduras e infecciosas. En el mismo sentido, también pueden existir un número de partículas intermediarias, las cuales son formas parcialmente maduras, debido a que una parte de prM ha sido procesada por la furina y otra continúa

intacta. Tanto las partículas virales totalmente maduras como las parcialmente maduras, ambas son infectivas (**Fig. 3, paso 1**). El proceso de replicación viral de dengue empieza cuando un virión se adhiere directamente a diversos grupos de receptores celulares del huésped o cuando la porción Fc de un complejo inmune de DENV se une al receptor Fc sobre las células blanco (**paso 2**) y subsecuentemente entra a la célula por endocitosis mediada por receptor (**paso 3**). La acidificación de las vesículas endosomales conduce a cambios conformacionales en el virión, resultando en una trimerización irreversible de la proteína viral E. Esto expone al péptido de fusión y se lleva a cabo la fusión entre las membranas virales y endosomales, permitiendo la liberación de la nucleocápside dentro del citoplasma. El ARN viral es liberado en el citoplasma y presentado al retículo endoplásmico (**paso 4**). En el RE, el ARN viral es traducido en una poliproteína sencilla, la cual es procesada por proteasa virales y del huésped (**paso 5**). Después que el complejo de replicación viral es sintetizado, la traducción del ARN viral se apaga, y empieza la síntesis de ARN por la transcripción de un ARN viral anti sentido, seguido por la amplificación del ARN viral (**paso 6**). Las nuevas moléculas de ARN sintetizadas son empaquetadas por la proteína viral C, formando una nucleocápside (**paso 7**). En ensamblaje viral ocurre sobre la superficie del RE cuando la nucleocápside brota dentro del lumen del RE, resultando en partículas virales inmaduras no infecciosas (**paso 8**). Las partículas virales inmaduras son transportadas por la red del trans-Golgi, donde la acidificación induce cambios conformacionales en el virión y expone los sitios de corte de la furina. La proteasa del huésped furina corta el sitio entre la proteína pr y la proteína M, permaneciendo el péptido pr asociado al virión, hasta que éste es liberado en el medio extracelular a un pH neutro (**paso 9**) (Screaton et al., 2015).

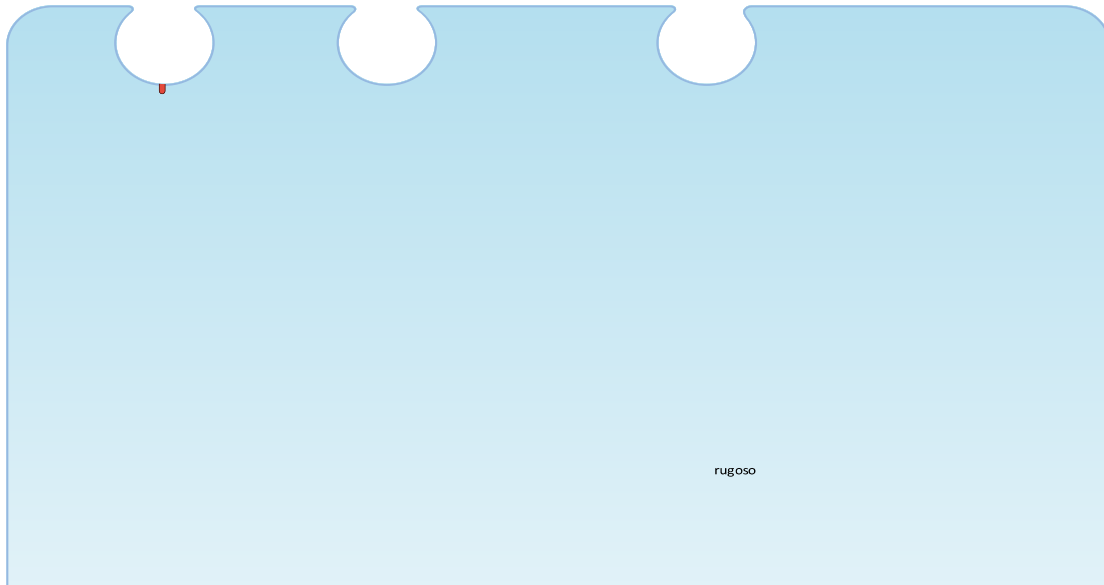


Figura 3. Ciclo replicativo de DENV. (1) Partículas virales maduras y parcialmente maduras, (2) adhesión de DENV a la célula huésped, (3) Endocitosis mediada por receptor, (4) fusión de membranas y liberación de nucleocápside, (5) traducción, (6) replicación, (7) formación de nucleocápside, (8) ensamblaje y (9) liberación de viriones (Screaton et al., 2015).

1.5 Características de los epitelios

Los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas (DCs) son consideradas como las principales células blanco para la infección por DENV, pero dado el hecho que el mosquito inocula las partículas virales dentro de la piel humana mientras se está alimentando, uno de los blancos celulares potenciales para este virus debería ser más bien las DCs dermales/intersticiales, las cuales están localizadas en el epitelio (Navarro-Sanchez et al., 2005).

Los epitelios forman barreras que separan a los órganos y tejidos del mundo exterior. Una de las características distintivas de las células epiteliales es la polarización de su membrana plasmática en superficie apical y basolateral (**Fig. 4**), cada una caracterizada por una composición diferente tanto morfológicamente como bioquímicamente. La membrana apical

está en contacto con el lumen de las cavidades internas, o en el caso de la piel, está en contacto con el aire o agua que envuelve al cuerpo; mientras que la membrana basolateral está en contacto con el medio interno del organismo (Gonzalez-Mariscal, 2009). Esta organización requiere la formación de uniones intercelulares que permite a las células epiteliales adherirse estrechamente entre ellas y de esta forma regular el tránsito de iones y moléculas hacia y desde las células (Zihni et al., 2014).

La adhesión célula-célula comienza en la punta de los filopodios que sobresalen de las células vecinas, después progresa a la formación de áreas más amplias de contacto y termina con el establecimiento de un complejo de unión ubicado en la parte superior de la membrana lateral que rodea como un cinturón a todas las células epiteliales, denominado complejo de unión apical (CUA), el cual está formado por uniones estrechas (UEs) y uniones adherentes (UAs) (Gonzalez-Mariscal, 2009). El CUA es importante para la permeabilidad y polarización del epitelio. Mientras que las UAs son esenciales para el anclaje entre célula y célula y asegurar la integridad del epitelio, las UEs sellan el espacio entre las células, permitiendo solamente el paso selectivo de iones y la difusión de moléculas sin carga de tamaño específico. Adicionalmente al CUA, los desmosomas participan en la adhesión célula-célula a lo largo de la membrana basolateral (Mateo et al., 2015).

Para poder atravesar un epitelio, existen dos formas: la ruta transcelular y la ruta paracelular. Para cruzar por la vía transcelular, los iones o moléculas necesitan ser hidrofóbicos para poder atravesar la membrana plasmática o alternativamente deben contar con un mecanismo de transporte específico como un canal, una bomba o cotransportador. Mientras que la permeabilidad paracelular es la difusión de iones o moléculas por el espacio intercelular y está regulada por las UEs (**Fig. 4**) (González-Mariscal et al., 2008; Hu et al., 2013).

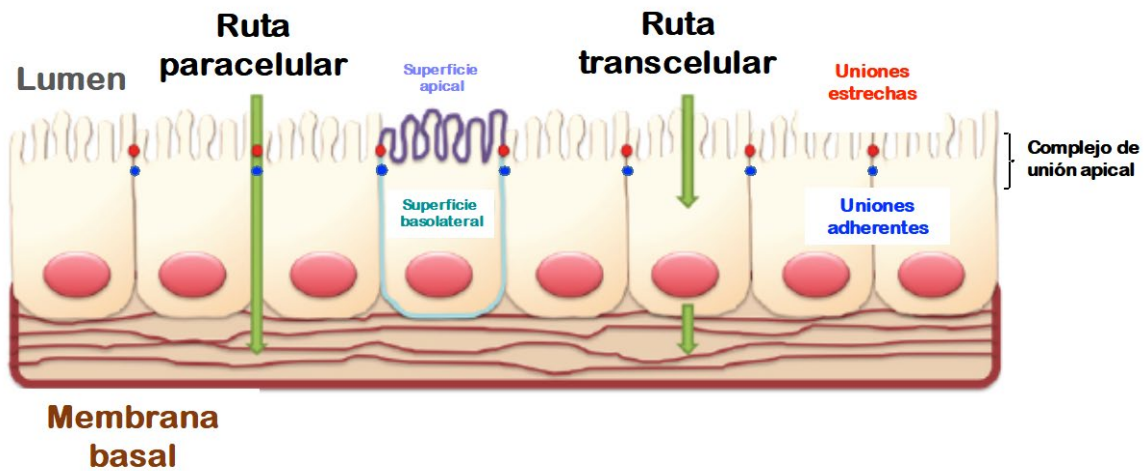


Figura 4. Representación esquemática de un epitelio y de las rutas de transporte a través de las monocapas (González-Mariscal et al., 2012).

1.6 Características y funciones de las uniones estrechas

Las UEs se encuentran localizadas en el límite entre la membrana apical, la cual está en contacto con el lumen, y con la membrana basolateral, la cual está en contacto con el interior del organismo. Por microscopía electrónica de transmisión las UEs aparecen como sitios en donde el espacio intercelular entre células vecinas fue eliminado y las membranas se hubieran fusionado. Por criofractura las UEs son detectadas como una red de cadenas que envuelve a la célula por la superficie apical (**Fig. 5**) (González-Mariscal et al., 2008).

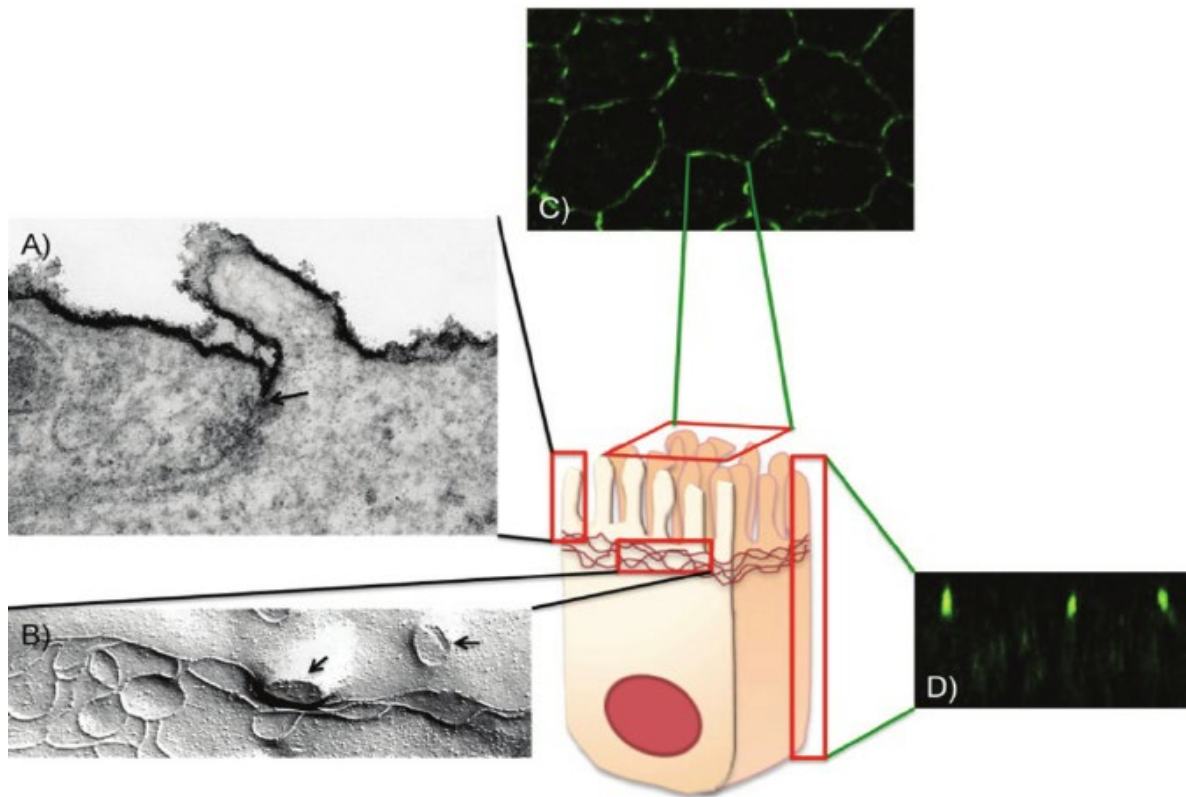


Figura 5. Las uniones estrechas pueden ser observadas por microscopía y por inmunofluorescencia. (A) Por microscopía electrónica de transmisión, las uniones estrechas aparecen en secciones delgadas como puntos de contacto célula-célula en donde las membranas de las células adyacentes parecen fusionarse (flechas). Se observa cómo el marcador electrodenso rojo de rutenio se adhiere a la superficie apical, sin teñir la ruta paracelular que está por debajo de las UEs. **(B)** Por criofractura, las uniones estrechas se visualizan como una red de cadenas por debajo de las microvellosidades (flechas). **(C)** Por inmunofluorescencia las proteínas de las uniones estrechas se observan como un patrón de malla de gallinero cuando son vistas desde arriba, mientras que desde la vista lateral, son observadas como puntos en el límite de la membrana apical y basolateral **(D)** (González-Mariscal et al., 2012).

Las UEs tienen dos funciones, la función de compuerta y la función de barrera (**Fig. 6**). La función de compuerta regula selectivamente la permeabilidad paracelular, a través del transporte pasivo de moléculas entre los tejidos y los distintos compartimentos del cuerpo. Esta función discrimina a los solutos por tamaño y por carga. La selección por carga se da a través de poros dispuestos en serie entre las uniones permitiendo la difusión de iones y de pequeñas moléculas sin carga. La selección por tamaño permite la difusión de grandes solutos y macromoléculas. Ambas selecciones ocurren por mecanismos diferentes. La

permeabilidad a iones es típicamente evaluada por la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) del epitelio. El ensamblaje de las UEs se caracteriza por el incremento de la TEER y por disminuir la permeabilidad celular, y viceversa. Mientras que la difusión macromolecular, se evalúa a través de trazadores como manitol o dextrán acoplados a radioactividad o fluorescencia, durante un periodo de tiempo (Hu et al., 2013; Zihni et al., 2016).

La función de barrera evita el intercambio de los componentes de membrana entre los dominios de la superficie apical y basolateral. Esta función ha sido evaluada por experimentos de difusión con lípidos fluorescentes, los cuales demostraron que las UEs establecen una barrera de difusión que restringe el intercambio de los lípidos apicales y basolaterales, de igual forma se cree pudieran actuar como barrera para las proteínas transmembrana (Zihni et al., 2016).

A)

B)

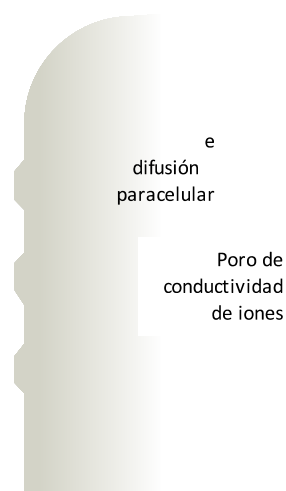


Figura 6. Modelo de las funciones de las uniones estrechas. (A) Función de barrera: Las proteínas transmembranales pueden actuar como una barrera para la difusión de lípidos a lo largo de la cara exoplásmica (flechas). Función de compuerta: Controla la difusión en el espacio paracelular. (B) La compuerta paracelular es semipermeable y diferencia entre diferentes solutos por tamaño y por carga (Zihni et al., 2016).

1.7 Composición molecular de las UEs

A nivel molecular las UEs consisten en complejos proteicos multiméricos, compuestos de proteínas de membrana integrales ligados a proteínas adaptadoras, las cuales actúan como un puente entre proteínas transmembranales y el citoesqueleto, así como anclaje a diferentes tipos de proteínas de señalización. Dentro de las proteínas de las UEs encontramos a las claudinas, ocludinas, a las moléculas de adhesión estrecha (JAMs) y al receptor del Coxsackievirus-adenovirus (CAR) (Fig. 7). (Terry et al., 2010).

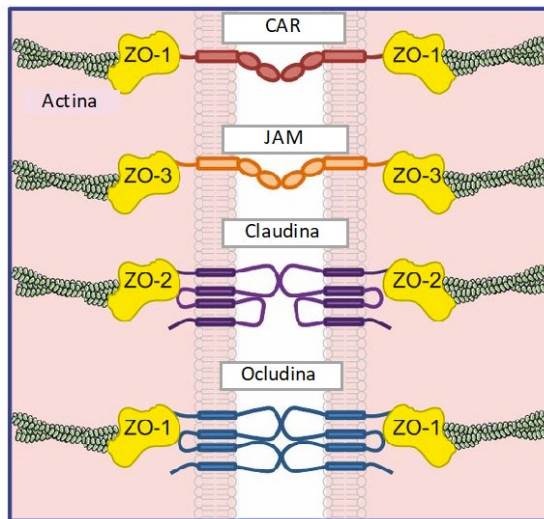


Figura 7. Principales componentes de las uniones estrechas. Están formadas por cuatro proteínas transmembranales: el receptor de coxsackievirus y adenovirus (CAR), moléculas de adhesión estrecha (JAM), claudina y ocludina. Todas estas proteínas están asociadas con las proteínas zonula occludens (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) a través de su tallo citosólico. Las proteínas ZO ligan a las proteínas de membrana con el citoesqueleto de actina (Mateo et al., 2015).

