

## Tesis Doctoral

# La entrada del virus dengue 3 y sus implicancias en la actividad antiviral

Piccini, Luana Erica

2016-07-06

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Piccini, Luana Erica. (2016-07-06). La entrada del virus dengue 3 y sus implicancias en la actividad antiviral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Piccini, Luana Erica. "La entrada del virus dengue 3 y sus implicancias en la actividad antiviral". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-07-06.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

## **La entrada del virus dengue 3 y sus implicancias en la actividad antiviral**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área de Química Biológica

**Lic. Luana Érica Piccini**

Directora de tesis: Prof. Dra. Elsa B. Damonte

Directora asistente: Dra. Viviana Castilla

Consejera de estudios: Dra. Cybele C. García

Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica,  
Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Buenos Aires, 6 de Julio de 2016

### La entrada del virus dengue 3 y sus implicancias en la actividad antiviral

El virus dengue (DENV) es un grave problema para la salud pública por su reemergencia en las últimas décadas, ya que en la actualidad casi la mitad de la población mundial se encuentra en riesgo de infección. A pesar de la creciente incidencia de DENV en el mundo, y en América en particular, al presente no hay quimioterapia específica para el tratamiento de la enfermedad. Las etapas iniciales que conducen a la entrada del virus a la célula son una alternativa atractiva como estrategia antiviral para bloquear el comienzo de la infección. Sin embargo, se ha demostrado que la entrada de DENV es un proceso muy complejo que depende de distintos factores virales y celulares, que a su vez afectan la susceptibilidad antiviral frente a agentes que interfieren con la interacción inicial virus-célula. El presente trabajo de tesis se propuso estudiar la entrada del virus dengue 3 (DENV-3) a células de mamífero y sus posibles implicancias en la terapia antiviral, analizando la acción inhibitoria de carragenanos. Mediante la utilización de inhibidores farmacológicos y moleculares de las diferentes vías endocíticas celulares se demostró que la entrada infecciosa de DENV-3 cepa H87 a células Vero y A549 ocurre por una vía endocítica no clásica, independiente de clatrina, dependiente de pH ácido y dinamina, con una participación parcial de caveolas. Asimismo, se demostró por primera vez en estos sistemas celulares la coexistencia de vías infectivas y no infectivas para la entrada de DENV, situación que podría disminuir la eficiencia de la infección. El tráfico intracelular luego de la entrada de DENV-3 presentó características propias de los virus de penetración tardía hasta completar el proceso de fusión y desnudamiento viral. La evaluación de la dependencia con clatrina para la entrada de DENV-3 a otras líneas celulares humanas, tales como células HepG2, U937 y K562, mostró una respuesta variable según la línea celular. También los resultados fueron variables en la infección a células U937 en presencia o ausencia de anticuerpos contra DENV. Respecto de la actividad antiviral, los carragenanos  $\lambda$  e  $\iota$  fueron potentes inhibidores de DENV-3, con valores de índice de selectividad (relación citotoxicidad / actividad antiviral) mayores a 1000, excepto en la infección mediada por anticuerpos. El blanco de ambos compuestos fue la entrada del virus a la célula, interfiriendo con la adsorción viral y la internalización de la nucleocápside a partir de los endosomas. La caracterización de la vía de entrada de DENV-3 y de la actividad antiviral de compuestos que bloquean eventos tempranos en la multiplicación del virus aporta conocimientos para dilucidar los mecanismos que regulan la infección viral así como optimizar el diseño y utilización de nuevas terapias antivirales que sean protectoras ante los cuatro serotipos de DENV, de modo de evitar la progresión a las formas severas y letales de la enfermedad.

**Palabras clave:** virus dengue, entrada viral, endocitosis, clatrina, endocitosis no clásicas, infección mediada por anticuerpos, tráfico intracelular, virus de penetración tardía, carragenanos, actividad antiviral.

### The entry of dengue virus 3 and its implications for antiviral therapy

The reemergence of dengue virus (DENV) in the last decades is a serious threat for public health, since at present almost half the world population is at risk of infection. Instead of the increasing DENV incidence worldwide, and particularly in America, there is no specific chemotherapy for treatment of the disease. The initial stages leading to virus entry into the host cell represent an attractive antiviral strategy for chemotherapy to suppress the beginning of infection. However, DENV entry appears to be a very complex process regulated by several cell- and virus-dependent factors that may also affect antiviral susceptibility to agents blocking the initial virus-cell interaction. The aim of the present study was to study the entry of dengue 3 (DENV-3) into mammalian cells and the possible relationship with antiviral susceptibility, analyzing the inhibitory action of carrageenans. By using chemical and molecular inhibitors of different endocytic pathways, it was demonstrated that the infectious entry of DENV-3 strain H87 into Vero and A549 cells occurs by a non-classical clathrin-independent endocytosis pathway, which depends on the acid endosomal pH and dynamin, and is partially-mediated by caveolae. Results show for the first time in these cell systems the simultaneous coexistence of infective and non-infective routes for DENV entry into the cell, a phenomenon that may reduce the efficiency of infection. The intracellular trafficking of DENV-3 after uptake was typical of a late-penetrating virus to achieve fusion and viral uncoating. The influence of the clathrin pathway in DENV-3 infective entry in other mammalian cell lines of human origin, such as HepG2, U937 and K562 cells, was also evaluated demonstrating that variable entry pathways are employed depending on the host cell. Furthermore, the entry into U937 cells also when infection occurred in the presence of non neutralizing antibodies. Next, the antiviral susceptibility of DENV-3 to entry inhibitors was evaluated. Both  $\lambda$  and  $\mu$  carrageenans were potent inhibitors of DENV-3, with selective index values (ratio cytotoxicity / antiviral activity) higher than 1000. However, no inhibition was detected in antibody-mediated infection. The target of these compounds was virus entry by dual blockade of virus adsorption and internalization of the nucleocapsid from the endosomes. The characterization of the entry pathway of DENV-3 and the antiviral activity of compounds that block early events in virus multiplication cycle provides information to elucidate the mechanisms responsible of virus infection as well as to optimize the design of new antiviral therapies protective against the four DENV serotypes, in order to prevent progression to severe and lethal forms of disease.

**Keywords:** dengue virus, viral entry, endocytosis, clathrin, non-classical endocytosis, antibody-mediated infection, intracellular traffic, late penetrating virus, carrageenan, antiviral activity.

Quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Elsa Damonte por haberme brindado la posibilidad de ser parte de su hermoso grupo de trabajo, ya desde la primer entrevista hizo que me sintiera a gusto, ésta primera impresión fue acertada y en todos estos años compartidos de esfuerzos aunados valoro profundamente su presencia, apoyo, constancia y dedicación para conmigo y mi trabajo, pero sobre todo su cariño y comprensión. Para mí es un orgullo que sea mi directora, con toda su trayectoria y reconocimiento, ha sabido ser una guía académica esencial en los momentos que supimos encontrarnos, tanto es así que frecuentemente desee tener un desempeño más brillante, porque ella se lo merece.

A Vivi! Ya son miles las veces que le agradecí... es infaltable su presencia en esta sección, en lo académico ha sabido ser mi guía experimental y consejera, la primer persona a la que recurro en los momentos de alegría y desesperación. Este trabajo no hubiera sido posible sin sus innumerables ayudas, pero por sobre todo por hacerme sentir cómoda, animada, querida en el día a día en el laboratorio, por los mates, los almuerzos, las charlas sobre la vida, los resultados, los no-resultados, los aciertos, los errores, los desafíos, la política y mucho más. Simplemente una vez más: gracias.

A Isa, aunque ya no esta en el día a día porque es momento de disfrutar de su merecida jubilación, por haber hecho divertidos la mayoría de estos años, con sus muchas palabras y las conversaciones que compartimos, por su cariño, sus enojos y reclamos. Gracias por disponer de todo lo necesario para facilitarme el trabajo a mí y a todo el equipo, por su trabajo de hormiga, a lo gigante.

A Guille por sus chistes y saludos matinales, creo que sin ellos no arrancaban los días.

A Luis quiero agradecerle el haberme dado al puma que tengo en casa disfrazado de gato que claramente me cambió la vida, también por la alegría y entusiasmos transmitidos, por el interés que siempre mostrás en las charlas que mantenemos, por los consejos que me supiste dar, y por sostener al labo.

A Clau, compañera y amiga, sé que siempre puedo contar con ella para cualquier cosa del trabajo experimental y teórico, como así también en las cuestiones de la vida extrafacultativa.

A Eliana, su tesis de doctorado supo ser mi biblia. Quiero agradecerle particularmente el haberme enseñado a trabajar en cultivo y el haberme acompañado en mis primeros pasos.

A Laurita, cuando yo llegué vos te ibas y sin embargo eso no fue obstáculo para que me ayudaras con mi trabajo de laboratorio en incontables ocasiones, por tus respuestas casi inmediatas a mis mails, por tus consejos experimentales y por el trato cordial y afectuoso que siempre me diste.

A Ana, que con altibajos supimos compartir interesantísimos debates y acompañamiento, con su explosiva energía dejó huella. Principalmente quiero agradecerle el equipo que logramos conformar en su momento, aunando trabajos y dividiendo tareas, ayudándonos mutuamente y por haberme transmitido sus conocimientos y desarrollos experimentales con las células en suspensión y ADE.

A Ema y Fede, por las interesantes charlas sobre todo tipo de temas, académicos y no académicos y, las muchas veces que me ayudaron con las cuestiones experimentales en

*cultivo, particularmente a Ema por compartirme reactivos y a Fede por su ayuda con los horarios.*

*A Vero, por derramar alegría y disparate, pero también por su seriedad al momento de intercambiar conocimientos. Por las maravillosas conversaciones y el trabajo compartido en la compra de plásticos, que juntas logramos hacer eficientemente sin morir en el intento.*

*A Belén, por su excelentísima predisposición a colaborar y ayudar.*

*A todo el equipo de trabajo del área de Virología, quienes todos han aportado su grano de arena en este trabajo, con una pregunta o comentario de pasillo o de seminario, entre otras muchas formas. Por hacer del laboratorio un lugar agradable y ameno, que hacen motivante el día a día.*

*A Amy, Lucía, Tincho y July, por venir a visitarme al laboratorio a tomar medio mate entre nuestras muchas ocupaciones en la búsqueda compartida de convertirnos en doctores. Y a todo el Staff por su apoyo y energía para que lo logremos! Sin su compañía no sería posible esta instancia, ellos hicieron posible e hicieron única y memorable la vivencia de la carrera de grado. Gracias a Marga por sus trenzas para que logremos escribir la tesis CHCHCHCHCH...*

*A Pablo, mi compañero y amor, quien supo acompañarme, apoyarme, darme energía y sostenerme en este desafiante e intrincado camino que es la realización de una tesis de doctorado. Los últimos serán los primeros.*

*A Iru, por haberme cambiado la vida para siempre y por haberme tenido paciencia especialmente en la etapa de escritura, que me sustrajo del universo como agujero negro, ella estoicamente aprendió a darme un abrazo y una sonrisa tironeando de mi pierna en las muchas horas de trabajo de computadora.*

*A mi familia, mis padres, hermanos, abuelos, suegros y cuñados, quienes me alientan y se alegran y festejan con mis logros. Y a mis sobrinos porque me llenan de amor.*

*A los docentes del profesorado de Biología de la FCEyN-UBA, por haber cambiado mi concepción de la ciencia y la educación.*

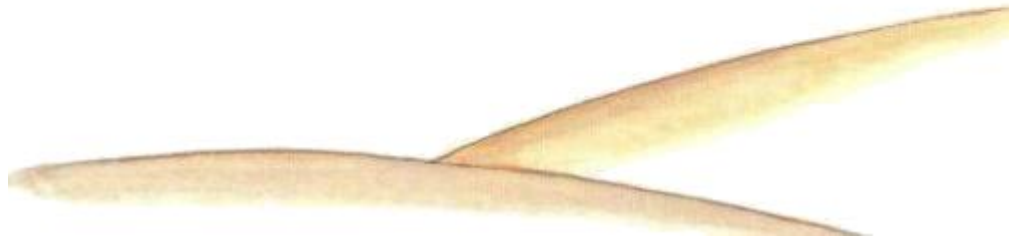
*Al Estado Nacional Argentino, por haberme brindado la posibilidad de una educación pública, gratuita y de calidad.*

*A Pablo e Irupé,  
porque son la alegría de vivir*



” lo esencial es invisible a los ojos ”

*Antoine Saint-Exupéri*





Los resultados de esta tesis han sido publicados en forma parcial en las siguientes revistas científicas:

**Piccini LE**, Castilla V, Damonte EB (2015) Dengue-3 Virus Entry into Vero Cells: Role of clathrin-mediated endocytosis in the outcome of infection. *PLoS ONE* 10: e0140824.

Castilla V, **Piccini LE**, Damonte EB (2015) Dengue virus entry and trafficking: perspectives as antiviral target for prevention and therapy. *Future Virology* 10: 625-645.

El presente trabajo de tesis se realizó con la financiación proveniente de:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
- Universidad de Buenos Aires
- Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica

**ÍNDICE**

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Abreviaturas</b>                                    | <b>13</b> |
| <b>Introducción</b>                                    | <b>16</b> |
| 1. La enfermedad de dengue                             | 17        |
| 1.1. La situación de dengue en Argentina               | 19        |
| 2. El agente etiológico                                | 20        |
| 3. Características estructurales del virión            | 21        |
| 3.1. El genoma de DENV                                 | 21        |
| 3.2. Las proteínas virales                             | 23        |
| 3.2.i. Las proteínas estructurales                     | 23        |
| 3.2.ii. Las proteínas no estructurales (NS)            | 24        |
| 4. El ciclo de multiplicación de DENV                  | 25        |
| 4.1. Receptores de DENV                                | 28        |
| 4.2. La internalización viral                          | 29        |
| 4.3. El tránsito intracelular y el desnudamiento viral | 33        |
| 5. La infección mediada por anticuerpos                | 35        |
| 6. La entrada de DENV como blanco antiviral            | 38        |
| 6.1 Los polisacáridos sulfatados                       | 40        |
| <b>Objetivos</b>                                       | <b>42</b> |
| <b>Materiales y Métodos</b>                            | <b>44</b> |
| 1. Células                                             | 45        |
| 2. Virus                                               |           |
| 2.1 Cepas                                              | 46        |