1.7.1 Claudinas

Las claudinas constituyen una familia de más de 20 proteínas de tamaño entre 20 a 25 kDa, que contienen cuatro dominios transmembranales. Las claudinas son el principal componente de las UEs y aunque son encontradas en todos los epitelios y endotelios, su distribución es específica en cada tejido. Las claudinas son parte de la barrera de difusión paracelular y median la difusión paracelular selectiva de iones a través de poros paracelulares (Balda and Matter, 2016; González-Mariscal et al., 2008; Terry et al., 2010).

1.7.2 Ocludina

Ocludina es una proteína tetra-transmembranal, con un peso molecular aproximado de 55.9 kDa, con cuatro dominios transmembranales y dos bucles extracelulares, es expresada predominantemente en células epiteliales y endoteliales. Su extremo carboxilo terminal interno tiene algunos sitios que interactúan con ZO-1, ZO-2 y con sitios de fosforilación (Harhaj and Antonetti, 2004; Lu et al., 2014).

El papel fisiológico de ocludina aún sigue siendo controversial. Por una parte su sobre-expresión o mutaciones afecta severamente la TEER, y por otra ratones en los cuales son se expresa ocludina, son viables y exhiben uniones estrechas con una morfología aparentemente normal (González-Mariscal et al., 2008).

1.7.3 JAMs y CAR

Tanto las moléculas de adhesión estrecha (JAM, 36-41 kDa) como el receptor de Coxsackievirus-adenovirus, son proteínas que tienen un dominio transmembranal y un dominio extracelular tipo IgG que media la adhesión. Las proteínas JAMs son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresan tanto en las células epiteliales como en las endoteliales, en donde juegan un papel importante en etapas tempranas de la formación y regulación de las UEs. La expresión de CAR es exclusivamente restringida a las células epiteliales. Interacciones trans-homotípicas de JAMs y CAR contribuyen a la formación y estabilidad de las UEs (Harhaj and Antonetti, 2004; Lu et al., 2014; Mateo et al., 2015).

1.7.4 La familia Zonula occludens (ZO)

ZO-1, ZO-2 y ZO-3 son miembros de la familia de proteínas MAGUK (cinasa guanilato asociada a membrana) y son un importante subgrupo de las proteínas PDZ de las uniones estrechas. ZOs son asociadas periféricamente a proteínas de membrana como claudinas, ocludina y JAM, anclando éstas al citoesqueleto de actina. Las proteínas ZO establecen numerosas interacciones proteína-proteína, reclutando en las UEs diversas cinasas, fosfatasas, proteínas pequeñas G y factores de transcripción (González-Mariscal et al., 2008).

1.8 Características y funciones de las uniones adherentes

Las UAs están localizadas justo debajo de las UEs, en la superficie apical del epitelio. Están integradas por dos tipos de receptores integrales, cadherinas y nectinas, las cuales se encuentran ligadas al citoesqueleto de actina por dos proteínas periféricas, cateninas y afadina (Fig. 8).

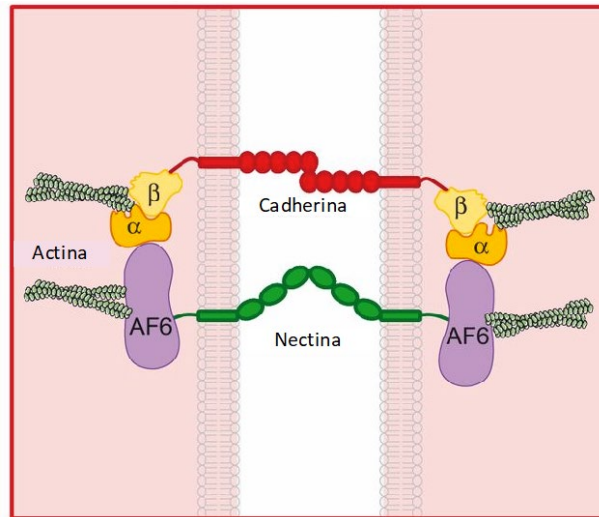


Figura 8. Componentes de las uniones adherentes. Las uniones adherentes están formadas por dos proteínas transmembranales, cadherinas y nectinas. Las cadherinas se unen al citoesqueleto de F-actina a través de α y β -catenina. Mientras que las nectinas están conectadas con F-actina a través de la proteína afadina (AF6). AF6 y las cateninas también interactúan (Mateo et al., 2015).

1.8.1 Cadherinas

En humanos, la familia de proteínas de cadherinas contiene más de 100 miembros que pueden separarse en tres principales familias: cadherinas clásicas implicadas en la formación de las UAs, cadherinas desmosomales implicadas en la formación de desmosomas y protocadherinas que tienen un papel en el desarrollo. El dominio extracelular de las cadherinas clásicas está compuesto de cinco dominios tipo cadherina, cuya conformación es dependiente de la presencia de Ca^{2+} . Las propiedades adhesivas de las cadherinas clásicas se dan por interacciones trans- y agrupamiento lateral.

1.8.2 Cateninas

Las cadherinas están ligadas al cinturón de actina a través de las cateninas; β -catenina se une directamente a las cadherinas e interactúa con la proteína de unión a actina, α -catenina. Además, el tallo citosólico de cadherinas interactúa con la catenina p120, la cual participa en el remodelamiento de actina en las UAs.

1.8.3 Nectinas y proteínas tipo nectina (Nect)

Las nectinas son las responsables de las interacciones Ca^{2+} dependientes homofílicas y de las interacciones trans heterofílicas en las uniones célula-célula. La familia de las nectinas comprende cuatro miembros (nectina-1, -2, -3 y -4) mientras que la familia Nect1 tiene cinco miembros (Nect1, 2, 3, 4 y 5). Las nectinas tienen una función especializada en regular las adhesiones célula-célula, mientras que las proteínas Nect1 participan en algunas funciones celulares. Las nectinas interactúan con F-actina a través de afadina, mientras que las proteínas Nect1 no tienen interacciones con el citoesqueleto.

1.8.4 Afadina

La afadina se une a las nectinas a través de F-actina. Esta proteína contiene múltiples dominios de interacción proteica (PDZ). La afadina también interactúa con α -catenina, conectando las nectinas con las cadherinas (Mateo et al., 2015).

II. ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 Algunos virus y las proteínas del complejo de unión apical

La primera línea de defensa del cuerpo contra patógenos es la piel y las capas de células epiteliales que recubren las cavidades del organismo, razón por la cual no es sorpresa encontrar que muchas infecciones virales empiezan cuando algún virus interactúa con la piel o con el tracto respiratorio, genital o gastrointestinal. Mientras que algunos virus únicamente se limitan a estos epitelios (ej. rotavirus, influenza), otros virus atraviesan los epitelios y se propagan dentro del cuerpo a otros órganos (ej. polio, VIH) (Gonzalez-Mariscal, 2009).

Algunos virus utilizan a proteínas del CUA como receptores para entrada en su epitelio blanco o algunos virus alteran a estas proteínas como mecanismo de propagación viral (**Fig. 9, Tabla 2**), a pesar de que estas proteínas no estén totalmente accesibles. Algunos virus directamente contactan a sus receptores en las uniones, posiblemente tomando ventaja del epitelio comprometido. Otros virus, primero se adhieren a co-receptores expuestos sobre la superficie apical, la cual pueda transportar la partícula hacia el complejo de unión apical, en donde entra a través de su receptor. De manera similar, virus que ya están en el interior del organismo, se aproximan a la superficie basal del CUA (Mateo et al., 2015).

2.1.1 Virus y su interacción con las uniones estrechas

Las UEs son la barrera más apical del epitelio, es por eso que algunos patógenos las utilizan y en algunos casos las alteran para infectar a una célula huésped o como mecanismo de propagación de la infección en células.

Hepatitis C (HCV) inicialmente contacta a la célula huésped interactuando inicialmente con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-Rs). Los pasos iniciales de internalización requieren la unión a ocludina y CD81, mientras que claudina-1 está implicada en los pasos tardíos de la internalización. Claudina-6 y -9 también participan en la internalización, pero con menos eficiencia. Los Reovirus usa a la proteína de superficie viral $\sigma 1$ para interactuar específicamente con el dominio N-terminal de JAM-A e invadir las células huésped. Los

adenovirus usan proteínas de superficie para unirse a las proteínas CAR, alternan las interacciones CAR/CAR en las uniones estrechas y ganan acceso a las integrinas expuestas basolateralmente para su internalización. Similarmente, los coxsackievirus usan a las proteínas CAR como co-receptores durante la infección.

2.1.2 Virus y su interacción con las uniones adherentes

El virus de herpes simple (HSV) invade a las células por fusión con las membranas del huésped. Cuatro glicoproteínas son esenciales para este proceso. La glicoproteína D, la cual interactúa con nectina-1 y nectina-2, conduciendo a cambios conformacionales que son esenciales para fusión de membranas.

Poliovirus usa Necl5 para su entrada y propagación en el epitelio orofaríngeo y entérico. Se sabe que la gemación viral de la célula ocurre desde la superficie apical del epitelio intestinal, mientras que el virus se propaga en ausencia de citotoxicidad y mantiene a las UEs funcionales. Por otra parte, virus como el sarampión (MeV), entran a la célula a través de nectina-4.

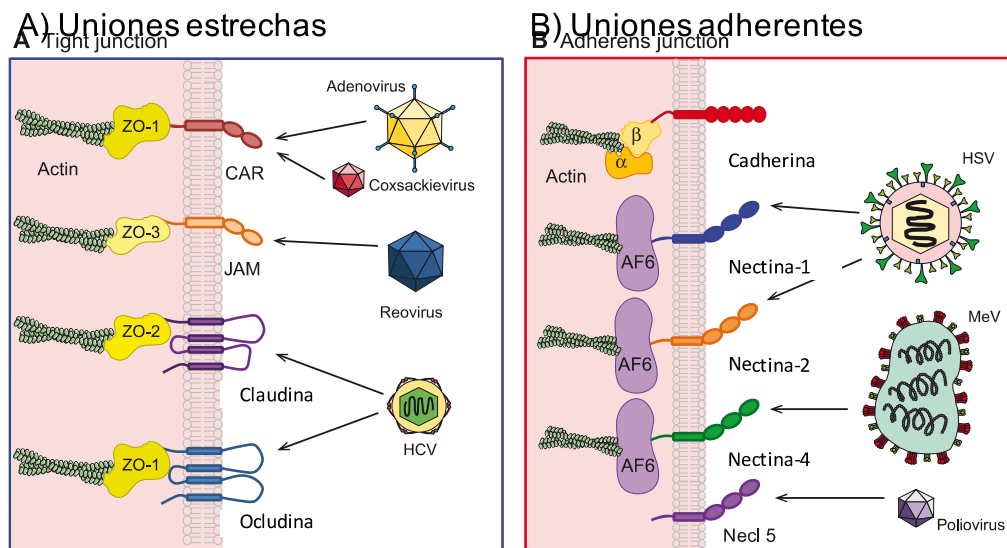


Figura 9. Los virus utilizan a proteínas del CUA como receptores. (A) Los virus interactúan con las UEs. Adenovirus y coxsackievirus interactúan con CAR, reovirus con JAM y hepatitis C con claudina y ocludina. **(B)** Algunos virus interactúan con proteínas de las UAs. HSV interactúa con nectina-1 y nectina-2. Poliovirus (MeV) interactúa con nectina-4, mientras que poliovirus con Necl5 (Mateo et al., 2015).

En el mismo sentido, algunos otros virus miembros de la familia *Flaviviridae*, como el virus del oeste del Nilo, el virus de la encefalitis japonesa y el HCV, usan proteínas del complejo de unión apical para atravesar o alterar el epitelio (**Tabla 2**).

Tabla 2. Interacción de algunos virus patogénicos con componentes del CUA (Zihni et al., 2014)(Colpitts and Baumert, 2016)

Virus	Componente del CUA	Función
Virus de la hepatitis C	Claudina-1, -6 y -9, ocludina	Entrada viral
Papilomavirus	MAGI1-3, PATJ, MUPP1, Par3	Formación de papiloma
Rotavirus	Citoesqueleto de actina Claudina-1 y -3	Alteración de uniones Acceso viral a receptores
Reovirus	JAM-A	Infección
Virus del dengue	ZO-1 Claudina-1	Entrada viral
Virus de la influenza A	MAGI1-3	Disociación de uniones
Coxsackivirus	CAR	Infección
Virus del Oeste del Nilo	Claudina-1, -2, -3 y -4	Diseminación viral en cerebro
Virus de la encefalitis japonesa	Claudina-1	Diseminación viral
Virus de la inmunodeficiencia humana	Claudina-7	Entrada viral
Rhinovirus humano	Claudina-1	Acceso viral a receptores
Virus sincial respiratorio	Claudina-1	Acceso viral a receptores

Norovirus

Claudina-4 y -5

Potencia la infección
viral/diseminación

En algunos virus, la entrada y salida viral desde las células, ocurre en un dominio específico de la célula polarizada. Por ejemplo, la entrada y salida de Chikungunya (CHIKV) (Lim and Chu, 2014), del virus del oeste del Nilo (WNV) (Chu and Ng, 2002), del virus de la hepatitis A (Blank et al., 2000) y el virus del simio 40 (Clayson and Compans, 1988), ocurre preferentemente en la superficie apical. En comparación, la entrada y salida del virus de la estomatitis vesicular (Fuller et al., 1984), ocurre preferencialmente por la superficie basolateral. Mientras que la entrada del virus Nipah es bipolar (Lamp et al., 2013). La infección polarizada de los virus puede proveer datos importantes acerca de la patogénesis del virus y los mecanismos implicados en la propagación viral.

III. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de las infecciones por DENV son asintomáticas, sin embargo, pueden manifestarse en sus formas más graves, en donde el incremento en la permeabilidad celular es el principal marcador.

Para que DENV pueda causar una infección sistémica, después de la picadura del mosquito, debe de atravesar múltiples capas de células polarizadas, como son células epiteliales y endoteliales. La resistencia al paso de macromoléculas y patógenos a través de estas células, está mediada en gran parte por las UEs. Existe evidencia que los efectos patogénicos de varios virus se deben a la pérdida de la función de barrera de estas uniones.

Estudios post-muerte en pacientes con dengue severo, han mostrado limitado daño capilar, lo que sugiere que la pérdida del funcionamiento de la barrera endotelial no se debe a la muerte de las células endoteliales, por lo que la disfunción podría ser ocasionada por alteraciones en las proteínas del complejo de unión intercelular.

Hasta ahora la mayoría de los estudios realizados de entrada de DENV han sido realizados en células no polarizadas y pudieran no reflejar las condiciones *in vivo*, por lo que sería interesante evaluar la entrada y salida de DENV en células polarizadas, lo que permitiría conocer en qué compartimento celular pudieran expresarse los receptores o co-receptores para DENV, ayudando a entender la patogénesis de la enfermedad, así como la implementación de estrategias preventivas.

IV. HIPÓTESIS

La infección por DENV en células epiteliales MDCK, altera la función de las uniones estrechas y adherentes como mecanismo de infección.