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2 Preparación de las suspensiones virales                                                       | 46 |
| 2.3 Ensayo de formación de placas de lisis                                                        | 46 |
| 2.4 Concentración de las suspensiones virales                                                     |    |
| 2.4.i Por ultracentrifugación y purificación en gradiente discontinuo                             | 46 |
| 2.4.ii Por ultrafiltración                                                                        | 47 |
| 3. Determinación de la viabilidad celular                                                         |    |
| 3.1. Método de MTS                                                                                | 47 |
| 3.2. Método de exclusión de azul tripán                                                           | 48 |
| 4. Microscopía de fluorescencia: ensayo de inmunofluorescencia indirecta                          | 48 |
| 5. Cinética de entrada viral                                                                      |    |
| 5.1. Cinética de internalización viral: ensayo de centros infecciosos                             | 49 |
| 5.2. Cinética de fusión viral: ensayo de susceptibilidad a cloruro de amonio                      | 50 |
| 6. Determinación de la actividad virucida                                                         | 50 |
| 7. Inhibidores químicos: determinación de su efecto sobre la entrada y la multiplicación viral    |    |
| 7.1. Mediante ensayos de inhibición del rendimiento viral                                         | 51 |
| 7.2. Mediante ensayos de centros infecciosos                                                      | 52 |
| 7.3. Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta                                            | 53 |
| 7.4. Mediante PCR cuantitativa                                                                    | 53 |
| 8. Inhibidores moleculares: determinación de su efecto sobre la entrada y la multiplicación viral |    |
| 8.1. Construcciones plasmídicas                                                                   | 54 |
| 8.2. Amplificación y purificación de las construcciones plasmídicas                               | 54 |
| 8.3. Transfección de cultivos celulares                                                           | 55 |
| 8.4. Infección de cultivos celulares transfectados y análisis de la multiplicación viral          | 55 |
| 9. Evaluación del efecto de inhibidores químicos y moleculares sobre procesos celulares           |    |
| 9.1. Tinción de células vivas con naranja de acridina                                             | 55 |
| 9.2. Ensayos de internalización de ligandos marcados con fluorocromos                             | 56 |

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 9.3. Tinción de microtúbulos y microfilamentos                                             | 56        |
| 10. Análisis de la infección de DENV-3 mediada por Ac                                      |           |
| 10.1. Establecimiento del sistema in vitro de entrada de DENV-3 mediada por Ac             | 57        |
| 10.2. Bloqueo de la entrada mediada por Ac                                                 | 57        |
| 11. Actividad antiviral de polisacáridos sulfatados sobre la infección con DENV-3          |           |
| 11.1. Compuestos                                                                           | 58        |
| 11.2. Actividad antiviral en células Vero, A549 y HepG2                                    | 58        |
| 11.3. Mecanismo de acción: efecto en las etapas tempranas                                  | 59        |
| 11.4. Actividad antiviral en células mieloides humanas en ausencia o presencia de Ac       | 59        |
| <b>Resultados</b>                                                                          | <b>61</b> |
| <b>Capítulo 1: LA ENTRADA DEL VIRUS DENGUE A LA CÉLULA HUÉSPED</b>                         |           |
| 1. EL MECANISMO DE ENTRADA DE DENV-3                                                       |           |
| 1.1. La cinética de internalización de DENV-3 a células Vero                               | 62        |
| 1.2. Análisis de la dependencia de pH para la entrada viral                                | 64        |
| 1.3. La endocitosis mediada por clatrina como posible vía de entrada                       | 66        |
| 1.4. Estudio de la participación de la proteína dinamina en la entrada                     | 71        |
| 1.5. Evaluación del efecto del colesterol sobre la entrada de DENV-3                       | 74        |
| 1.6. La endocitosis dependiente de caveolas como posible vía de entrada                    | 76        |
| 1.7. El requerimiento de clatrina para la entrada de DENV-3 depende de la célula huésped   | 78        |
| 1.8. El requerimiento de clatrina para la entrada de DENV-3 en la infección mediada por Ac | 80        |
| 2. EL TRÁNSITO INTRACELULAR DE DENV-3 EN CÉLULAS VERO                                      |           |
| 2.1. Análisis de la cinética de fusión de DENV-3 en células Vero                           | 83        |
| 2.2. Análisis del tránsito endosomal de DENV-3                                             | 84        |

|                                                                                                                             |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3. PARTICIPACIÓN DEL CITOESQUELETO EN LA ENTRADA DE DENV-3 A CÉLULAS VERO Y A549                                            |            |
| 3.1. Los microfilamentos de actina en la entrada de DENV-3                                                                  | 88         |
| 3.2. Los microtúbulos en la entrada de DENV-3                                                                               | 90         |
| <br><b>Capítulo 2: ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS CARRAGENANOS FRENTE A DENV-3</b>                                              |            |
| 2.1. La actividad antiviral de carragenanos frente a DENV-3 en células Vero y A549                                          | 92         |
| 2.2. Modo de acción antiviral de los carragenanos en la infección de células Vero y A549 con DENV-3                         | 95         |
| 2.2.i Influencia del tiempo de adición de los compuestos sobre la actividad antiviral contra DENV-3                         | 96         |
| 2.2.ii Efecto de los carragenanos sobre las etapas tempranas del ciclo de multiplicación de DENV-3                          | 97         |
| 2.3. Actividad antiviral de carragenano $\lambda$ en otras líneas celulares humanas                                         | 98         |
| 2.3.i Actividad antiviral de carragenano $\lambda$ sobre la infección de células HepG2, U937 y K562 con DENV-3              | 98         |
| 2.3.ii Actividad antiviral de carragenano $\lambda$ sobre la infección de DENV-3 mediada por Ac                             | 100        |
| <br><b>Discusión</b>                                                                                                        | <b>101</b> |
| 1. DENV-3 explota vías endocíticas alternativas para la internalización productiva y no-productiva en la célula hospedadora | 102        |
| 2. La actividad antiviral de los carragenanos frente a la infección por DENV-3                                              | 108        |
| 3. Consideraciones finales                                                                                                  | 112        |
| <br><b>Bibliografía</b>                                                                                                     | <b>113</b> |

## Abreviaturas

Ac: anticuerpo

ADE: respuesta aumentada mediada por anticuerpos (*antibody-dependent enhancement*)

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

AP-2: assembly polypeptide 2

Arf6: factor de ADP-ribosilación 6

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenosina trifosfato

ATPasa: adenosín trifosfatasa

BSA: seroalbúmina bovina

BVDV: virus de la diarrea viral bovina

C: proteína de la cápside viral

cav-1: caveolina-1

CC50: concentración citotóxica 50 %

CE50: concentración efectiva 50 %

CI: centros infecciosos

CYD-TDV: DengVaxia, vacuna tetravalente de Sanofi Pasteur

DABCO: 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DDT: dicloro difenil tricloroetano

DE: desvío estándar

DENV: virus dengue

DI, II y III: dominios I, II y III de la proteína de la envoltura viral

DMSO: dimetilsulfóxido

DN: dominante negativo

dNTP: desoxinucleósido trifosfato

DTT: ditioneitol

dyn II: dinamina II

E: glicoproteína de envoltura viral

EE: endosoma temprano (*early endosome*)  
EMC: endocitosis mediada por clatrina  
Eps15: *epidermal growth factor receptor pathway substrate 15*  
FcR: receptor de fragmentos Fc  
FITC: isotiocianato de fluoresceína  
GAG: glicosaminoglicano  
GBV-C: virus GB tipo C  
GDP: guanosín difosfato  
GEEC: *GPI-enriched endosomal compartments*  
GFP: *green fluorescent protein*  
GRP78/BiP: *glucose-regulated protein 78 KDa/binding immunoglobulin protein*  
GTP: guanosín trifosfato  
GTPasa: guanosina trifosfatasa  
h: hora  
HCMV: citomegalovirus humano  
HCV: virus de la hepatitis C  
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico  
HVG: virus de la hepatitis G  
HIV: virus de inmunodeficiencia humana  
HPV: virus papiloma humano  
HS: heparán sulfato  
HSP: proteína de shock térmico (*heat shock protein*)  
HSP70/90: *heat shock protein 70/90 KDa*  
HSPG: proteoglicanos de heparán sulfato  
HSV: virus herpes simplex  
IFN: interferón  
IgG: inmunoglobulina G  
IL 2: interleuquina 2  
IS: índice de selectividad  
JEV: virus de la encefalitis japonesa  
JUNV: virus Junín  
LCMV: virus de la coriomeningitis linfocitaria  
LD: *lipid droplets*  
LE: endosoma tardío (*late endosome*)

m.i.: multiplicidad de infección  
M: proteína de la membrana viral  
MEM: medio esencial mínimo  
min: minuto  
MM: medio de mantenimiento  
M-MLV: Virus de la leucemia murina de Moloney  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio  
MVEV: virus de la encefalitis de Murray Valley  
MyM: materiales y métodos  
NGC: Nueva Guinea C  
NS: proteína no estructural  
NTP: nucleósido trifosfato  
p.i.: post-infección  
PBS: buffer fosfato salino  
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
PrM: proteína precursora de la membrana viral  
PS: polisacárido sulfatado  
RE: endosoma de reciclaje perinuclear (*recycling endosome*)  
RER: retículo endoplasmático rugoso  
RSV: virus respiratorio sincicial  
RT: transcripción reversa  
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción  
SINV: virus Sindbis  
SFB: suero fetal bovino  
SLEV: virus de la encefalitis de Saint Louis  
TBEV: virus de la encefalitis transmitida por garrapatas  
TCRV: virus Tacaribe  
TG: trans golgi  
TRITC: rodamina  
UFP: unidad formadora de placa  
UTR: región no traducible  
VSV: virus de la estomatitis vesicular  
WNV: virus del nilo del oeste  
YFV: virus de la fiebre amarilla



# INTRODUCCIÓN

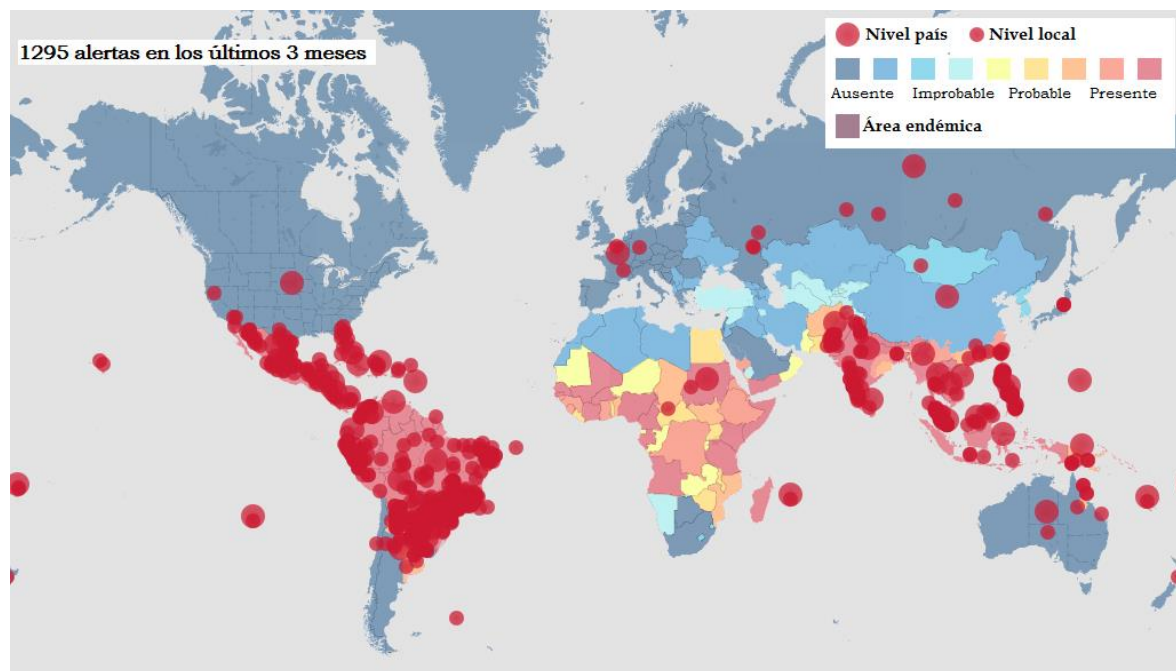
## 1. *La enfermedad de dengue*

El virus dengue (DENV) puede causar en el hombre una serie de enfermedades de distinta gravedad, desde una infección que prospera de manera asintomática a una afección febril aguda, benigna y auto-limitada denominada fiebre del dengue, la cual a su vez puede progresar a dengue grave, también denominado fiebre hemorrágica de dengue o síndrome de shock por dengue, con una alta tasa de mortalidad (Gubler, 1998; 2006; Deen *et al.*, 2006). La falta de control del mosquito vector *Aedes aegypti* ha producido la reemergencia del dengue convirtiéndose en un creciente problema de salud pública. Según una estimación reciente, se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año, de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente (Bhatt *et al.*, 2013). Particularmente, en las últimas décadas en las Américas hubo un fuerte aumento de la morbilidad y de la mortalidad por dengue (San Martín *et al.*, 2010), la incidencia media se incrementó de 16,42 casos en la década de 1980 a 218,3 cada 100.000 habitantes en el período 2000-2010 (OPS/OMS, 2014).

El dengue está presente en los climas tropicales y subtropicales de todo el planeta (Figura I.1), sobre todo en las zonas urbanas y semiurbanas. En América los únicos países libres de dengue son Chile y Canadá por ausencia del mosquito vector (OPS/OMS, 2014). Un caso especial es Uruguay, país que no presentó casos de dengue autóctono por 100 años aunque estuviera presente *Aedes aegypti*, sin embargo, en febrero del corriente año se documentaron 26 casos confirmados de fiebre de dengue (Boletines sobre brotes epidémicos de dengue de la OMS: 25 de febrero y 10 de marzo).