V. OBJETIVOS

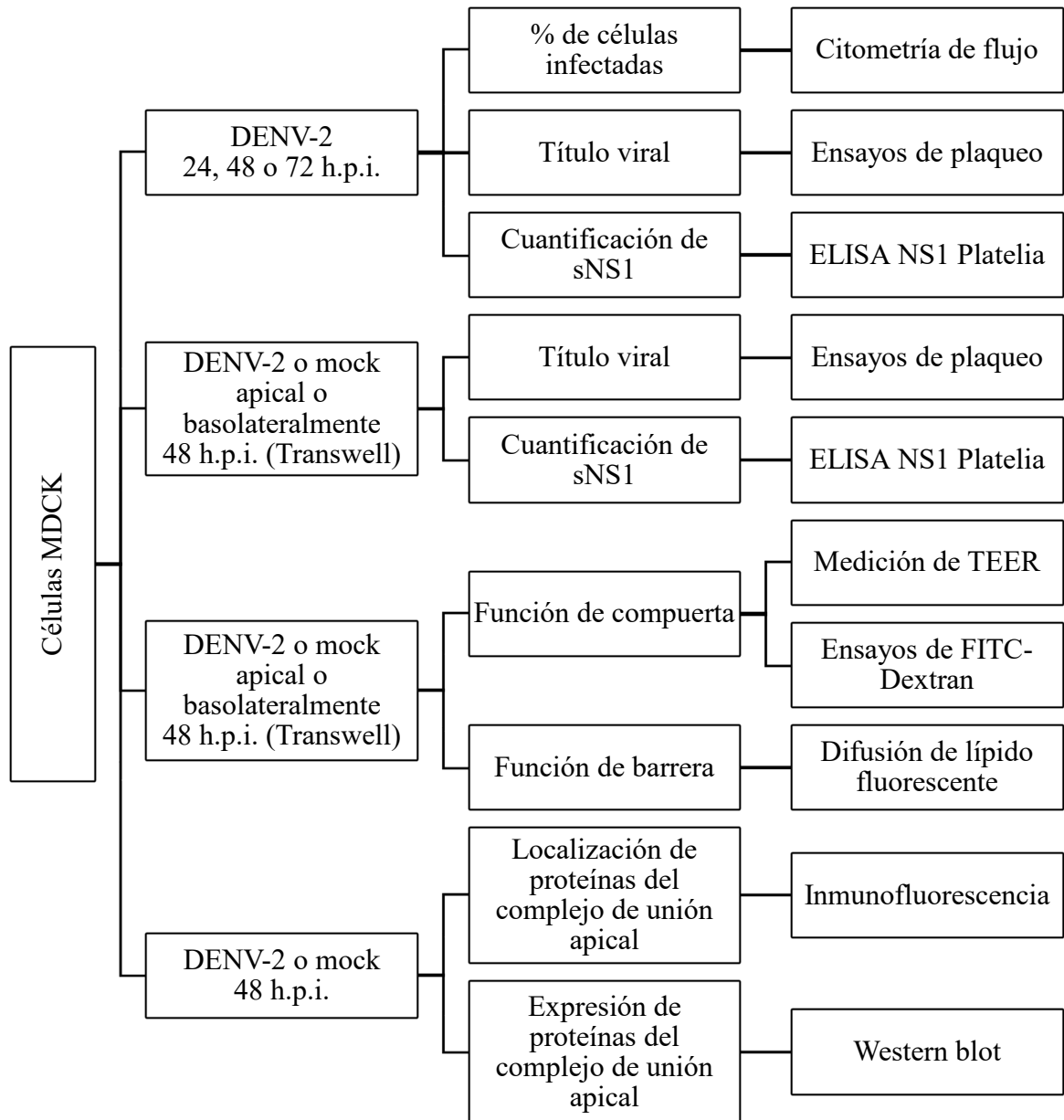
5.1 Objetivo general

Determinar la habilidad de DENV para infectar células epiteliales, así como evaluar su efecto sobre el complejo de unión apical.

5.2 Objetivos particulares

- Establecer un modelo epitelial para la infección por DENV e investigar si la entrada y salida de DENV es polarizada.
- Evaluar el efecto de la infección por DENV sobre la función e integridad de las uniones estrechas y adherentes.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos

Los siguientes anticuerpos primarios fueron utilizados: anti-Dengue virus 2H2; anti-Dengue virus proteína NS1 (catálogo no. GTX124252; GeneTex), anti-Dengue virus NS3 proteína (catálogo no. GTX124252; GeneTex), anti-claudina-1 (catálogo no. 71-7800; Invitrogen, Camarillo, CA), anti-claudina-2 (catálogo no. 32-5600; Invitrogen, Camarillo, CA), anti-E-cadherina (catálogo no. U3254; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), anti-occludina (catálogo no. 33-1500; Invitrogen, Camarillo, CA), anti-ZO-1 (catálogo no. 61-7300; Invitrogen, Camarillo, CA), anti-ZO-2 (catálogo no. 71-1400; Invitrogen, Camarillo, CA), anti- β -catenina (catálogo no. MA1-301 Invitrogen; Camarillo, CA) y anti-tubulina hecho en ratón (catálogo no. A11126; Invitrogen). Los siguientes anticuerpos secundarios fueron utilizados para ensayos de ensayos de inmunofluorescencia: anti-ratón IgG acoplado a Alexa Fluor 405 (catálogo no. 31553; Invitrogen), anti-rata IgG FITC (catalogue no. 11-4811-85; Invitrogen), anti-ratón IgG FITC (catálogo no. 200-002-037; Jackson ImmunoResearch Laboratories), anti-ratón IgG acoplado a Alexa Fluor 488 (catálogo no. A-21202; Life Technologies), anti-ratón IgG acoplado a Alexa Fluor 594 (catálogo no. A-21202; Life Technologies), and anti-conejo IgG acoplado a Alexa Fluor 594 (catálogo no. A-21442; Invitrogen). Para ensayos de Western blot (WB) los anticuerpos secundarios usados fueron: anti-ratón IgG (catálogo no. 62-6420; Invitrogen), anti-conejo IgG (catálogo no. A9169; Sigma-Aldrich) y anti-rata IgG (catálogo no. 81-9520; Invitrogen) acoplados a HRP.

Células

Las células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK; esta línea fue gentilmente donada por la Dra. Jazmín García Machorro, Escuela Superior de Medicina del IPN, Ciudad de México) fueron crecidas en una mezcla de nutrientes F-12 de medio Dulbecco modificado (DMEM/Ham's F-12) (catálogo no. DFP19; caisson LABS), suplementado con 10% de suero fetal bovino descomplementado (catálogo no. 10082147; Gibco) y antibióticos (100

U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina). Las células de riñón de hámster recién nacido (BHK-21) fueron crecidas en medio DMEM avanzado (catálogo no. 12491015; Gibco) suplementado con 10% de SFB, 2 g/l bicarbonato de sodio, 50 U/ml de penicilina and 50 µg/ml de estreptomicina. La línea celular Huh-7 derivada de hepatocitos diferenciados a partir de un carcinoma celular (donada gentilmente por el Dr. Rivas de la Universidad Autónoma de Nuevo León) fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 2 mM de glutamina, penicilina (5x10⁴ U/ml)-estreptomicina (50 µg/ml), 5% de suero fetal de ternera y 1 ml/l de amfotericina B (Fungizone). Las células MDCK, Huh-7 y BHK-21 fueron crecidas a 37°C en una atmósfera de humedad al 5% CO₂.

Propagación viral

Para producir el abasto viral, la cepa de referencia DENV-2 Nueva Guinea C (generosamente fue donada por el Dr. Juan Salas; Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN, Ciudad de México) fue propagada en cerebros de ratones neonatos de la cepa CD1 proporcionados por el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, unidad Zacatenco (Cinvestav-IPN). Para ello, el virus fue diluido en solución de Hank's (catálogo no. 14170112; Gibco) y con una jeringa de insulina, aproximadamente 10 µl de la dilución fueron inoculados en el cerebro de los ratones lactantes, previamente desinfectados con etanol al 70%. Posteriormente, se esperó que transcurrieran aproximadamente 4 días para que el virus se propagara y los ratones presentaran síntomas por la infección como temblor, parálisis o muerte. A continuación, se realizó la extracción del virus del cerebro de los ratones a 4°C con ayuda de una jeringa de 10 ml. El extracto fue sometido a un ciclo de congelación-descongelación a -70°C para ayudar a romper las células infectadas y liberar los virus intracelulares. Después, el tejido fue homogenizado en un homogenizador Dounce por aproximadamente 15 min, posteriormente, fue pasado por una jeringa entre 7 u 8 veces para ayudar al proceso de rompimiento celular. El extracto fue centrifugado por 20 min a 13000 rpm a 4°C en tubos eppendorf de 1.5 ml y los sobrenadantes se recuperaron en tubos nuevos. Los ciclos de centrifugación se repitieron hasta que los sobrenadantes se clarificaron. Finalmente, los sobrenadantes fueron guardados a -70°C en alícuotas de 100 µl hasta su uso.

Los cerebros de lactantes CD1 inoculados solamente con solución Hank's, fueron utilizados para condiciones mock. (Gould and Clegg, 1991).

Ensayos de plaqueo

Para estimar la cantidad de partículas virales capaces de infectar a una célula, se realizaron ensayos de plaqueo, utilizando células epiteliales BHK-21. Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pozos y se utilizaron a una confluencia entre 50-60%. Primero, se retiró el medio a las células y se realizaron entre 8-9 diluciones seriadas de los extractos de cerebro con un factor de 10 en solución de Hank's. Se adicionaron 200 µl de la dilución viral a cada pozo por duplicado. El último grupo de 2 pozos fue utilizado como control negativo, a esta serie sólo se le adicionó el diluyente del virus. Las placas se incubaron por 1 h a 37°C en un ambiente de humedad al 5% de CO₂ y pasado este tiempo, a cada pozo se le adicionó 1 ml de carboximetilcelulosa (Sigma) al 1.5%, y se incubaron a 37°C por 4-5 días, hasta la formación de placas líticas. Una vez transcurridos los días de formación de placas, se decantó el contenido de los pozos y cada pozo fue teñido con 300 µl de naftol azul-negro (Sigma) y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas sumergiéndolas en un recipiente con agua corriente y se dejaron secar al aire. Finalmente, se contaron las unidades formadoras de placas líticas (UPF) y se calculó el título viral utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{UPF/ml} = (P) (1000) / 200 = 10^X$$

Donde:

P: Promedio de las placas líticas obtenido en la dilución en la cual se realizó el conteo

1000: Factor de corrección para expresar el título en UPF/ml

200: Volumen de la dilución colocado a cada pozo

10^X: Factor de la dilución empleado donde se realizó el conteo de las placas líticas

Infección de células MDCK y Huh-7

Para determinar si las células MDCK o Huh-7 eran permisivas a la infección por DENV, éstas fueron cultivadas en cajas de cultivo de 12 pozos e infectadas con DENV a diferentes

multiplicidades de infección (MOI) a 24, 48 o 72 horas post-infección (h.p.i.). Después de 2 h, el inóculo viral fue retirado y se adicionó medio nuevo. Las células no infectadas fueron utilizadas como control negativo. Las células fueron observadas en un microscopio de campo claro, para observar cambios morfológicos post-infección.

Citometría de flujo

Las células MDCK o las células Huh-7 fueron cosechadas con tripsina por 3 min, resuspendidas y lavadas con una solución fría al 2% de SFB/PBS y centrifugadas por 10 min a 800 rpm a 4°C, después fueron fijadas con 1% de paraformaldehído (PFA; Merck, Darmstadt, Germany) /1X PBS frío por 20 min a 4°C. Después de la fijación, las células fueron permeabilizadas y bloqueadas con saponina al 0.1%, SFB 1% en 1X PBS por 20 min a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-Dengue virus 2H2 (dilución 1:50), seguido por la incubación por 2 h a temperatura ambiente con el anti-ratón IgG acoplado a Alexa Fluor 405 (1:200) como anticuerpo secundario. Después de cada paso, las células fueron lavadas una vez con 1X PBS-EDTA 5mM frío por centrifugación a 1200 rpm por 10 min. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 1X PBS-EDTA 5mM y fueron pasadas por un citómetro de flujo FACS BD LSR Fortessa™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Los resultados, expresados como intensidad de fluorescencia media, fueron analizados con el software FlowJo 8.8.6 (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA) software. Diez mil eventos fueron contados por muestra en tres ensayos independientes.

Medición de la proteína NS1 secretada

El kit comercial Platelia™ NS1 Ag (catálogo no. 72830; Bio-Rad) fue utilizado para detectar los niveles de la proteína viral soluble NS1 en sobrenadantes de células infectadas. El ensayo se realizó según las indicaciones del fabricante. A cada pozo se le adicionaron 50 µl del diluyente R7, 50 µl de las muestras o controles del ensayo, y fueron incubados de forma simultánea con 100 µl del conjugado (AcM/peroxidasa) durante 90 min a 37 °C. La presencia de la proteína NS1 en la muestra formó un complejo inmune AcM-NS1-cM/peroxidasa. Tras 6 lavados, el complejo inmune se reveló al adicionar 160 µl del cromógeno. A los 30 min de incubación a temperatura ambiente, la reacción enzimática fue detenida por la adición de 100 µl de la solución de paro y las muestras fueron leídas en un lector de placas de ELISA

(Multiskan EX, Lab systems) a 450 nm. La densidad óptica (D.O.) obtenida fue proporcional a la cantidad de la proteína NS1 presente en cada muestra.

Medición de la TEER en monocapas de MDCK

El grado de sellado de las uniones estrechas (UEs) fue evaluado midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) usando un medidor epitelial volt/ohm EVOM2 (World Precision Instruments, Inc), el cual cualitativamente midió la integridad de la monocapa y cuantitativamente midió la confluencia celular. Células MDCK fueron sembradas sobre membranas de insertos Transwell de 0.33 cm² (PET) (tamaño de poro 3.0µm; catálogo no. 3472; Corning) y una vez que la TEER estuvo entre 700 y 1000 ohm/cm², en este momento las células fueron infectadas con DENV, apical o basolateralmente a una MOI de 10. Después de 2 h de la adsorción viral, el inóculo viral fue removido con tres lavados con medio Hank's y medio fresco fue adicionado a las dos cámaras de los insertos. La TEER fue evaluada a diferentes tiempos post-infección y la medición de cada Transwell fue normalizada a su valor inicial antes del tratamiento.

Infección polarizada de DENV

Las células MDCK sembradas sobre insertos Transwell, fueron infectadas con DENV por la cara apical, así como por la cara basolateral, respectivamente, a una MOI de 10. A las 48 h.p.i., los sobrenadantes de ambas caras fueron recolectados independientemente, y fueron sometidos a ensayos de plaqueo para cuantificación viral y para la detección semi-cuantitativa de la proteína NS1. Para investigar la posible entrada y la salida polarizada de DENV, el virus total de la infección post-apical fue comparado con el virus total de la infección post-basolateral. Los niveles de la proteína secretada NS1 fueron comparados en ambas infecciones.

Ensayo de flujo paracelular

El flujo paracelular fue evaluado usando trazadores de peso molecular conocido (FITC-Dextran de 70 kDa; catálogo no. FD-70S; Sigma-Aldrich), como fue previamente descrito (Cerejido et al., 2002). La solución con el trazador fue aplicada a la cara apical de las células

MDCK confluentes, crecidas sobre filtros Transwell e infectadas con DENV o tratadas con mock. Las células fueron incubadas a 37°C y una alícuota de 50 µl fue recolectada de la cámara basal a diferentes tiempos post-infección. Células tratadas con EDTA 5mM, fueron usadas como control positivo de desensamble de UEs. El trazador de 70 kDa de FITC-Dextran fue medido en un fluorómetro (BioRad plate Reader, excitación 492 nm; emisión 520 nm).

Ensayo de difusión de lípidos de membrana

Este ensayo fue realizado como fue descrito previamente (Cereijido et al., 2002; Contreras et al., 2002). Células MDCK crecidas sobre insertos Transwell infectadas con DENV o tratadas con mock, fueron marcadas en la cara apical por 10 min con una solución 5 nmol/ml del complejo Bodipy FL-C12-Sphingomyelin/BSA (catálogo no. D7711; Invitrogen, Molecular Probes). Después, fueron lavadas tres veces con buffer P frío (NaCl 145 mM, HEPES pH 7.4 10 mM, Na-piruvato 1.0 mM, glucosa 10 mM y CaCl₂ 3.0 mM) y se incubaron en hielo por 30 min. Las membranas fueron inmediatamente observadas en el plano xy en un microscopio confocal (Leica sp8 LSC Lite). Imágenes representativas fueron seleccionadas para cada tiempo.

Ensayos de inmunofluorescencia

Células MDCK crecidas sobre laminillas en placas de cultivo de 24 pozos, fueron infectadas con DENV o tratadas con mock. Después de 48 h, las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con PFA al 4% por 20 min a 4°C. Después, las células fueron lavadas tres veces con PBS y permeabilizadas con PBS-Tritón X-100 (0.5%) por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las monocapas fueron lavadas con PBS 1X, bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS-Tritón X-100 (0.25%) por 1 h, e incubadas toda la noche a 4°C con anti-Dengue virus 2H2 (1:50), anti-Dengue NS1 (1:100), anti-Dengue NS3 (1:100), anti-Claudina-1 (1:100), anti-E-cadherina (1:100), anti-Ocludina (1:100), anti-ZO-1 (1:100), anti-ZO-2 (1:100) o anti-humana β-catenina (1:100) como anticuerpos primarios. Después, las laminillas fueron lavadas tres veces con PBS 1X e incubadas por 2 h a temperatura ambiente con un anti-rata IgG-FITC (1:500), anti-ratón IgG-FITC (1:100),

anti-ratón IgG acoplado a Alexa Fluor 488 (1:200), anti-ratón IgG acoplado a Alexa Fluor 594 (1:500) o con un anti-conejo IgG acoplado a Alexa Fluor 596 (1:400) como anticuerpos secundarios. Las laminillas fueron montadas usando medio de montaje Vectashield (catálogo no. H-1000; Vector Laboratories) y observadas con un microscopio confocal Leica sp8 LSC Lite. Las imágenes fueron procesadas usando el software Leica.