El ciclo de transmisión entre el mosquito y el humano comprende una ventana temporal relacionada con los procesos virales. El mosquito hembra se alimenta de la sangre de una persona en período de viremia (entre 4 y 12 días post-infección), se infecta y el virus multiplica hasta que, aproximadamente al décimo día, migra a las glándulas salivales y a partir de ese momento puede ser transmitido durante toda la vida del insecto (OPS, 2003). En los casos de dengue sintomático se desarrolla una enfermedad de tipo gripal, con un cuadro febril a los 5-7 días después de la picadura de un mosquito infectado, alcanzando una temperatura corporal de 40 °C, junto con malestar general, cefalea, dolores retro-oculares, musculares y articulares. Estos signos clínicos, que duran entre 2 y 7 días, pueden acompañarse de exantema en no más del 50% de los casos. El dengue grave es una complicación potencialmente mortal porque lleva a grandes

hemorragias o falla orgánica (Guía de enfermedades infecciosas del Ministerio de Salud Argentino, 2015).



**Figura I.1: Mapa de la distribución mundial de dengue.** Áreas y países con riesgo de dengue, a nivel país y nivel local representados con círculos rojos. Modificado del DengueMap de la página web de la Organización Mundial de la Salud presente en junio de 2016. <http://www.healthmap.org/dengue/es/>

Existen cuatro serotipos de DENV (DENV-1 a DENV-4) estrechamente relacionados. La infección con un serotipo viral confiere una fuerte y prolongada protección inmunológica frente a la reinfección con el mismo serotipo viral, sin embargo, los anticuerpos (Ac) generados no protegen frente a la infección con un serotipo heterólogo. Más aún, la infección secundaria con un serotipo distinto al causante de la infección primaria es un factor de riesgo para la progresión a las afecciones severas de dengue, aparentemente a través de un mecanismo mediado por los Ac sub-neutralizantes (Rothman, 2004). Frente a este fenómeno, surge la necesidad de que las vacunas y antivirales anti-DENV sean protectores frente a todos los serotipos.

Recientemente se ha aprobado el uso de la primera vacuna recombinante tetravalente atenuada, llamada Dengvaxia (CYD-TDV), en México, Filipinas, Brasil, El Salvador y Paraguay (Pitisuttithum & Bouckennooghe, 2016), sin embargo la misma sólo

produce una reducción en la incidencia de dengue en un 65,6 % (Hadinegoro *et al.*, 2015) e incluso recientemente se documentó un bajo título de anticuerpos contra DENV en muestras de sangre de voluntarios que participaron en un ensayo clínico realizado en 2009, además solamente 2/23 muestras poseían capacidad de reducir la viremia por DENV-2 en un modelo de ratón. Los autores infieren que aunque la muestra es demasiado pequeña para ser concluyentes, pareciera ser que la memoria inmune generada por CYD-TDV es relativamente baja (Velumani *et al.*, 2016). Por otro lado, dado que no hay antivirales específicos disponibles para el tratamiento de la infección (Damonte *et al.*, 2004a; Lim *et al.*, 2013), el dengue sigue representando un real desafío a la medicina y es una de las prioridades en el desarrollo de agentes antivirales. En la actualidad la prevención y el control de dengue dependen exclusivamente de las medidas eficaces de lucha anti-vectorial. Los programas sanitarios se enfocan en dos objetivos: la eliminación del vector mediante el uso de insecticidas y larvicidas y la concientización de los ciudadanos sobre la necesidad de eliminar posibles criaderos del mosquito mediante la denominada “descacharrización”, y su éxito depende del compromiso tanto a nivel nacional como de la comunidad (Gómez-Dantés & Willoquet, 2009; Tapia-Conyer *et al.*, 2012).

### *1.1 La situación de dengue en Argentina*

Los primeros casos reportados y registrados de dengue en la República Argentina fueron en los años 1905 y 1911, el primer brote sucedió en el año 1916 con 15.000 casos. En la década del 60, el mosquito vector fue erradicado prácticamente de casi todo el continente; sin embargo, con la prohibición del insecticida DDT y la falta de financiamiento para los planes de control, el vector reapareció en la década del 80 manifestándose su presencia con nuevos brotes de dengue (Vezzani & Carbajo, 2008). A partir de 1998, se comenzaron a detectar brotes esporádicos autóctonos en la región del noroeste argentino (Áviles *et al.*, 2000). Particularmente, en 2009 hubo una gran epidemia que abarcó varias provincias incluyendo al área metropolitana, con 26.644 enfermos y se registraron por primera vez 5 muertes por dengue, de las cuales 3 fueron por casos de dengue grave (Seijo *et al.*, 2009).

Con respecto a la circulación de los distintos serotipos en el territorio argentino, se registró por primera vez la co-circulación de 3 serotipos de dengue durante el brote ocurrido en la provincia de Salta en el 2003: DENV-1, DENV-2 y DENV-3 (Masuh, 2008). Y en el año 2010 el Ministerio de Salud argentino confirmó la circulación de los virus DENV-1, DENV-2, y DENV-4, con la introducción por vez primera de DENV-4 (Morales *et al.*, 2010; Parte de Prensa N° 23 del Ministerio de Salud, 2010).

En la actualidad, los casos acumulados en las primeras 18 semanas de 2016 superan en un 37,8% a los registrados en el mismo período de 2009 (Boletín Integrado de Vigilancia N° 309 del Ministerio de Salud, 2016). Hay 67.761 casos reportados con sospecha de dengue, de los cuales se confirmaron 35.208 y ascienden a 11 los pacientes fallecidos que están siendo evaluados para su clasificación final. Por lo tanto, la creciente actividad endémica y la introducción de los cuatro serotipos virales posicionan a nuestro país como una región de alto riesgo de desarrollo de dengue grave.

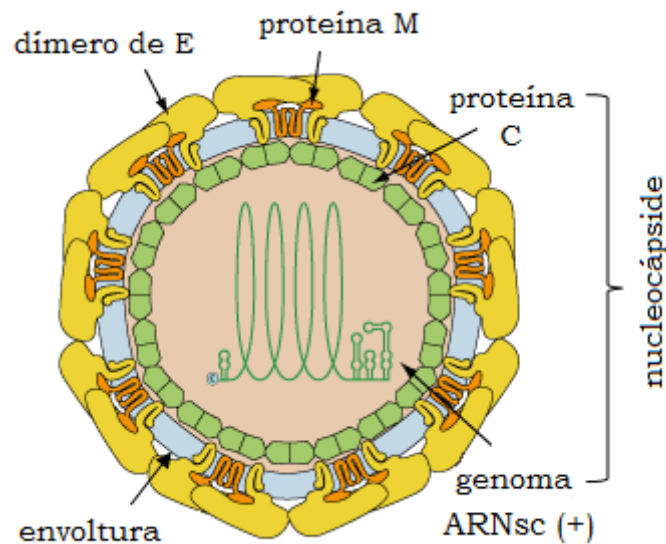
## 2. *El agente etiológico*

DENV forma parte de la familia *Flaviviridae*, históricamente dividida en tres géneros *Flavivirus*, *Hepacivirus* y *Pestivirus* que presentan muchas similitudes en morfología, organización genómica y estrategias de replicación (Lindenbach & Rice, 2001). Recientemente se agregó a la clasificación un nuevo género denominado *Pegivirus* (Stapleton *et al.*, 2011). Entre los miembros más representativos de cada género se encuentran el virus de la fiebre amarilla (YFV) (flavivirus), el virus hepatitis C (HCV) (hepacivirus), el virus de la diarrea viral bovina (DBBV) (pestivirus) y el virus GB tipo C (GBV-C), anteriormente llamado como virus de la hepatitis G (HVG) (pegivirus).

DENV pertenece al género *Flavivirus*, constituido por alrededor de 80 virus transmitidos por artrópodos, principalmente mosquitos y garrapatas, muchos de los cuales son de interés médico por ser agentes causantes de fiebres hemorrágicas y encefalitis humanas. Entre los flavivirus de importancia sanitaria, además de DENV y YFV, cabe mencionar el virus del Nilo Occidental (WNV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus de la encefalitis de St. Louis (SLEV), el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBVE) y el virus Zika, entre otros (Lindenbach & Rice, 2001).

### 3. Características estructurales del virión

Como se muestra en la figura I.2, el virión de DENV tiene un genoma ARN de simple cadena y polaridad positiva que interactúa con la proteína de cápside C conformando la nucleocápside viral. Por fuera, la envoltura está constituida por una bicapa lipídica en la que se encuentran inmersas 180 copias de la glicoproteína de envoltura E y 180 copias de la proteína de membrana M. En conjunto, la estructura tiene un diámetro aproximado de 50 nm (Zhang *et al.*, 2007).

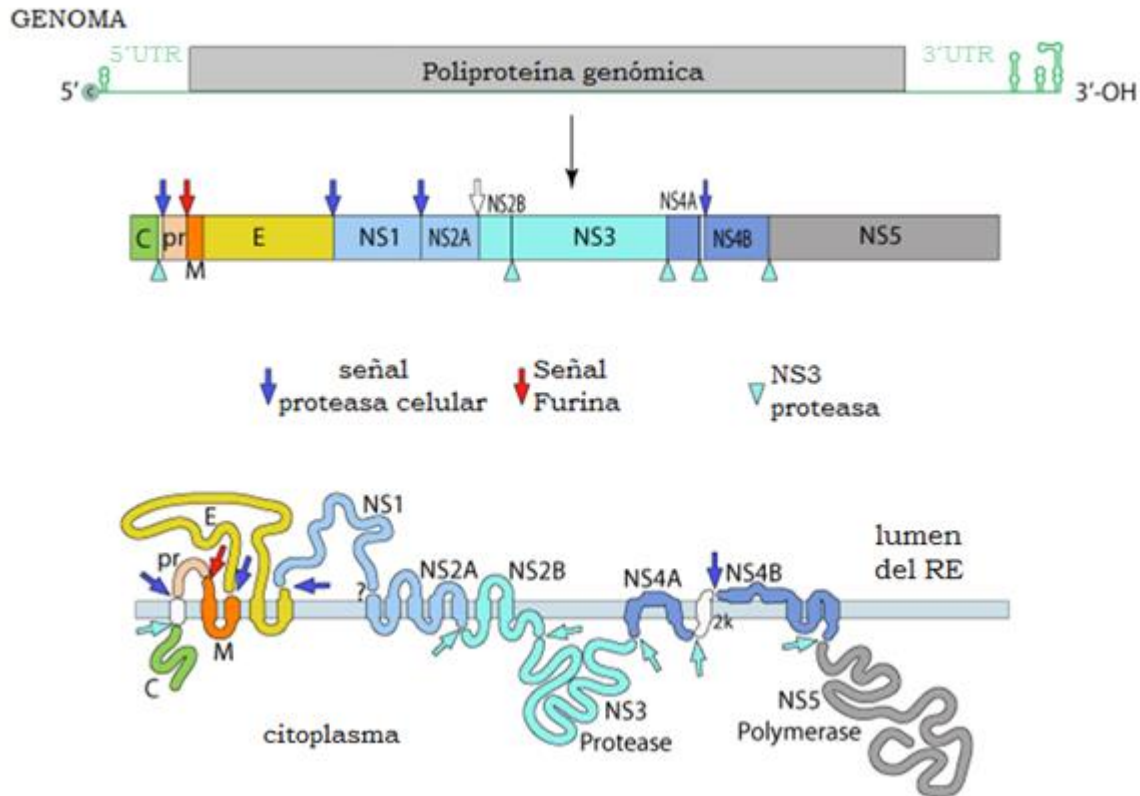


**Figura I.2: Estructura del virión de DENV.** Esquema de la partícula viral en el que se señalan los componentes estructurales. Modificado de ViralZone 2016, Swiss Institute of Bioinformatics

#### 3.1 El genoma de DENV

El genoma viral es una molécula de ARN de aproximadamente 10,7 kb con un *cap* de tipo I en el extremo 5' y sin cola de poliA en el extremo 3'. Posee un único marco de lectura que codifica para una poliproteína que es procesada por proteasas virales y celulares dando lugar a 10 proteínas virales, 3 de las cuales son estructurales (C, E y PrM) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). A su vez, en los extremos 5' y 3' se encuentran las regiones no codificantes denominadas 5'UTR (100 nucleótidos) y 3'UTR (450 nucleótidos), respectivamente, que cumplen

importantes funciones regulatorias en la traducción y en la replicación viral a través de sus secuencias y de sus estructuras secundarias (Figura I.3).



**Figura I.3: La traducción del genoma de DENV en la poliproteína y el clivaje proteico.** Se señalan la ubicación de las secuencias consenso para el clivado proteolítico por proteasas de la célula hospedadora y los sitios de corte por NS3, la proteasa de DENV. En la parte inferior se observan los dominios transmembrana de la poliproteína y la localización de las proteínas virales posterior a la proteólisis.

La región 5'UTR contiene dos estructuras secundarias: SLA, que tiene un rol de trans-activación sobre el 3'UTR para la replicación viral (Filomatori *et al.*, 2011), y SLB, que está involucrada en la circularización del genoma. La región 3'UTR está muy estructurada y dividida en tres dominios: DI, muy variable entre serotipos, DII, moderadamente conservado entre los cuatro serotipos, y DIII, altamente conservado ya que presenta las estructuras denominadas CS1 y el 3' SL, esenciales para la replicación.