SDS-PAGE y Western blot

Las monocapas celulares, infectadas o tratadas con mock, fueron lavadas dos veces con PBS frío y lisadas en frío con un buffer de lisis (150 mM de cloruro de sodio; 1% Tritón-X; 50 mM Tris, pH 8.0) (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Los lisados celulares fueron mantenidos en agitación constante por 30 min a 4°C y después, fueron centrifugados a 12,000 rpm por 20 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron colectados y las pastillas desechadas. La concentración de proteína fue determinada mediante el ensayo de BCA (catálogo no. 23225; PierceTM BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Treinta microgramos de lisado total diluidos en buffer Laemmli 2X (4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris HCl) fueron calentados a 95°C por 5 min, sujetos a SDS-PAGE y transferidos en condiciones húmedas (buffer: Tris-glicina 1X, 0.1% SDS, 20% metanol) a una membrana de nitrocelulosa (catálogo no. 1620115; Bio-Rad). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en TBST (Tris HCl, NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) por 1 h a temperatura ambiente en agitación e incubadas toda la noche a 4°C en agitación con un anti-Dengue virus NS1 (1:5000), anti-Dengue virus NS3 (1:1000), anti-Claudina-1 (1:1000), anti-E-cadherina (1:3000), anti-Ocludina (1:1000), anti-ZO-1 (1:1000), anti-ZO-2 (1:1000), anti- β -catenin (1:3000) o anti-tubulina ratón (1:1000) como anticuerpos primarios. Como anticuerpos secundarios fueron utilizados un anti-ratón IgG (1:10000), anti-conejo IgG (1:8000) y un anti-rata IgG (1:5000) acoplados a HRP. Todos los anticuerpos fueron diluidos en TBST. Después de cada incubación, las membranas fueron lavadas tres veces con TBST por 10 min. Las bandas fueron reveladas por quimioluminiscencia usando el kit SuperSignalTM West Femto (catálogo no. 34095; Thermo Scientific) y el escáner para Western blot de quimioluminiscencia LI-COR C-DiGit (LI-COR[®] Biosciences).

Ensayos de viabilidad celular

Células MDCK o células Huh-7 fueron sembradas y crecidas en una placa de cultivo de 96 pozos y fueron infectadas con DENV a diferentes MOI o incubadas en condiciones mock por 24, 48 y 72 h. La viabilidad celular fue determinada usando un método colorimétrico basado en un compuesto de metrozol (MTS) para células adherentes (Cell-Titter 96[®] AQueous One solution cell proliferation, catálogo no. G3582; Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La señal colorimétrica, fue normalizada a las células con condiciones mock y los porcentajes de viabilidad celular fueron determinados.

Análisis estadístico

Todos los datos representan la media con error estándar de tres experimentos independientes por duplicado y fueron analizados por dos pruebas de t-Student, usando el programa *GraphPad Prism* versión 5.0 (San Diego, CA, USA) para el análisis estadístico.

VIII. RESULTADOS

La infección por DENV no provoca citotoxicidad en células MDCK

Previamente a nuestros experimentos de infección con DENV, evaluamos las posibles alteraciones de las funciones celulares básicas inducidas por la infección por DENV en células MDCK. Para lo cual evaluamos la viabilidad celular de células infectas con DENV a una MOI de 1, 5 y 10 y a diferentes horas post-infección, 24, 48 y 72. En este ensayo observamos la formación de un compuesto coloreado, formado por una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células vivas. Como podemos observar en la **Fig. 10**, los resultados expresados como porcentaje de células vivas muestran que en ninguna de las condiciones, la viabilidad celular fue afectada por la infección por DENV.

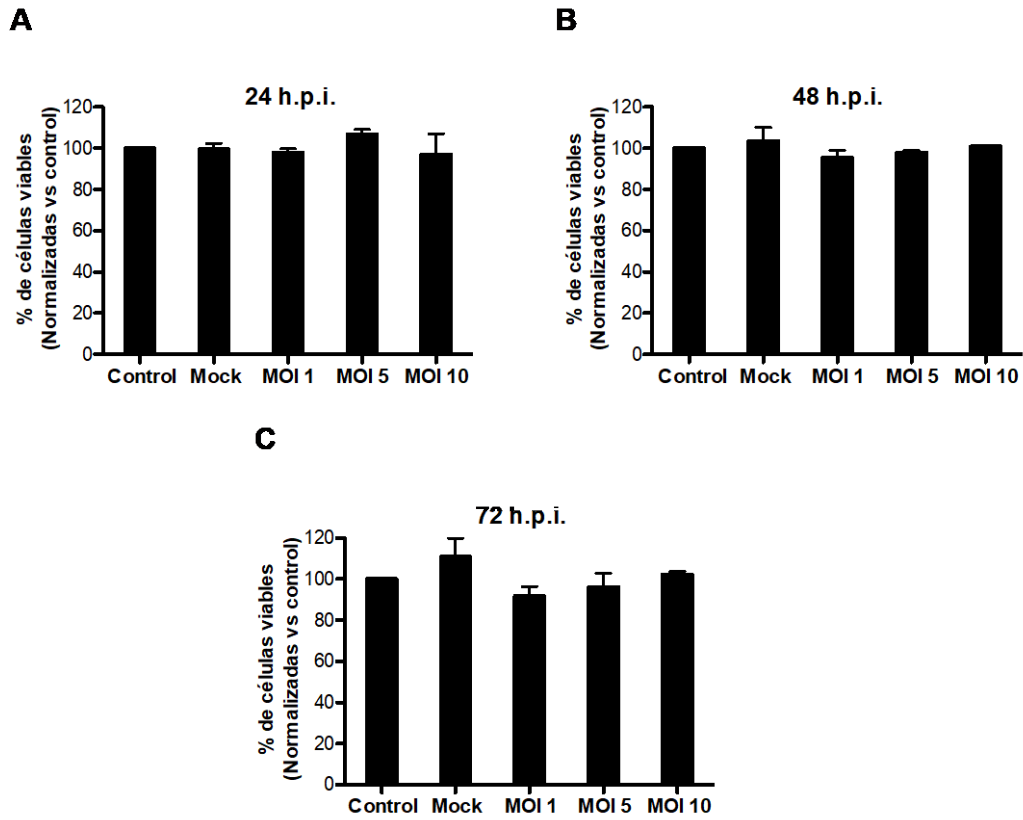


Figura 10. Viabilidad celular de células MDCK infectadas con DENV. A las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas post-infección (C), la viabilidad celular fue evaluada en células MDCK no infectadas o infectadas con DENV a diferentes multiplicidades de infección mediante la técnica de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje tomando al control no infectado como 100%. Las \pm SD se muestran en cada barra.

Las células MDCK son permisivas a la infección por DENV

Para determinar la susceptibilidad de las células MDCK a la infección por DENV, así como el apropiado tiempo de infección y MOI, células epiteliales fueron infectadas a una MOI de 1, 5 o 10 a diferentes tiempos y analizadas por citometría de flujo usando el anticuerpo 2H2. Los resultados mostraron que sólo un porcentaje entre el 0.7% y el 8% de las células fueron infectadas, siendo el mayor porcentaje (8.06%) a las 72 h.p.i. y a una MOI de 10. Como control negativo, utilizamos células tratadas con mock, en las cuales a ningún tiempo post-infección ni MOI, se observó infección (Fig. 11A, B). Estos resultados nos permitieron saber que las células MDCK son poco susceptibles a la infección por DENV, por lo que seleccionamos una MOI de 10 los para experimentos subsecuentes.

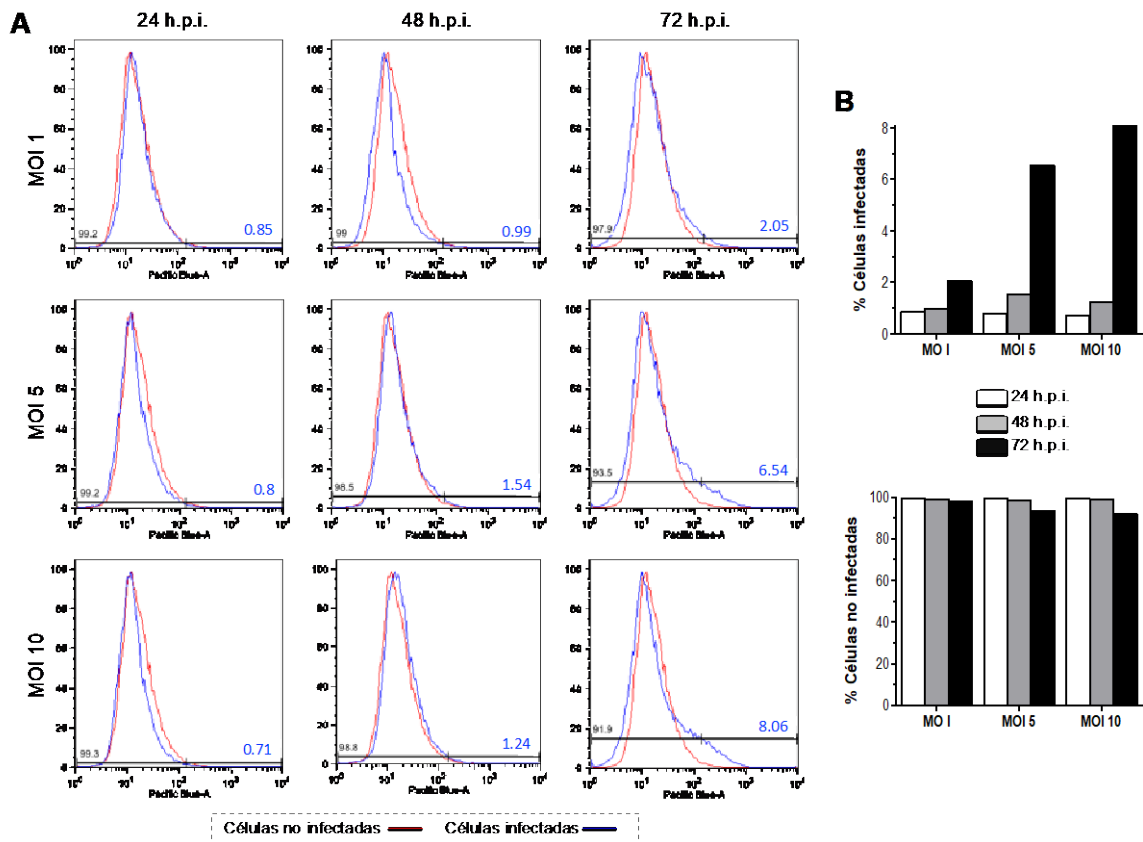


Figura 11. DENV infecta a las células MDCK. (A) Células epiteliales fueron infectadas a una MOI de 1,5 y 10 por 24, 48 y 72 h. La cantidad de células infectadas fue evaluada por citometría de flujo usando el anticuerpo 2H2 y el cabra anti-ratón IgG-acoplado a Alexa Fluor 405 como anticuerpo secundario. (B) Gráficas de barras correspondientes al porcentaje de células infectadas y no infectadas, respectivamente.

DENV establece una infección productiva en células MDCK

A pesar de la baja susceptibilidad de las células MDCK a la infección por DENV, el virus se replicó eficientemente en estas células y de produjo partículas virales infectivas. Un aumento gradual en el título viral fue observado a diferentes tiempos post-infección, con un título máximo observado a las 72 h.p.i. (Fig. 12A). De forma similar, un aumento en los niveles de la proteína soluble NS1 en sobrenadantes de células infectadas a diferentes tiempos post-infección fue detectado (Fig. 12B). Por otra parte, células MDCK infectadas presentaron un extenso efecto citopático (ECP) a partir de las 24 h.p.i, mientras que en las células tratadas con mock y en las células control, las cuales únicamente contienen medio de cultivo, en todos los tiempos pudimos observar la morfología normal de las células MDCK (Fig. 12C). Debido a que sólo un pequeño porcentaje de células son infectadas por DENV,

estos resultados podrían sugerir que no sólo el virus es necesario para producir daño en las células epiteliales MDCK, sino que probablemente algunos factores solubles producidos durante la infección como citocinas, quimiocinas, la proteína soluble NS1, etc., pudieran estar participando también en este daño morfológico. Para nuestros siguientes ensayos, seleccionamos 48 h.p.i. como un tiempo apropiado, debido a que observamos gran ECP a las 72 h.p.i., lo cual podría afectar la integridad de la monocapa celular e interferir en nuestros subsecuentes estudios de infección.

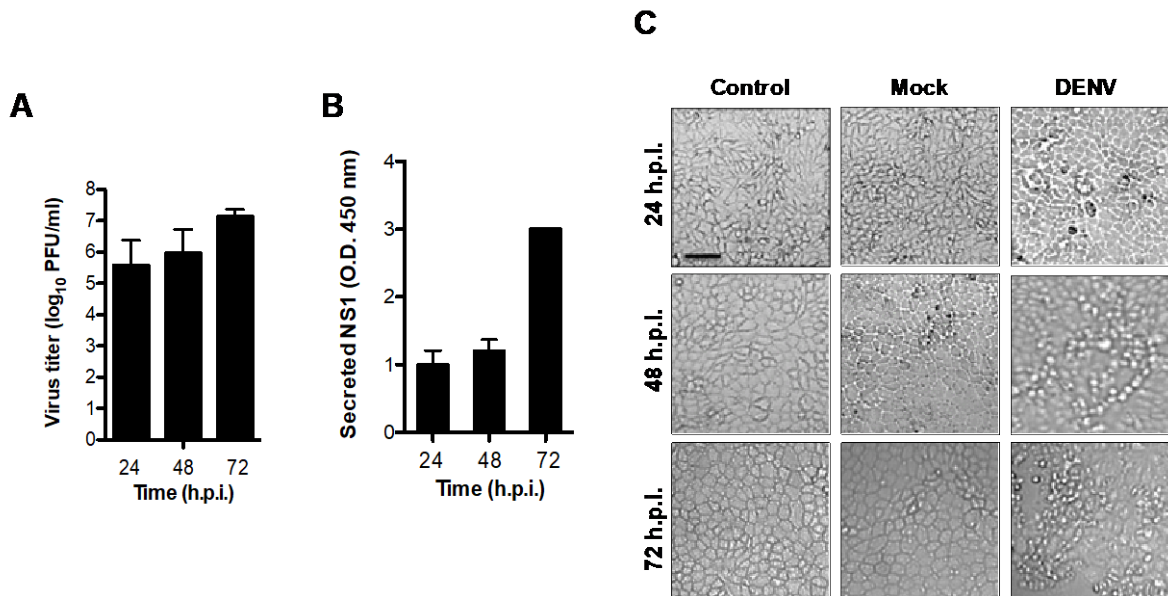


Figura 12. DENV establece una infección productiva en células MDCK. (A, B) El rendimiento viral y la proteína NS1 secretada desde los sobrenadantes de células MDCK infectadas a una MOI de 10 a 24, 48 y 72 h.p.i. fue determinada a través de ensayos de plaqueo y con el empleo del kit Platelia Dengue NS1 Ag (BioRad) respectivamente (C) El ECP de la infección por DENV de MDCK a una MOI de 10 fue analizada por microscopía de contraste (10X).

Las células Huh-7 son permisivas a la infección por DENV

Adicionalmente, evaluamos la infectividad de nuestro stock viral en otra línea celular. Para ello empleamos células Huh-7, las cuales han sido ampliamente estudiadas en ensayos de infección por DENV.

Primero infectamos con DENV a las células Huh-7 a diferentes MOI y a diferentes tiempos post-infección y evaluamos el porcentaje de células viables infectas, las cuales no presentaron afectaciones en su viabilidad (**Fig. 13**).

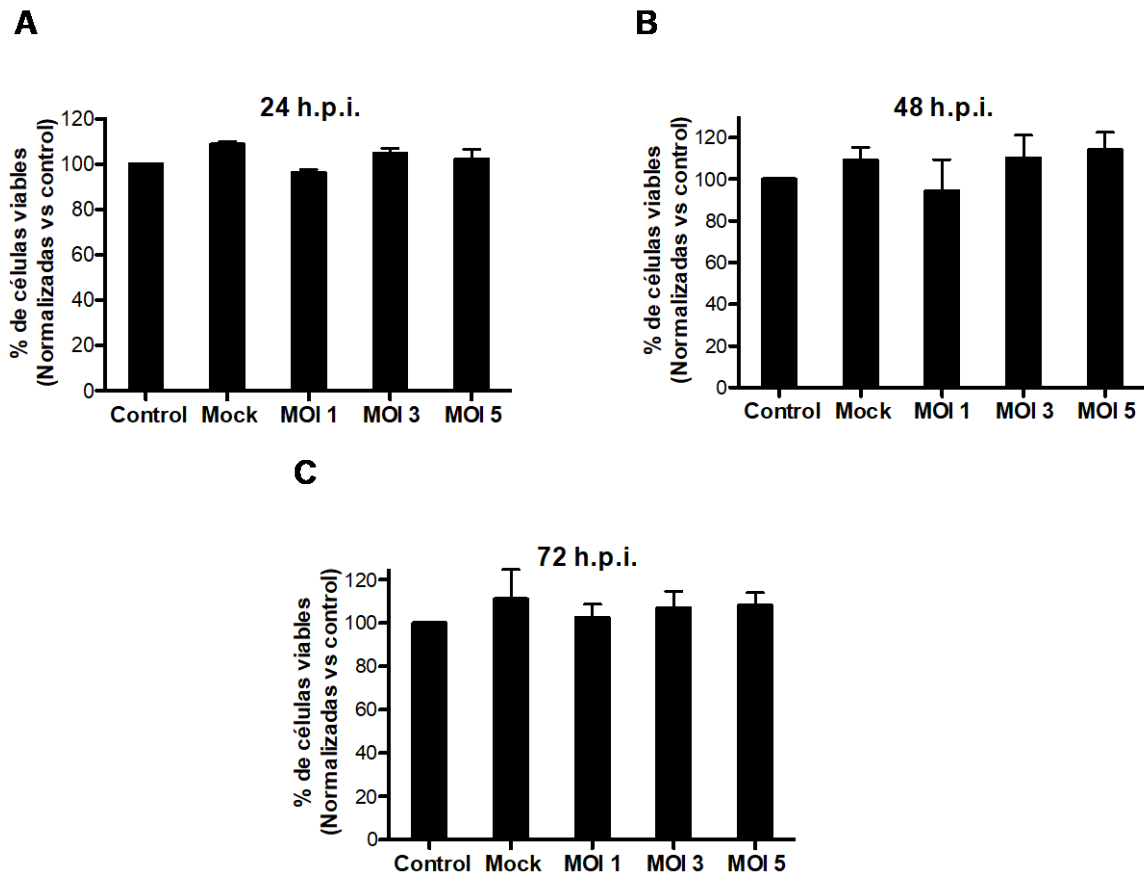


Figura 13. Viabilidad celular de células Huh-7 infectadas con DENV. A las 24, 48 y 72 h.p.i., la viabilidad celular fue evaluada en células Huh-7 no infectadas o infectadas con DENV a diferentes MOI usando el ensayo de proliferación celular Cell-Titter 96[®] AQueous One (Promega). Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular tomando al control como el 100%. La SD se muestran en cada barra.

Posteriormente, evaluamos el porcentaje de células Huh-7 infectadas con DENV a diferentes MOI y a diferentes tiempos post-infección a través de citometría de flujo. Observamos que cerca del 50% de las células Huh-7 fueron infectadas a los diferentes tiempos y diferentes concentraciones de virus (**Fig. 14A, B**). En estas células también se observó un marcado ECP a tiempos largos y mayor MOI, en comparación con las células control y las células en

condiciones mock (**Fig. 15**). Evaluando la infectividad de las células Huh-7 con DENV, pudimos descartar problemas con nuestro stock viral.

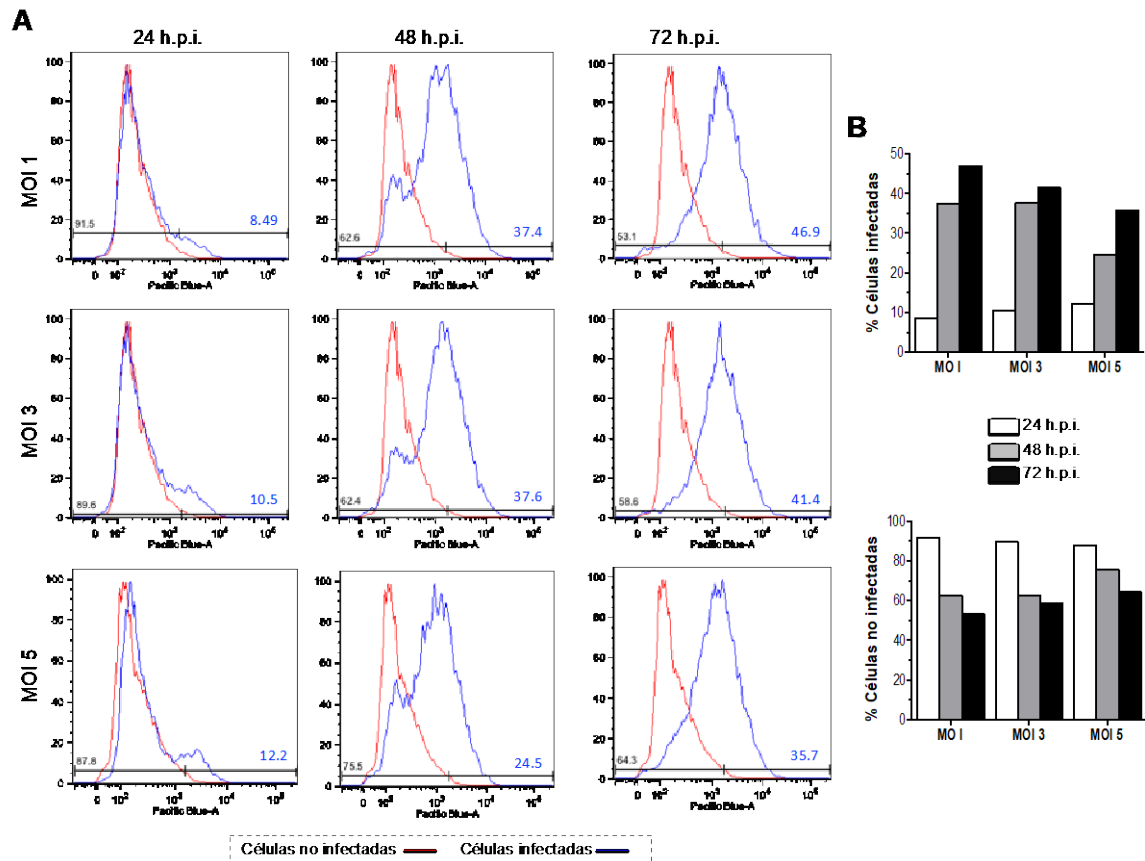


Figura 14. Infección por DENV en células Huh-7. Células Huh-7 fueron infectadas a una MOI de 1, 3 y 5 por 24, 48 y 72 h. La cantidad de células infectadas fue evaluada por citometría de flujo usando el anticuerpo 2H2 y el cabra anti-ratón acoplado a Alexa Fluor 405 como anticuerpo secundario. **(B)** Gráficas de barras correspondientes al porcentaje de células infectadas y no infectadas con DENV, respectivamente.

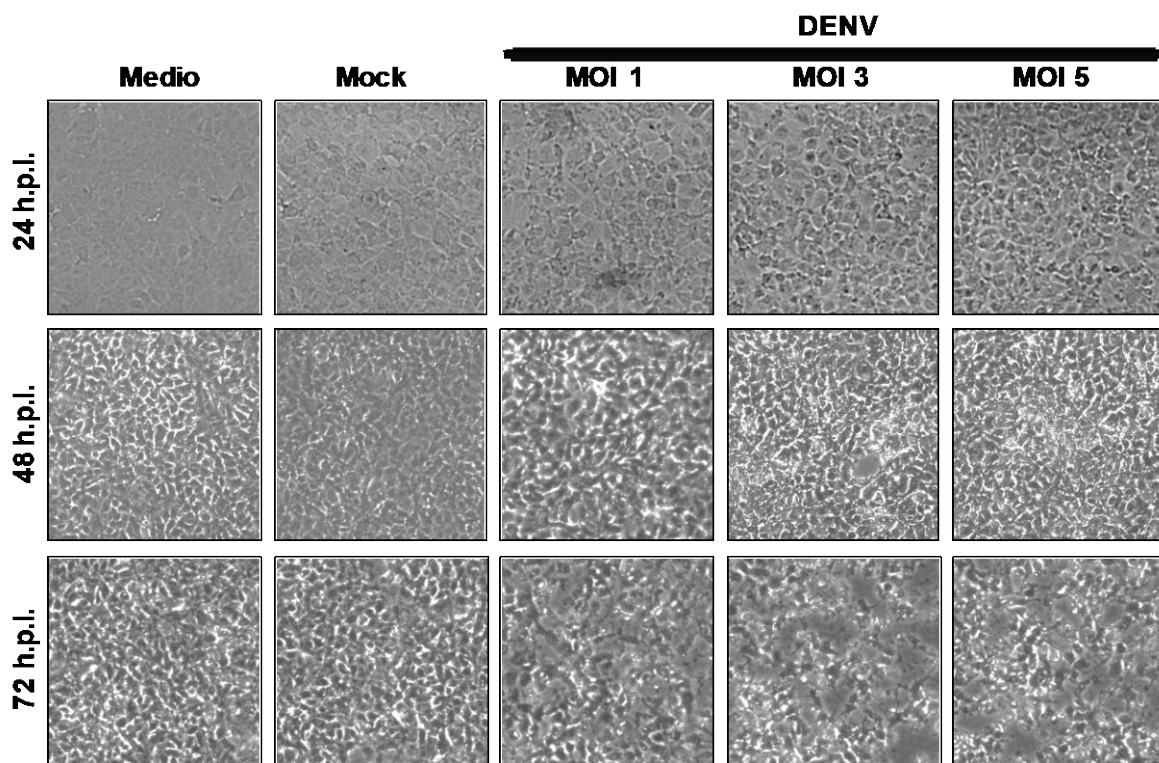


Figura 15. ECP de células Huh-7 infectadas con DENV. Células Huh-7 infectadas con DENV a una MOI de 1, 3 y 5 por 24, 48 y 72 h fueron analizadas por microscopía de contraste (10X).

DENV infecta tanto la membrana apical como la basolateral de las células MDCK, pero la infección tardía conduce a la secreción preferencial de la proteína viral NS1 hacia la superficie apical

Para determinar si las células MDCK eran preferentemente infectadas por DENV por un dominio polarizado específico, las células epiteliales fueron sembradas en insertos Transwell e infectadas con DENV por la superficie apical o por la superficie basolateral. Subsecuentemente, a las 48 h.p.i., los sobrenadantes fueron recolectados desde la cámara apical y basolateral. Los datos mostraron títulos virales similares en ambos dominios epiteliales después de la infección apical y basolateral (**Fig. 16A**), sugiriendo que la entrada y salida de DENV ocurre por ambas superficies. Aunque, la secreción de la proteína NS1

fue más eficiente por la superficie apical que por la basolateral, indicando que en esta condición la secreción es polarizada (**Fig. 16B**).

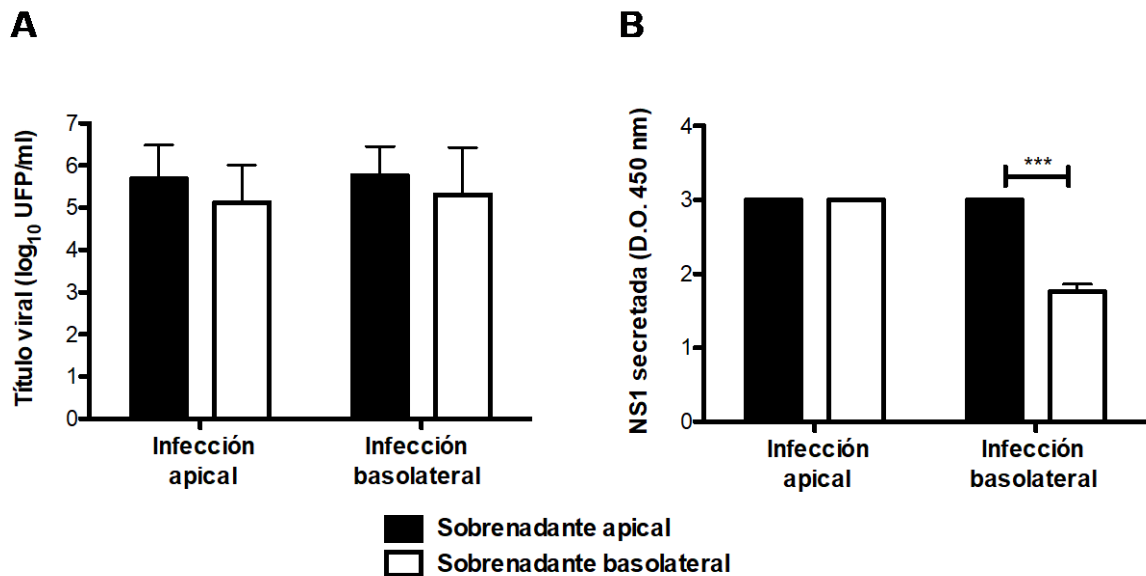


Figura 16. DENV entra a las células MDCK en una manera no polarizada. Células epiteliales fueron infectadas con DENV por la superficie apical o basolateral a una MOI de 10 por 48 h. Los sobrenadantes de la superficie apical y basolateral fueron colectados y el rendimiento viral (**A**) y la secreción de NS1 (**B**) fueron evaluados por ensayos de plaqueo y por ensayos de ELISA respectivamente. El rendimiento viral fue expresado como mean±SEM de base logarítmica 10 de PFU/ml, la secreción de NS1 fue expresada como el promedio de la absorbancia de tres experimentos independientes. ***= $p<0.05$.

DENV induce una respuesta en la TEER bifásica acompañada de un incremento en la permeabilidad celular

Subsecuentemente, evaluamos la función de compuerta de las UEs estudiando el efecto de la infección de DENV sobre la TEER y sobre la permeabilidad paracelular. Monocapas de células MDCK infectadas apical o basolateralmente con DENV o tratadas con mock, mostraron una disminución inicial en la TEER (después de 2 h de adsorción viral), lo cual pudiera estar relacionado con el reemplazo con medio fresco con o sin virus. Después, las células epiteliales gradualmente incrementaron la TEER. Sorpresivamente, las células infectadas con DENV desarrollaron un pico de TEER mayor que las monocapas tratadas con mock, pero a las 48-72 h.p.i., la TEER disminuyó en las células infectadas con DENV, mientras que en las monocapas de las células tratadas con mock, la TEER se mantuvo estable

(**Fig. 17A y B**). El comportamiento bifásico de la TEER fue más pronunciado en la infección con DENV apical que en la basolateral. Células incubadas con EDTA para alterar las uniones intercelulares, presentaron una marcada disminución en la TEER desde el inicio del tratamiento.

Posteriormente, examinamos si la infección con DENV apical o basolateral podía afectar el paso del trazador no iónico de FICT-Dextran de 70 KDa desde el compartimento apical hacia el basolateral en monocapas de MDCK cultivadas en insertos Transwell. Observamos un modesto pero significativo flujo paracelular del trazador en células infectadas con DENV. Las células infectadas por la cara apical mostraron valores de flujo de aproximadamente el 10% los cuales fueron obtenidos desde la cuarta hora post infección, mientras que en células infectadas por la cara basolateral, el flujo paracelular se desarrolló suavemente, mostrando valores similares a los de las células infectadas apicalmente, hasta las 72 h.p.i. (**Fig. 17C y D**). Estos datos son significativamente más bajos que aquéllos obtenidos en células en las cuales las UEs fueron abiertas por el tratamiento con EDTA.

En conjunto nuestros resultados sugieren que la infección con DENV no abre las UEs como el EDTA, pero provoca UEs más débiles. Este efecto dañino de DENV sobre la función de compuerta de las UEs es más pronunciado cuando la infección ocurrió sobre la superficie apical que por la basolateral.