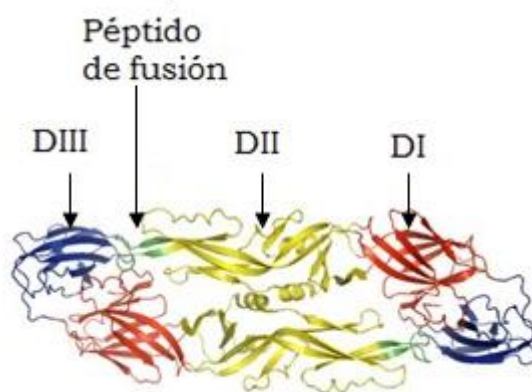
El genoma viral se circulariza durante la replicación viral (Hahn *et al.*, 1987) e incluso presenta un equilibrio entre su forma lineal y su forma circular que es importante

para la regulación de los procesos virales, ya que mutaciones que modifican el equilibrio afectan negativamente la replicación viral (Villordo *et al.*, 2010)

### 3.2 Las proteínas virales

#### 3.2.1 Las proteínas estructurales

La proteína C (11 kDa) tiene una alta afinidad por el ARN simple cadena y presenta actividad de chaperona de ARN (Pong *et al.*, 2011), por lo que múltiples copias de C se unen al genoma formando la nucleocápside (Zhang *et al.*, 2007). La proteína M (8 kDa) es un pequeño fragmento proteolítico de su forma precursora PrM (21 kDa) y tiene un importante rol regulador en la maduración de DENV durante la salida viral. La glicoproteína E (53 kDa) está involucrada en procesos esenciales del ciclo de multiplicación de DENV, ya que participa en la morfogénesis del virión, en la interacción con el receptor celular y es la responsable de la fusión de membranas que da a lugar al desnudamiento del virus.



**Figura I.4: Conformación estructural de los homodímeros de E y sus dominios:** DI en rojo, DII en amarillo con el péptido de fusión marcado en verde y DIII en azul. La imagen se preparó utilizando el programa PyMol Molecular Graphics System y fue modificada de Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010.

La glicoproteína E posee tres dominios estructurales, en el extremo amino terminal se encuentra el dominio central (DI), a un lado se encuentra el dominio de dimerización (DII) que posee el péptido de fusión, y por el otro el dominio de tipo inmunoglobulina llamado DIII, que interactuaría con el receptor celular (Modis *et al.*, 2004). En el virión maduro infectivo la glicoproteína E se agrupa en homodímeros orientados “cabeza con



cola” (Figura I.4) que yacen paralelos a la envoltura viral, estos homodímeros a su vez se agrupan en trímeros determinando en los viriones maduros una superficie lisa e icosaédrica. En los homodímeros, el péptido de fusión presente en DII queda oculto entre los dominios DI y DIII (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

### 3.2.ii *Las proteínas no estructurales (NS)*

NS1 (46 KDa) es una glicoproteína esencial para la replicación viral, colocaliza con ARN doble cadena en el lumen del retículo endoplásmico de células de mamífero y de insecto (Mackenzie, 1996). Es también importante para la patogenia viral, ya que es secretada y se encuentra en alta concentración en sangre de pacientes con dengue grave, se ha probado que produce daño *in vivo* en las células endoteliales y que contribuye a activar el complemento, alterar la hemostasia y al daño hepático (Halstead & Cohen, 2015).

NS2A (22 KDa) es una proteína integral de membrana que también es esencial para la replicación viral y en la producción de partículas virales infecciosas (Xie *et al.*, 2013). Se ha propuesto que participa en la formación de los compartimentos membranosos de replicación (Leung *et al.*, 2008) y en el bloqueo de la señal de interferón (IFN) (Rhodenuis *et al.*, 2010)

NS2B (14 KDa) es una proteína asociada a membrana que recluta a la membrana del retículo a NS3 y al interactuar con la misma presenta actividad de cofactor de actividad de proteasa de NS3, ya que aumenta su actividad.

NS3 (69 KDa) es una proteína multifuncional, ya que presenta en su dominio N-terminal actividad de proteasa, en su dominio C-terminal actividad de NTPasa y actividad de helicasa (Acosta *et al.*, 2014a).

NS4A (16 KDa) es también una proteína integral de membrana que colocaliza con NS3 y ARN de doble cadena viral, por lo que presumiblemente forme parte de los complejos de replicación. Esta proteína puede inducir curvatura de membrana (Miller *et al.*, 2007).

NS4B (30 KDa) interactúa con el dominio helicasa de la proteína NS3 aumentando su actividad y disminuyendo su afinidad por el ARN simple cadena (Umareddy, 2006), también inhibe la cadena de transducción de señales de IFN (Rodenhuis-Zybert et al., 2010b).

NS5 (105 KDa) es la proteína viral más conservada, tiene actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN en el extremo C-terminal y de metiltransferasa, agregando el cap en el extremo 5' del genoma viral en el N-terminal (Kroschenwski, 2008, Davidson, 2009). La RNA polimerasa de DENV tiene la clásica estructura de mano derecha ahuecada ("cupped right hand"), con los dominios de palma, dedos y pulgar (Malet et al., 2007; Yap et al., 2007) que se encuentra ampliamente representado en las polimerasas de los flavivirus.

#### 4. *El ciclo de multiplicación de DENV*

El conocimiento del ciclo de multiplicación viral es un punto de partida indispensable para el hallazgo de potenciales blancos para agentes terapéuticos. En la figura 1.5 puede observarse un esquema del ciclo de multiplicación de DENV, que comprende una serie extensa de interacciones entre el virus y la célula hospedadora. Comienza con la adsorción viral por interacción de la glicoproteína E con al menos un receptor celular, seguida de la internalización de los viriones a través de un mecanismo de endocitosis mediada por receptor. El ambiente ácido de los endosomas dispara la actividad fusogénica de E, permitiendo la fusión de la membrana endosomal y la envoltura viral, con la liberación de la nucleocápside al citoplasma y el desnudamiento del genoma viral.

El genoma viral es traducido generando una poliproteína que está inmersa en la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER), dicha poliproteína es procesada por proteasas celulares y virales. La liberación de NS5, la polimerasa viral, permite la replicación del genoma viral mediada por un ARN de polaridad negativa intermediario, que sirve de templado para la producción de numerosas copias de genoma. Esta replicación ocurre en vesículas membranosas formadas por invaginaciones del RER inducidas por el virus (Welsch et al., 2009).