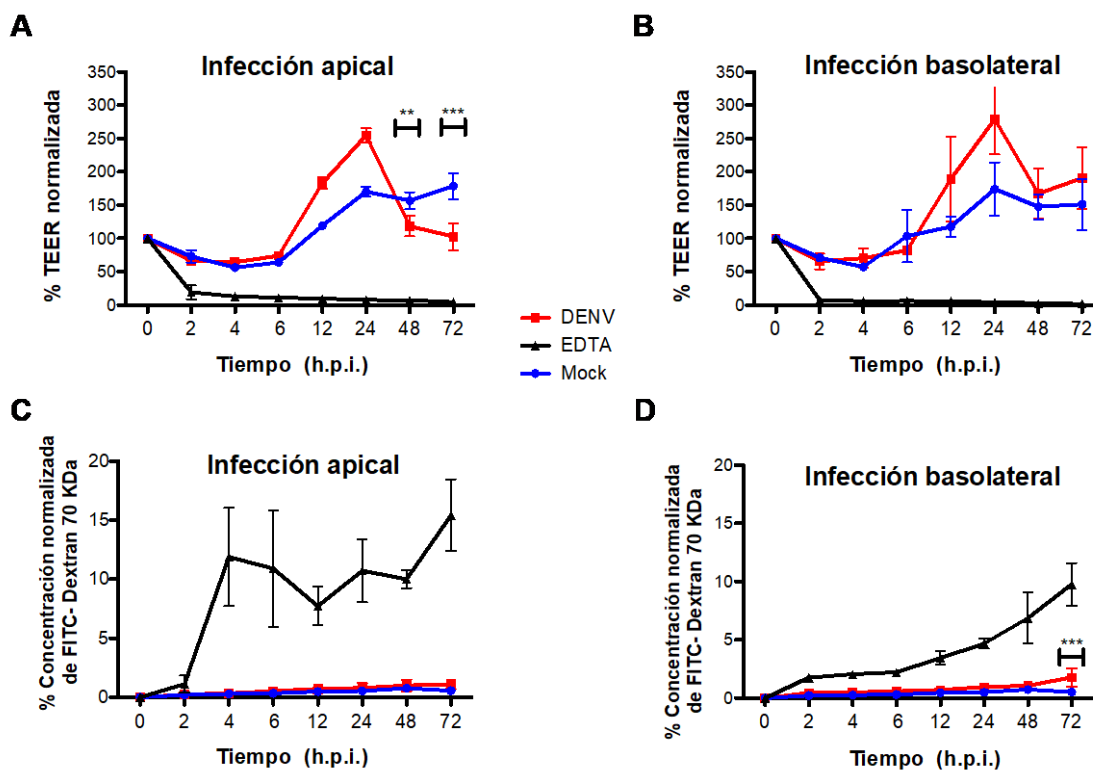


Figura 17. DENV altera la TEER en células MDCK infectadas apicalmente. Células crecidas en Transwells fueron no infectadas, incubadas en condiciones mock o infectadas por la superficie apical o basolateral con DENV a una MOI de 10 o tratadas con EDTA por 72 h. La TEER fue medida durante 72 h.p.i. Los datos fueron normalizados con respecto a los valores iniciales (A, B). Células MDCK sembradas y tratadas como anteriormente se mencionó, fueron incubadas con 70 kDa FITC-Dextran soluble y la cantidad del paso del trazador desde la superficie apical a la basolateral en células infectadas apical o basolateralmente fue medida como se describió en materiales y métodos (C, D). Todos los datos son representativos de tres experimentos realizados independientemente y representan el promedio \pm SD.

DENV altera la función de barrera

También evaluamos si DENV podría modificar la función de barrera de las UEs. Para lo cual analizamos la distribución de un lípido fluorescente (Bodipy®FL- C12-sphingomyelin/BSA) en células infectadas, tratadas con mock o tratadas con EDTA. Como se describió anteriormente, el EDTA abre las UEs y genera despolarización celular. En las secciones *xz* de microscopía confocal, en las células tratadas con mock, el lípido fue confinado al dominio apical, en donde fue adicionado, y ninguna tinción lateral fue detectada (Fig. 18). Sin embargo, en las células infectadas con DENV, el lípido se difundió libremente

desde la superficie apical hacia las membranas laterales (**Fig. 18**). Este efecto fue más dramático en el control positivo de células incubadas con EDTA (**Fig. 18**). Estos hallazgos sugieren que la infección por DENV también altera la función de barrera de las UEs.

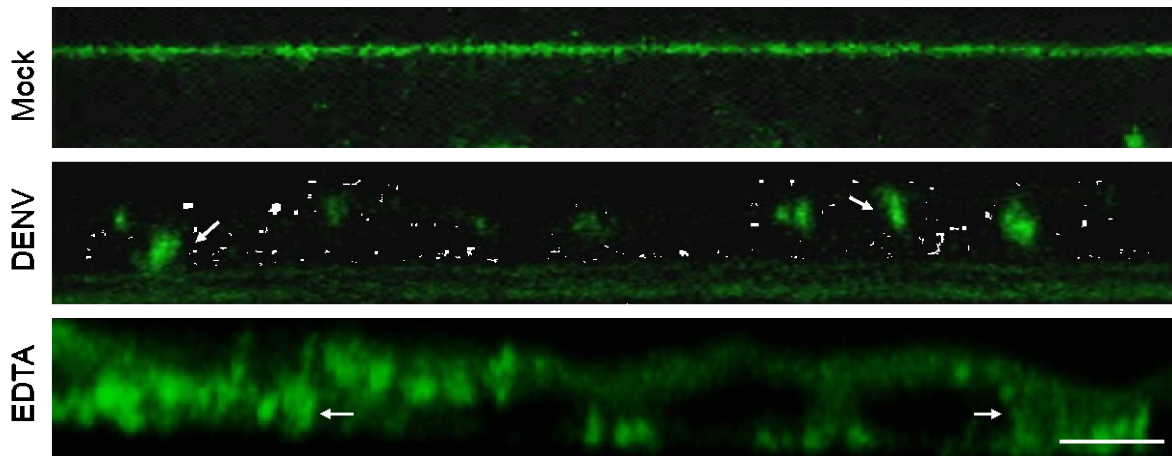


Figura 18. DENV altera la función de barrera de las uniones estrechas. Células epiteliales crecidas sobre cubreobjetos fueron no infectadas (mock) o infectadas con DENV a una MOI de 10 o tratadas con EDTA por 48 h. Las células fueron teñidas sobre la superficie apical con el complejo Bodipy®FL-C12-sphingomyelin/BSA. Las preparaciones fueron analizadas por microscopía confocal a través de cortes en *xz*.

La infección por DENV afecta la localización subcelular de las proteínas claudina-1, ZO-1 y ZO-2

Nuestros resultados indican que la función de las UEs fue alterada por la infección con DENV. Así, el siguiente paso fue explorar el efecto de la infección por DENV en la integridad y localización de las proteínas de las UEs y de las UAs, debido a que se requiere de estas últimas para el establecimiento y mantenimiento adecuado de las UEs. otros componentes del CUA en las UAs. Para este propósito, realizamos ensayos de inmunofluorescencia en células tratadas con mock y en células infectadas con DENV a las 48 h.p.i. Específicamente, la distribución de cuatro proteínas de las UEs (occludina, claudina-1, ZO-1 y ZO-2), así como una proteína de las UAs (E-cadherina) fue evaluada en cortes en *xy* y *xz* en un microscopio confocal. Como podemos observar en los cortes en *xy* de células mock, las proteínas del CUA están localizadas en los bordes celulares, formando el patrón típico de malla de gallinero, mientras que los cortes en *xz* muestran la típica tinción punteada

(Fig. 19). La infección por DENV indujo la desaparición de ocludina desde los bordes celulares, así como la acumulación citoplásmica de claudina-1 y E-cadherina, e inesperadamente concentró ZO-2 en los bordes celulares (Fig. 19). La infección de células MDCK por DENV fue confirmada usando diferentes anticuerpos contra las proteínas virales.

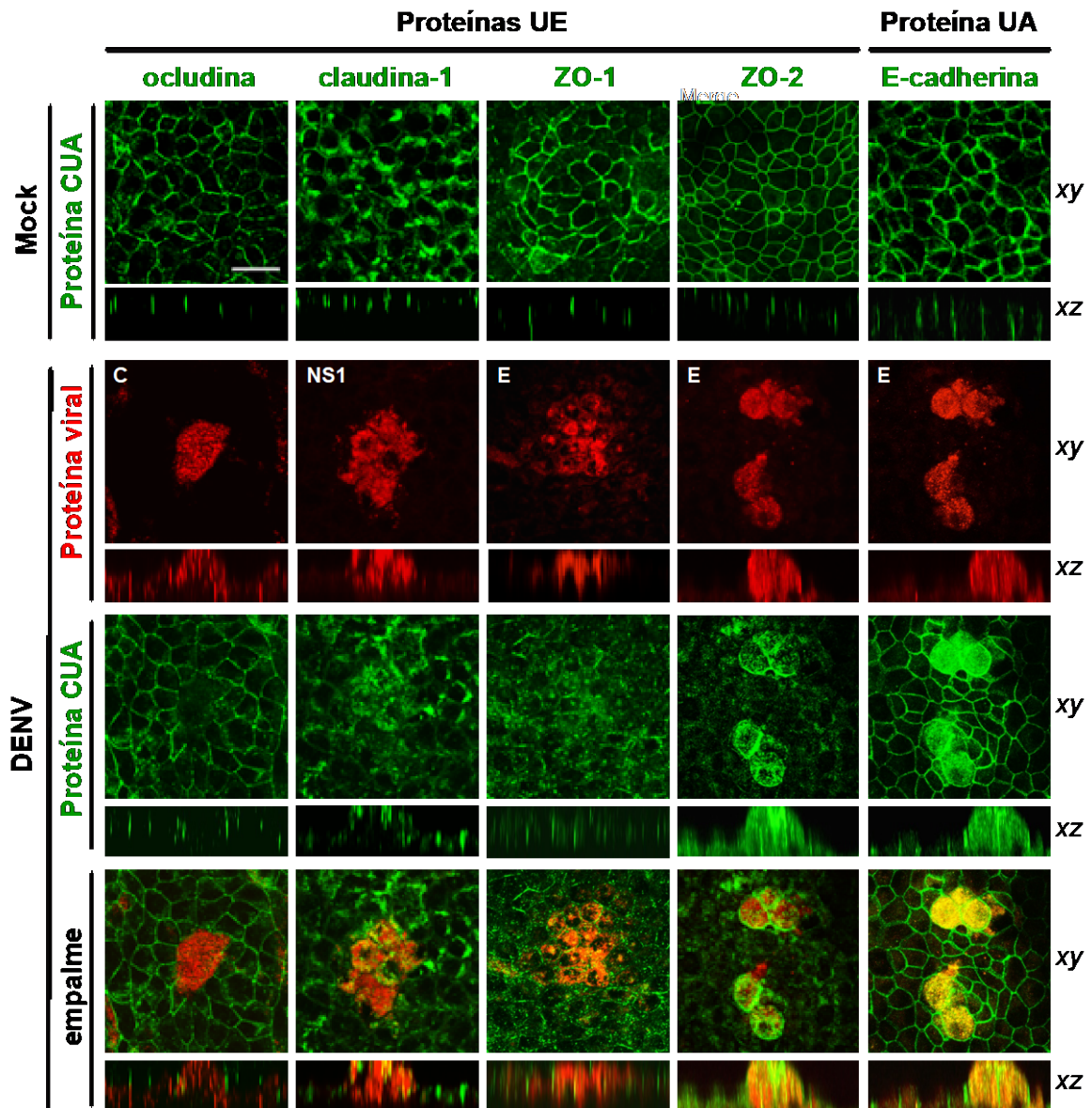


Figura 19. DENV deslocaliza a proteínas de las UEs en células MDCK. Células epiteliales crecidas sobre cubreobjetos fueron infectadas con DENV o tratadas con mock por la superficie apical a una MOI de 10. Después de 48 h la presencia y distribución de las UEs, UAs y proteínas virales fue evaluada por ensayos de inmunofluorescencia y analizada por microscopía confocal a través de cortes en xy y xz. Barra = 40 μ m.

La infección por DENV resulta en la degradación de un subgrupo de proteínas del CUA
 Por Western blot analizamos la expresión de las proteínas de las UEs (occludina, claudina-1, ZO-1 y ZO-2) y de las proteínas de UAs (E-cadherina, α -catenina y β -catenina) en células tratadas con mock y en células infectadas con DENV a las 24 y 48 h.p.i. **Figure 20** muestra que la infección por DENV induce el corte de occludina y una disminución en la expresión de claudina-1 a partir del as 24 h.p.i. Mientras que la expresión de E-cadherina, ZO-1 y ZO-2 no cambia. Por otra parte, las proteínas de las UAs α -catenina y β -catenina dramáticamente disminuyeron después de las 48 h.p.i.

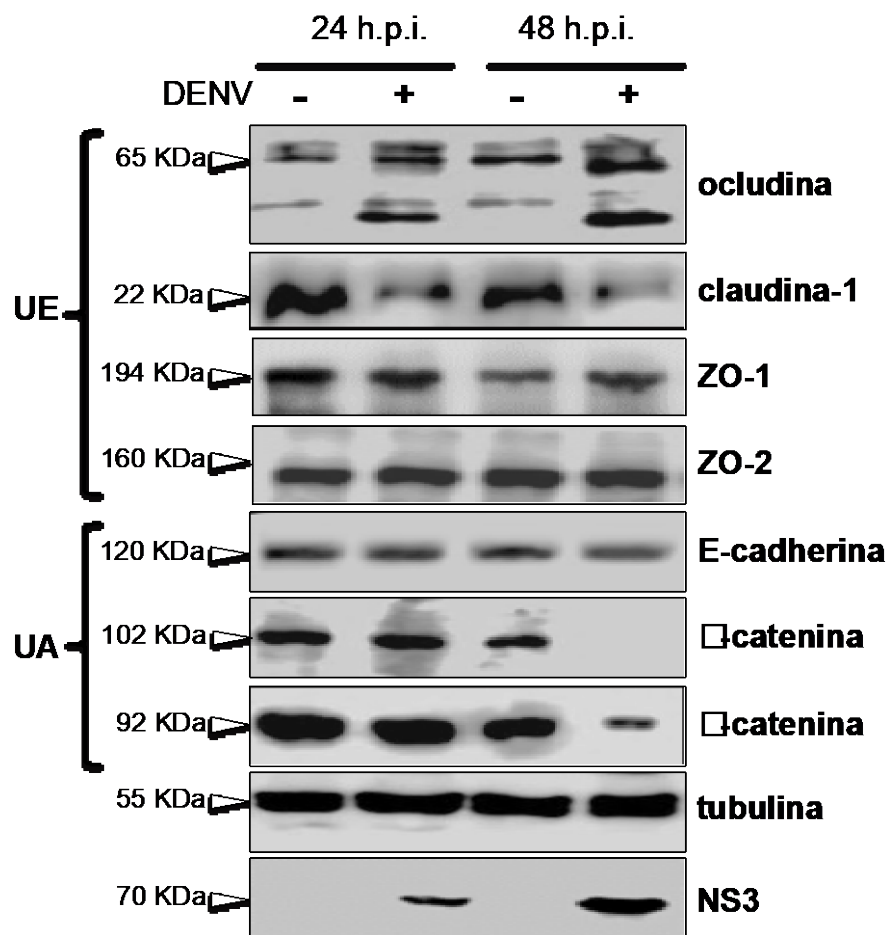


Figura 20. DENV afecta la integridad de algunas proteínas del CUA en células MDCK. Lisados celulares de células MDCK expuestas apicalmente por 24 y 48 h con DENV, fueron analizados por Western blot para evaluar la expresión de proteínas de las UEs y UAs, a la proteína viral NS3 y a la proteína tubulina.

IX. DISCUSIÓN

A nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el cual se evalúa la habilidad de DENV para infectar células epiteliales polarizadas por la superficie apical y por la basolateral, así como su efecto sobre la función y composición de las proteínas del CUA. Encontramos que DENV infecta a las células MDCK por ambas superficies, y que la infección a través de la superficie apical indujo una pronunciada disminución de la TEER y la degradación de un subgrupo de proteínas de las UEs y UAs.

Antes de entrar a las células, los virus se adhieren a éstas, a través de interacciones específicas entre moléculas de la superficie viral y moléculas receptoras sobre la célula huésped, por lo que la infección o no infección de una célula o tejido por un virus, es el resultado de la presencia o ausencia de moléculas receptoras específicas (Mims, 1989). La entrada viral en células polarizadas está correlacionada con la distribución apical y basolateral del receptor de entrada (Blank et al., 2000; Excoffon et al., 2008; Katoh et al., 2015; Kotha et al., 2015; Lai et al., 2013; Lamp et al., 2013; Tucker et al., 1993). En el caso de DENV, éste no sólo requiere un receptor específico para su entrada en la célula, sino que un número de candidatos han sido descritos, incluyendo heparán sulfato (DeRisi Joseph, Penland Lolita et al., 1996), la molécula de adhesión de células dendríticas (DC-SIGN) (Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneetrithep et al., 2003), proteínas de choque térmico (Chen et al., 1999; Reyes-Del Valle and Del Angel, 2004), el receptor de manosa de macrófagos (MR) (Miller et al., 2008), el receptor de lipopolisacárido CD14 (Chen et al., 1999), la chaperona GRP78 (Jindadamrongwech et al., 2004; Upanan et al., 2008), etc.

Las células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (MDCK), han sido ampliamente usadas como modelos de infección polarizada de virus (Clayson and Compans, 1988; Connolly-Andersen et al., 2007; Katoh et al., 2015; Kotha et al., 2015; Lamp et al., 2013; Rodriguez Boulan and Sabatini, 1978; Schlie et al., 2010; Schultze et al., 1996), debido a que exhiben características estructurales y funcionales de epitelios nativos, tienen dominios apical y basolateral bien establecidos así como uniones celulares bien definidas, y además presentan un rápido crecimiento y son apropiadas para imágenes por microscopía confocal (Dukes et

al., 2011; Tucker and Compans, 1993). En este trabajo, mostramos que la adsorción de DENV apical o basolateralmente en células MDCK, resultó en una infección productiva, así como que la infección por DENV por ambos dominios es eficiente en la producción de partículas de progenie viral, las cuales son eficientemente transportadas y liberadas desde y hacia las superficies apical y basolateral de las células epiteliales polarizadas. La entrada bidireccional de DENV en las células epiteliales, pudiera sugerir que los receptores de DENV, están distribuidos en una forma no polarizada a lo largo de las superficies apical y basolateral. Alternativamente, los receptores de DENV pudieran estar polarizados hacia una membrana de superficie, pero el efecto negativo ejercido por DENV sobre las UEs corrompe su función de barrera permitiendo a los receptores virales moverse desde la membrana apical hacia la basolateral y viceversa, como previamente fue encontrado que ocurre con otros receptores virales tipo integrinas $\alpha_v\beta_3$ y la subunidad de la integrina β_1 después del tratamiento con la proteína VP8 de rotavirus (Nava, 2004). Sin embargo, la liberación de DENV preferentemente apical después de una infección basolateral, sugiere que las proteínas virales pudieran contener señales de exportación apical. La naturaleza de estas señales de exportación sigue siendo desconocida, así como la explicación de por qué estas señales son silenciadas después de la infección apical con DENV.

Existen factores virales y de las células huéspedes implicados en la salida polarizada hacia el dominio apical o basolateral. Por ejemplo, el transporte apical de la ribonucleoproteína del virus de la influenza A requiere Rab11 (Momose et al., 2011), la proteína de exportación de sal biliar (BSEP) requiere miosina II para su tráfico hacia la membrana apical (Chan et al., 2005), mientras que la red de microtúbulos participa en la salida polarizada hacia la membrana apical del Virus del oeste del Nilo (Chu and Ng, 2002). Además, el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) y el intercambiador aniónico AE1 contienen señales de exportación basolateral (Koivisto et al., 2001; Matter et al., 1992). Aunque señales de exportación apicales no han sido reportadas, se ha observado que proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol son directamente enviadas a la superficie apical (Paladino et al., 2006) y que la N-glicosilación de proteínas como la subunidad β_2 de la ATPasa de Na^+ , K^+ funciona como una señal de exportación apical (Vagin et al., 2005). Similarmente, los N-

glicanos de las glicoproteínas de envoltura de CHIKV E1, E2 y E3, y la glicoproteína del virus Lassa, actúan como señales de exportación hacia la superficie apical. (Lim and Chu, 2014; Schlie et al., 2010). Estudios adicionales son necesarios para identificar las señales de exportación de las proteínas de DENV.

El sitio de la salida viral se asume que tiene influencia en la propagación. La salida viral apical está relacionada con infecciones locales restringidas a las superficies mucosas (Excoffon et al., 2008; Kotha et al., 2015; Lamp et al., 2013; Tseng et al., 2005), mientras que la salida viral basolateral o bipolar desde los epitelios, facilita la propagación sistémica. Por ejemplo, en otros virus con manifestaciones hemorrágicas como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV), su liberación también ocurre en la superficie basolateral (Connolly-Andersen et al., 2007), mientras que la entrada y salida del virus de la fiebre del valle del Rift es bilateral (Gerrard et al., 2002). En el virus de los Andes (Hantavirus), otro virus con fuga microvascular, la entrada y liberación también ocurre en una forma bipolar (Rowe and Pekosz, 2006). Aquí, aunque observamos una alta secreción de la proteína soluble NS1 hacia la cara apical en células infectadas basolateralmente, encontramos una secreción basolateral de NS1 considerable y además observamos niveles similares de la secreción de NS1 apical y basolateral después de una infección apical. Estos resultados están de acuerdo a los efectos de NS1 observados que incluyen fuga de plasma, producción de citocinas inflamatorias *in vivo* y la inducción de la alteración de la barrera endotelial, lo cual conduce a un incremento en la permeabilidad en las células endoteliales humanas *in vitro* (Beatty et al., 2015).

En otros flavivirus como el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el WNV y el HCV, también ha sido reportada una alteración del complejo de unión apical inducido durante la infección. Por ejemplo, JEV afecta las funciones de barrera en células epiteliales polarizadas (Caco-2 y Huh-7) y en células endoteliales (HUVEC) a tiempos tardíos de infección, reduciendo los niveles de proteínas de las UEs y UAs, en células Caco-2, los niveles de claudina-1, ocludina, β -catenina y E-cadherina fueron reducidos; en células HUVEC, claudina-5 (un miembro de la familia de las claudinas específico de las células endoteliales),

occludina y α - y β -catenina presentaron niveles bajos y en células Huh-7 fue observada una disminución en los niveles de las proteínas claudina-1, ocludina, β -catenina y E-cadherina, sugiriendo un importante papel de la alteración del CUA en la diseminación viral en los tejidos periféricos (Agrawal et al., 2013). Similarmente, la infección por WNV ha mostrado que *in vitro* induce la endocitosis de claudina-1 y JAM-1 en células epiteliales (Caco-2 y MDCK) y en células endoteliales (HUVEC). Adicionalmente, en células epiteliales, WNV también ha mostrado que causa una disminución en la resistencia eléctrica transepitelial y un incremento en el flujo de manitol a través de la monocapa (Medigeshi et al., 2009; Xu et al., 2012). Por otra parte, *in vivo* la infección por WNV resulta en la reducción de los niveles de las proteínas de uniones estrechas ZO-1, claudina-1, ocludina y JAM-A y de las proteínas de uniones adherentes β -catenina y VE-cadherina (Roe et al., 2012). En el caso de HCV, claudina-1 (Benedicto et al., 2012) y ocludina (Benedicto et al., 2009; Liu et al., 2009), son requeridas para la entrada de HCV. También, HCV induce la alteración de las UEs y la pérdida de la polaridad celular en varios sistemas *in vitro* (Benedicto et al., 2012), así como sus proteínas estructurales, principalmente las de envoltura, promueven alteraciones estructurales y funcionales en las proteínas de las UEs ocludina, claudina-1 y ZO-1 en células Huh-7, con una alteración en la permeabilidad paracelular, evaluado con FTIC Dextran (Benedicto et al., 2009, 2008).

En este estudio, mostramos que la infección con DENV afecta la estabilidad de un subgrupo de proteínas de las uniones estrechas y adherente de células epiteliales. DENV parece que específicamente reduce los niveles de las proteínas de UEs claudina-1 y ocludina, así como también los niveles de las proteínas de las uniones adherentes α - y β -catenina. De acuerdo con los resultados, la localización de claudina-1 y ocludina fue perdida. El incremento en el pico obtenido en la TEER con DENV a las 24 h.p.i. sigue siendo difícil de explicar cuando la expresión de claudina-1 y ocludina es disminuida. Por lo cual, la explicación a este suceso se podrá lograr hasta que la expresión de otras claudinas sea explorada, particularmente claudina-2, la cual forma poros catiónicos paracelulares (Amasheh, 2002), incrementa la permeabilidad de las UEs (Van Itallie et al., 2003) y disminuye la TEER (Furuse et al., 2001)

y claudina-4, la cual ejerce un efecto contrario funcionando como una barrera catiónica (Van Itallie et al., 2001) o como un poro aniónico (Hou et al., 2010).

Solamente pocos trabajos han evaluado el efecto de la infección directa de DENV sobre el complejo de unión apical. Similar a nuestros hallazgos, se han descrito alteraciones en la expresión y distribución de las proteínas ZO-1 (Kanlaya et al., 2009), ocludina (Talavera et al., 2004) y claudina-1 inducidas por la infección por DENV, en células endoteliales y epiteliales, así como, una disminución en la TEER (Dewi et al., 2008). También observamos una baja permeabilidad de FITC-Dextran de 70 KDa después de la infección por DENV, lo cual es similar a los datos previamente observados en monocapas confluentes de células endoteliales microvasculares dermales humanas HMEC-1 (Talavera et al., 2004).

Factores solubles producidos durante la infección por DENV, pueden dañar en el complejo de unión apical e incrementar la permeabilidad vascular. Recientemente fue reportado que la forma secretada de NS1 de DENV directamente activa a macrófagos de ratón y a células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a través del receptor TLR4, conduciendo a la inducción y liberación de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y fuga de plasma (Beatty et al., 2015; Modhiran et al., 2015). También, *in vitro* NS1 incrementa la permeabilidad de células endoteliales humanas, alterando la capa del glicocálix endotelial, induciendo la degradación de ácido siálico y el derramamiento de heparán sulfato. La inhibición de sialidasas, catepsina L y heparanasa, previene el rompimiento vascular inducido por la proteína NS1, sugiriendo que enzimas intrínsecas contribuyen importantemente a la hiperpermeabilidad endotelial inducida por NS1, *in vitro* (Glasner et al., 2017; Puerta-Guardo et al., 2016). Similarmente, la proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 (HMGB1) es liberada desde células infectadas con DENV y también puede inducir permeabilidad vascular en células endoteliales (Ong et al., 2012). En el mismo contexto, sobrenadantes de células U937 infectadas en condiciones de ADE-DENV, produjeron niveles significativos de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-12p70 y factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), así como prostaglandinas E2 (PGE2). Estos factores inducen la deslocalización y degradación de las proteínas de las uniones estrechas ocludina y ZO-2 y

de la proteína de unión adherente E-cadherina en células MDCK, así como una rápida pérdida de la TEER (Puerta-Guardo et al., 2013). Cambios morfológicos y alteraciones en las proteínas ZO-1 y VE-cadherina de células HUVEC tratadas con sueros de pacientes con fiebre por dengue hemorrágico han sido observados por microscopía confocal (Appanna et al., 2012). Esto pudiera explicar por qué el daño causado por DENV en monocapas de MDCK pudiera no estar restringido al sitio de infección, sugiriendo la participación de NS1 o citocinas proinflamatorias y quimiocinas producidas por las células epiteliales.

Basado en los presentes datos, proponemos un modelo de infección para DENV (**Fig. 21**). Durante la alimentación de los mosquitos en humanos, DENV probablemente es inoculado en la sangre, con algunos derrames en la epidermis y dermis, resultando en la infección de células inmaduras de Langerhans (células dendríticas epidermales), queratinocitos y de células epiteliales. Al principio las células epiteliales son blanco desde la superficie apical. Posteriormente, durante la fase de viremia, DENV también podría entrar al epitelio desde el dominio basolateral. Después de una exitosa infección de células epiteliales, la progenie viral tiene acceso a ambos dominios de las células epiteliales adyacentes y podrían entrar a estas células eficientemente. Este ciclo podría servir como un mecanismo para generar títulos altos de virus y de esta forma contribuir a la diseminación sistémica. En etapas tardías de la infección, la replicación productiva de virus junto con la secreción de la proteína NS1 y otros factores solubles (citocinas y quimiocinas), contribuye a la apertura de las UEs y a la alteración de la función de barrera, conduciendo a la liberación apical y basolateral de partículas virales infecciosas, contribuyendo a la infección sistémica (**Fig. 21A**). Adicionalmente, durante la fase de viremia de la infección, DENV desde el torrente sanguíneo pudiera también entrar al epitelio desde la superficie basolateral (**Fig. 21B**).

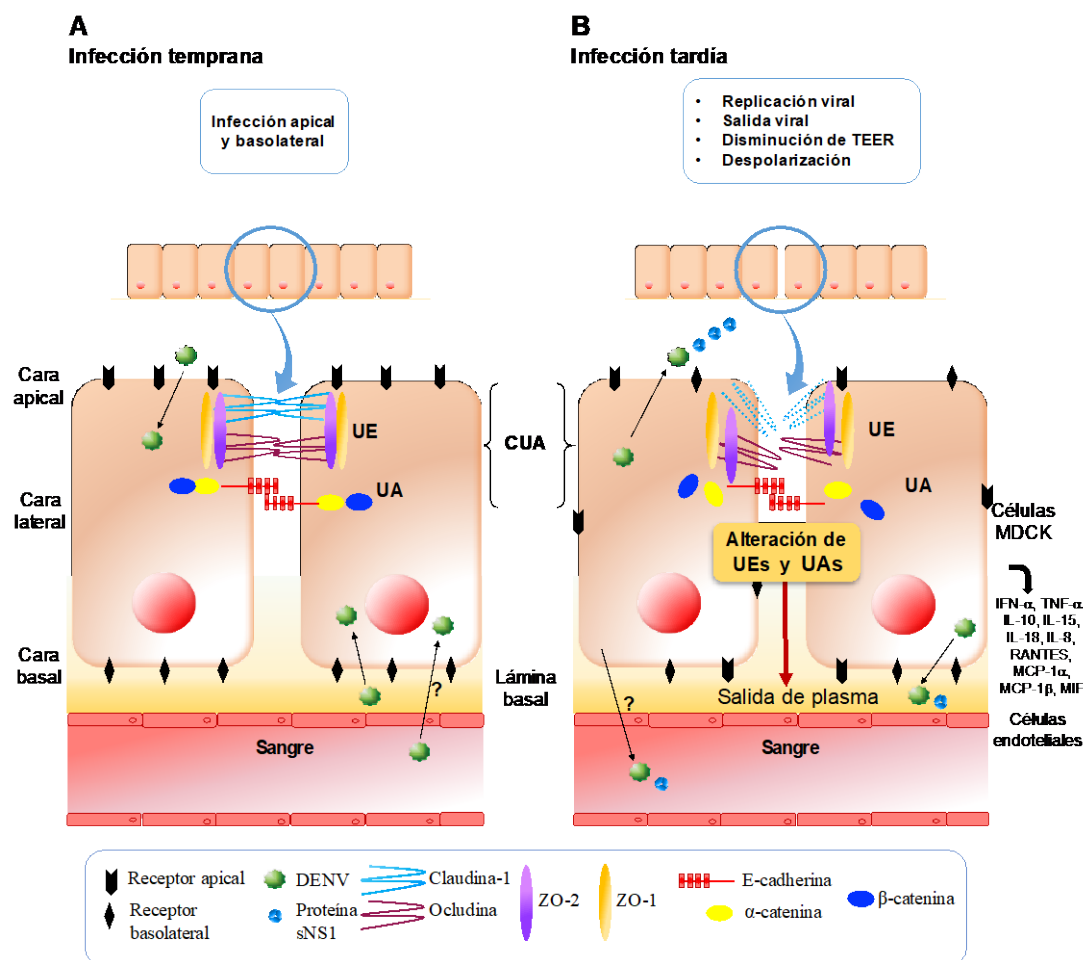


Figura 21. Modelo de la infección por DENV en células MDCK. (A) La entrada de DENV en células MDCK, ocurre tanto por la superficie apical como por la basolateral. (B) A tiempos tardíos de una infección productiva, DENV altera las UEs y UAs. Estos eventos, así como, la secreción de la proteína viral NS1, otros componentes virales y algunos factores solubles como interferones y citocinas, pueden contribuir a la salida de plasma observada durante el dengue severo.

En conclusión, el presente estudio mostró que la entrada y salida de DENV en células epiteliales polarizadas MDCK es bidireccional, lo cual indica que DENV escapa de la barrera epitelial, además que la infección por DENV provocó un significativo efecto citopático en células MDCK y alteró la integridad de las monocapa de células polarizadas. Estos datos pudieran aportar información acerca de los mecanismos de transmisión de DENV y de su patogénesis.

X. CONCLUSIONES

- Las células MDCK son medianamente permisivas a la infección por DENV.
- La entrada y salida de DENV en células MDCK, es bidireccional, ocurre tanto por la superficie apical como por la basolateral.
- En células epiteliales, la infección por DENV establece UEs más débiles, siendo mayormente afectadas cuando la infección ocurre sobre la superficie apical que por la basolateral.
- La infección por DENV también altera la función de barrera de las UEs.
- La infección por DENV induce la desaparición de ocludina desde los bordes celulares, así como la acumulación citoplásmica de claudina-1 y E-cadherina, e inesperadamente concentra ZO-2 en los bordes celulares.
- La infección por DENV induce el corte de ocludina, así como una disminución en la expresión de claudina-1, α -catenina y β -catenina a tiempos post-infección.

XI. PERSPECTIVAS

- Evaluar la localización y expresión de otras proteínas de las UAs.
- Evaluar la expresión de otras claudinas como claudina-2 y claudina-4, las cuales participan en la regulación de la permeabilidad celular.
- Evaluar las señales de exportación de las proteínas de DENV.
- Evaluar las rutas de degradación de las proteínas de las UEs y UAs.

XII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, T., Sharvani, V., Nair, D., Medigeshi, G.R., 2013. Japanese Encephalitis Virus Disrupts Cell-Cell Junctions and Affects the Epithelial Permeability Barrier Functions. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069465>
- Amasheh, S., 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115, 4969–4976. <https://doi.org/10.1242/jcs.00165>
- Appanna, R., Wand, S.M., Ponnampalavanar, S. a., Lum, L.C.S., Sekaran, S.D., 2012. Alterations of Junctional Proteins in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Cytokines in Dengue Patient Serum Samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0606>
- Balda, M.S., Matter, K., 2016. Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 42, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.05.006>
- Beatty, P.R., Puerta-Guardo, H., Killingbeck, S.S., Glasner, D.R., Hopkins, K., Harris, E., 2015. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci. Transl. Med.* 7, 304ra141. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3787>
- Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Barreiro, O., Maldonado-Rodríguez, A., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., López-Cabrera, M., Majano, P.L., 2008. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-Associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* 48, 1044–1053. <https://doi.org/10.1002/hep.22465>
- Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., Bartosch, B., Cosset, F.-L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernández, A., Aldabe, R., López-Cabrera, M., Majano, P.L., 2009. The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J. Virol.* 83, 8012–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00038-09>
- Benedicto, I., Molina-Jiménez, F., García-Buey, L., Gondar, V., López-Cabrera, M., Moreno-Otero, R., Majano, P.L., 2012. Role of tight junctions in hepatitis C virus infection. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 104, 255–263. <https://doi.org/10.4321/S1130-01082012000500006>

- Blank, C.A., Anderson, D.A., Beard, M., Lemon, S.M., 2000. Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J. Virol.* 74, 6476–84. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.14.6476-6484.2000>
- Cereijido, M., Shoshani, L., Contreras, R., 2002. Functional analysis of the tight junction. *Cell-Cell Interact.* 2nd edn (e, 71–91).
- Chan, W., Calderon, G., Swift, A.L., Moseley, J., Li, S., Hosoya, H., Arias, I.M., Ortiz, D.F., 2005. Myosin II regulatory light chain is required for trafficking of bile salt export protein to the apical membrane in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 280, 23741–23747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502767200>
- Chen, Y.C., Wang, S.Y., King, C.C., 1999. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J. Virol.* 73, 2650–2657.
- Chu, J.J.H., Ng, M.L., 2002. Infection of polarized epithelial cells with flavivirus West Nile: Polarized entry and egress of virus occur through the apical surface. *J. Gen. Virol.* 83, 2427–2435.
- Clayson, E.T., Compans, R.W., 1988. Entry of simian virus 40 is restricted to apical surfaces of polarized epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3391–3396.
- Colpitts, C.C., Baumert, T.F., 2016. Claudins in viral infection: from entry to spread. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1908-4>
- Connolly-Andersen, A.M., Magnusson, K.E., Mirazimi, A., 2007. Basolateral entry and release of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in polarized MDCK-1 cells. *J. Virol.* 81, 2158–2164. <https://doi.org/10.1128/JVI.02070-06>
- Contreras, R.G., Shoshani, L., Flores-Maldonado, C., Lázaro, A., Monroy, A.O., Roldán, M.L., Fiorentino, R., Cereijido, M., 2002. E-cadherin and tight junctions between epithelial cells of different animal species. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 444, 467–475. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0827-8>
- DeRisi Joseph, Penland Lolita, B.P.O., Tyagi, S., Kramer, F.R., Group, N.P., DeRisi Joseph, Penland Lolita, B.P.O., 1996. © 1997 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturemedicine>. Group 4, 303–308. <https://doi.org/10.1038/nm0798-822>

- Dewi, B.E., Takasaki, T., Kurane, I., 2008. Peripheral blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with downregulation of vascular endothelial cadherin. *J. Gen. Virol.* 89, 642–652. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83356-0>
- Diamond, M.S., Pierson, T.C., 2015. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell* 162, 488–492. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.005>
- Dukes, J.D., Whitley, P., Chalmers, A.D., Gaush, C., Hard, W., Smith, T., Datta, A., Bryant, D., Mostov, K., McCaffrey, L., Macara, I., O'Brien, L., Zegers, M., Mostov, K., Pieczynski, J., Margolis, B., Shin, K., Fogg, V., Margolis, B., Steed, E., Balda, M., Matter, K., Suzuki, A., Ohno, S., Tsukita, S., Furuse, M., Folsch, H., Mattila, P., Weisz, O., Citi, S., Spadaro, D., Schneider, Y., Stutz, J., Pulimeno, P., Dukes, J., Fish, L., Richardson, J., Blaikley, E., Burns, S., Caunt, C., Chalmers, A., Whitley, P., Madin, S., Darby, N., Green, I., Simmons, N., Valentich, J., Husted, R., Welsh, M., Stokes, J., Webb, C., Lane, K., Dawson, A., Woude, G. Vande, Warn, R., Barker, G., Simmons, N., Richardson, J., Scalera, V., Simmons, N., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., Collares-Buzato, C., Jepson, M., McEwan, G., Hirst, B., Simmons, N., Armitage, W., Juss, B., Jordan, K., Solan, J., Dominguez, M., Sia, M., Hand, A., Lampe, P., Laird, D., Hansson, G., Simons, K., Meer, G. van, Zimmer, G., Lottspeich, F., Maisner, A., Klenk, H., Herrler, G., Mays, R., Siemers, K., Fritz, B., Lowe, A., Meer, G. van, Nelson, W., Klebe, R., Grant, A., Grant, G., Ghosh, P., Gregersen, J., Schmitt, H., Trusheim, H., Broker, M., 2011. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol.* 12, 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-43>
- Excoffon, K.J.D.A., Guglielmi, K.M., Wetzel, J.D., Gansemer, N.D., Campbell, J.A., Dermody, T.S., Zabner, J., 2008. Reovirus Preferentially Infects the Basolateral Surface and Is Released from the Apical Surface of Polarized Human Respiratory Epithelial Cells. *J. Infect. Dis.* 197, 1189–1197. <https://doi.org/10.1086/529515>
- Fuller, S., von Bonsdorff, C.H., Simons, K., 1984. Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. *Cell* 38, 65–77. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90527-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90527-0)
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., 2001. Conversion of zonulae occludentes

- from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J. Cell Biol.* 153, 263–272. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.2.263>
- Gerrard, S.R., Rollin, P.E., Nichol, S.T., 2002. Bidirectional infection and release of Rift Valley fever virus in polarized epithelial cells. *Virology* 301, 226–235. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1588>
- Glasner, D.R., Ratnasiri, K., Puerta-Guardo, H., Espinosa, D.A., Beatty, P.R., Harris, E., 2017. Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. *PLoS Pathog.* 13, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006673>
- Gonzalez-Mariscal, L., 2009. Virus interaction with the apical junctional complex. *Front. Biosci.* 14, 731–768. <https://doi.org/10.2741/3276>
- González-Mariscal, L., Quiros, M., Díaz-Coranguez, M., Bautista, P., 2012. Tight Junctions, Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology, in: Najman, P.S. (Ed.), InTech. <https://doi.org/10.5772/35166>.
- González-Mariscal, L., Tapia, R., Chamorro, D., 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1778, 729–756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.018>
- Gould, E.A., Clegg, J.C.S., 1991. Growth, Titration and Purification of Alphaviruses and Flaviviruses. Mahy BWJ, Ed. *Virol. a Pract. approach.* 43–78.
- Guzman, M.G., Gubler, D.J., Izquierdo, A., Martinez, E., Halstead, S.B., 2016. Dengue infection. *Nat. Publ. Gr.* 2. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Guzman, M.G., Harris, E., 2015. Dengue. *Lancet* 385, 453–465. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60572-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60572-9)
- Harhaj, N.S., Antonetti, D.A., 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1206–1237. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.007>
- Hou, J., Renigunta, A., Yang, J., Waldegger, S., 2010. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18010–18015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009399107>
- Hu, Y.J., Wang, Y.D., Tan, F.Q., Yang, W.X., 2013. Regulation of paracellular permeability: Factors and mechanisms. *Mol. Biol. Rep.* 40, 6123–6142.

- <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2724-y>
- Jindadamrongwech, S., Thepparit, C., Smith, D.R., 2004. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch. Virol.* 149, 915–927. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0263-x>
- Kanlaya, R., Pattanakitsakul, S., Chen, S., Thongboonkerd, V., Sinchaikul, S., 2009. Alterations in Actin Cytoskeletal Assembly and Junctional Protein Complexes in Human Endothelial Cells Induced by Dengue Virus Infection and Mimicry of Leukocyte Transendothelial Migration Alterations in Actin Cytoskeletal Assembly and Junctional Protein 2551–2562. <https://doi.org/10.1021/pr900060g>
- Katoh, H., Nakatsu, Y., Kubota, T., Sakata, M., Takeda, M., Kidokoro, M., 2015. Mumps virus is released from the apical surface of polarized epithelial cells, and the release is facilitated by a Rab11-mediated transport system. *J. Virol.* 89, 12026–12034. <https://doi.org/10.1128/JVI.02048-15>. Editor
- Katzelnick, L.C., Coloma, J., Harris, E., 2017. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *Lancet Infect. Dis.* 3099, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30473-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30473-X)
- Khetarpal, N., Khanna, I., 2016. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *J. Immunol. Res.* <https://doi.org/10.1155/2016/6803098>
- Koivisto, U.M., Hubbard, A.L., Mellman, I., 2001. A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of LDL receptor. *Cell* 105, 575–585. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00371-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00371-3)
- Kotha, P.L.N., Sharma, P., Kolawole, A.O., Yan, R., Alghamri, M.S., Brockman, T.L., Gomez-Cambronero, J., Excoffon, K.J.D.A., 2015. Adenovirus Entry From the Apical Surface of Polarized Epithelia Is Facilitated by the Host Innate Immune Response. *PLoS Pathog.* 11, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004696>
- Lai, C.M., Mainou, B.A., Kim, K.S., Dermody, T.S., 2013. Directional release of reovirus from the apical surface of polarized endothelial cells. *MBio* 4, 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00049-13>
- Lamp, B., Dietzel, E., Kolesnikova, L., Sauerhering, L., Erbar, S., Weingartl, H., Maisner, A., 2013. Nipah virus entry and egress from polarized epithelial cells. *J. Virol.* 87, 3143–54. <https://doi.org/10.1128/JVI.02696-12>

- Lim, P.J., Chu, J.J.H., 2014. A Polarized Cell Model for Chikungunya Virus Infection: Entry and Egress of Virus Occurs at the Apical Domain of Polarized Cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002661>
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J.R., Coyne, C.B., Wang, T., 2009. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* 83, 2011–2014. <https://doi.org/10.1128/JVI.01888-08>
- Lu, R.Y., Yang, W.X., Hu, Y.J., 2014. The role of epithelial tight junctions involved in pathogen infections. *Mol. Biol. Rep.* 41, 6591–6610. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3543-5>
- Mateo, M., Generous, A., Sinn, P.L., Cattaneo, R., 2015. Connections matter - how viruses use cell-cell adhesion components. *J. Cell Sci.* 128, 431–439. <https://doi.org/10.1242/jcs.159400>
- Matter, K., Hunziker, W., Mellman, I., 1992. Basolateral Sorting of LDL Receptor in MDCK Cells: Tyrosin- Dependent Targeting Determinants. *Cell* 71, 741–753.
- Medigeshi, G.R., Hirsch, A.J., Brien, J.D., Uhrlaub, J.L., Mason, P.W., Wiley, C., Nikolich-Zugich, J., Nelson, J.A., 2009. West Nile Virus Capsid Degradation of Claudin Proteins Disrupts Epithelial Barrier Function. *J. Virol.* 83, 6125–6134. <https://doi.org/10.1128/JVI.02617-08>
- Miller, J.L., deWet, B.J.M., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C.M., Dwek, R. a, Rudd, P.M., Gordon, S., 2008. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathog.* 4, 11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040017>
- Mims, C. a, 1989. The pathogenetic basis of viral tropism. *Am. J. Pathol.* 135, 447–55.
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D. a, Panetta, A.K., Sester, D.P., Liu, L., Hume, D. a, Stacey, K.J., Young, P.R., 2015. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci. Transl. Med.* 7, 304ra142. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3863>
- Momose, F., Sekimoto, T., Ohkura, T., Jo, S., Kawaguchi, A., Nagata, K., Morikawa, Y., 2011. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS One* 6, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021123>
- Nava, P., 2004. The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of

- tight junctions in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 117, 5509–5519.
<https://doi.org/10.1242/jcs.01425>
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Despres, P., 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* 4, 723–728.
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor866>
- Navarro-Sanchez, E., Despres, P., Cedillo-Barron, L., 2005. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res* 36, 425–435.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.04.007>
- Ong, S.P., Lee, L.M., Leong, Y.F.I., Ng, M.L., Chu, J.J.H., 2012. Dengue virus infection mediates HMGB1 release from monocytes involving PCAF acetylase complex and induces vascular leakage in endothelial cells. *PLoS One* 7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041932>
- Paladino, S., Pocard, T., Catino, M.A., Zurzolo, C., 2006. GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 172, 1023–1034. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507116>
- Pang, T., Mak, T.K., Gubler, D.J., 2017. Prevention and control of dengue—the light at the end of the tunnel. *Lancet Infect. Dis.* 3099, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30471-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30471-6)
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D.R., Harris, E., 2016. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog.* 12, 1–29.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005738>
- Puerta-Guardo, H., Raya-Sandino, A., Gonzalez-Mariscal, L., Rosales, V.H., Ayala-Davila, J., Chavez-Mungia, B., Martinez-Fong, D., Medina, F., Ludert, J.E., del Angel, R.M., 2013. The Cytokine Response of U937-Derived Macrophages Infected through Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Disrupts Cell Apical-Junction Complexes and Increases Vascular Permeability. *J. Virol.* 87, 7486–7501.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00085-13>
- Reyes-Del Valle, J., Del Angel, R.M., 2004. Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant e protein ligand. *J. Virol.*

- Methods 116, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.10.014>
- Rodriguez Boulan, E., Sabatini, D.D., 1978. Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5071–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.10.5071>
- Roe, K., Kumar, M., Lum, S., Orillo, B., Nerurkar, V.R., Verma, S., 2012. West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J. Gen. Virol.* 93, 1193–1203. <https://doi.org/10.1099/vir.0.040899-0>
- Rowe, R.K., Pekosz, A., 2006. Bidirectional Virus Secretion and Nonciliated Cell Tropism following Andes Virus Infection of Primary Airway Epithelial Cell Cultures Bidirectional Virus Secretion and Nonciliated Cell Tropism following Andes Virus Infection of Primary Airway Epithelial C 80, 1087–1097. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1087>
- Schlie, K., Maisa, A., Freiberg, F., Groseth, A., Strecker, T., Garten, W., 2010. Viral protein determinants of Lassa virus entry and release from polarized epithelial cells. *J. Virol.* 84, 3178–88. <https://doi.org/10.1128/JVI.02240-09>
- Schultze, B., Zimmer, G., Herrler, G., 1996. Virus entry into a polarized epithelial cell line (MDCK): Similarities and dissimilarities between influenza C virus and bovine coronavirus. *J. Gen. Virol.* 77, 2507–2514. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-10-2507>
- Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., Roberts, C., 2015. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat. Publ. Gr.* 15, 745–759. <https://doi.org/10.1038/nri3916>
- Talavera, D., Castillo, A.M., Dominguez, M.C., Escobar Gutierrez, A., Meza, I., 2004. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J. Gen. Virol.* 85, 1801–1813. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19652-0>
- Tassaneetrithep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., Steinman, R.M., Schlesinger, S., Marovich, M.A., 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus

- infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 823–9. <https://doi.org/10.1084/jem.20021840>
- Terry, S., Nie, M., Matter, K., Balda, M.S., 2010. Rho signaling and tight junction functions. *Physiol.* 25, 16–26. <https://doi.org/10.1152/physiol.00034.2009>
- Tseng, C., Tseng, J., Perrone, L., Worthy, M., Popov, V., Peters, C., 2005. Apical entry and release of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus in polarized Calu-3 lung epithelial cells. *J. Virol.* 79, 9470–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9470>
- Tucker, S.P., Compans, R.W., 1993. Virus infection of polarized epithelial cells. *Adv. Virus Res.* 42, 187–247.
- Tucker, S.P., Thornton, C.L., Wimmer, E., Compans, R.W., 1993. Bidirectional entry of poliovirus into polarized epithelial cells. *J. Virol.* 67, 29–38.
- Upanan, S., Kuadkitkan, A., Smith, D.R., 2008. Identification of dengue virus binding proteins using affinity chromatography. *J. Virol. Methods* 151, 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.001>
- Vagin, O., Turdikulova, S., Sachs, G., 2005. Recombinant addition of N-glycosylation sites to the basolateral Na,K-ATPase β 1 subunit results in its clustering in caveolae and apical sorting in HGT-1 cells. *J. Biol. Chem.* 280, 43159–43167. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508262200>
- Van Itallie, C., Rahner, C., Anderson, J.M., 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J. Clin. Invest.* 107, 1319–1327. <https://doi.org/10.1172/JCI12464>
- Van Itallie, C.M., Fanning, A.S., Anderson, J.M., 2003. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 285, F1078–F1084. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00116.2003>
- Xu, Z., Waeckerlin, R., Urbanowski, M.D., van Marle, G., Hobman, T.C., 2012. West Nile virus infection causes endocytosis of a specific subset of tight junction membrane proteins. *PLoS One* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037886>
- Zihni, C., Balda, M.S., Matter, K., 2014. Signalling at tight junctions during epithelial differentiation and microbial pathogenesis. *J. Cell Sci.* 127, 3401–3413. <https://doi.org/10.1242/jcs.145029>

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., Balda, M.S., 2016. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Publ. Gr.* 17. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.80>