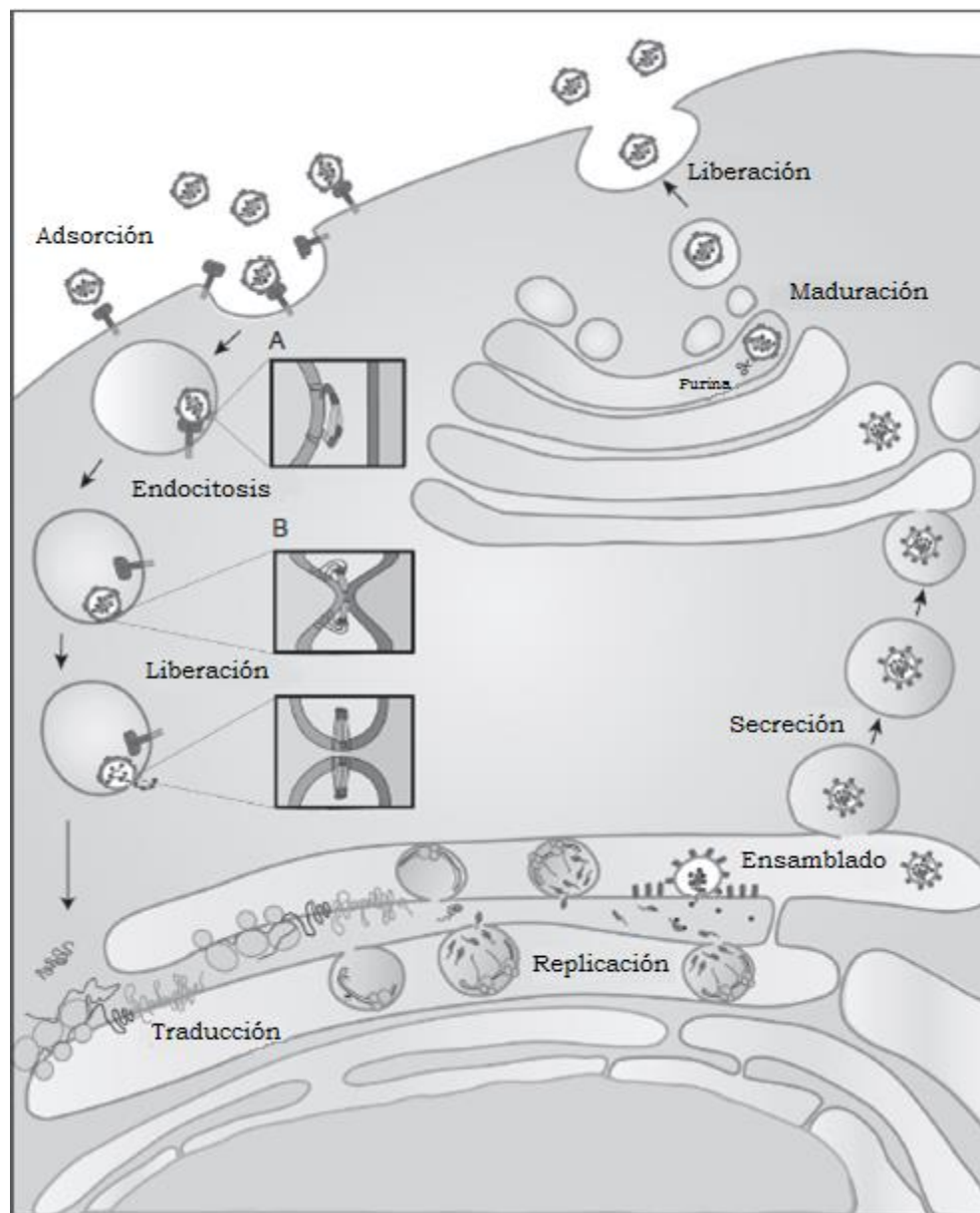
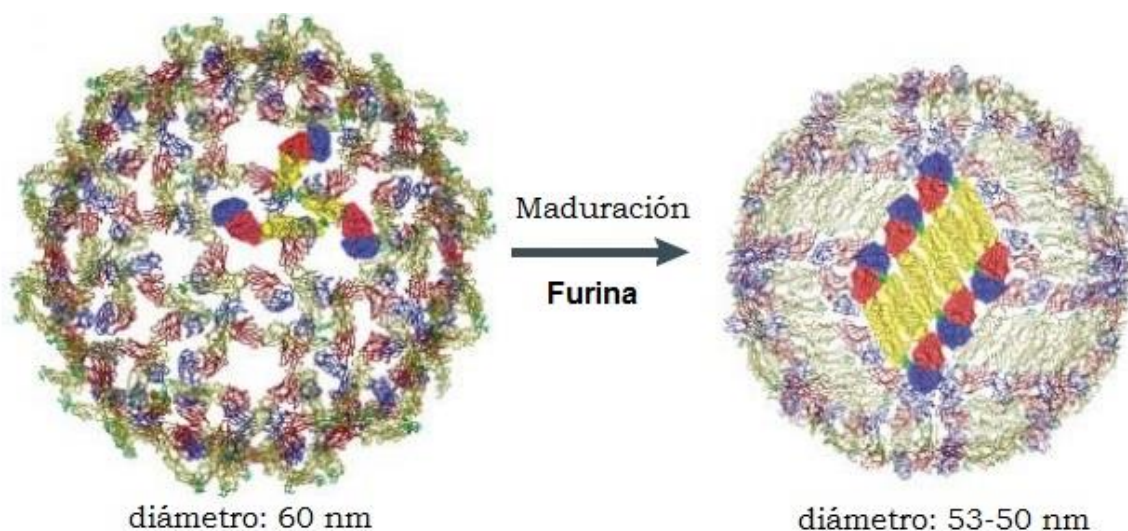


Figura I.5: El ciclo de multiplicación de DENV. Esquema modificado de Acosta *et al.*, 2014a.

Finalmente, transcurren las etapas finales de ensamblaje y liberación de la progenie viral. El ensamblaje acontece en la proximidad de las “vesículas de replicación” y consiste en la interacción de numerosas copias de la proteína C con el ARN viral, formando la nucleocápside, que luego se envuelve en microdominios ricos en E y prM de

la membrana del RER para culminar con la brotación de partículas virales inmaduras hacia el interior del lumen del RER. En las partículas inmaduras, cuyo diámetro es de 60 nm y carecen de infectividad (Zhang *et al.*, 2003) la envoltura está formada por trímeros de un heterodímero prM-E que conforman 60 espículas que cubren y ocultan el péptido de fusión presente en E (panel izquierdo Figura I.6). Estas partículas son transportadas por la ruta secretoria de vesículas exocíticas celulares, hasta alcanzar el trans-Golgi donde se encuentra la furina, proteasa celular que corta el péptido pr de la proteína M. Finalmente la liberación de los viriones es por exocitosis (Perera & Kuhn, 2008), donde culmina la maduración de las partículas por la liberación de los fragmentos de pr que aún después de haber sido clivados continuaban en estrecha relación con E, protegiendo al péptido fusogénico de una actividad prematura durante el tránsito por los compartimentos ácidos, dicha interacción se debilita con el aumento de pH que ocurre al alcanzar el medio extracelular, adquiriendo finalmente la partícula viral su condición de infectiva con un diámetro de 50-53 nm (panel derecho Figura I.6) (Kuhn *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2008).



**Figura I.6: Proceso de maduración de los viriones de DENV.** Características estructurales de los viriones inmaduros y maduros de DENV. Modelo editado a partir de Mukhopadhyay *et al.*, 2005.

Por otro lado, ha sido propuesto que tanto el ensamblado como la liberación de DENV es dependiente de actina, basado en que compuestos que modulan la polimerización de la actina reducen los títulos virales y en evidencias de interacción entre E y actina. También juegan un rol importante en ambos procesos los *lipid droplets* (LD), se ha observado una fracción de proteína de cápside asociada con LD en células

infectadas (Acosta *et al.*, 2014a). Ha sido propuesto que estas organelas podrían servir para secuestrar a C evitando así una inhibición de la replicación del genoma o como andamiaje para el ensamblaje de las nucleocápsides virales (Samsa *et al.*, 2009).

#### 4.1. *Receptores de DENV*

Una gran variedad de moléculas celulares han sido reportadas como posibles receptores de DENV, desde proteínas de membrana, lectinas, carbohidratos e incluso lípidos celulares (Acosta *et al.*, 2014a). Un extenso cuerpo de evidencias avala la importancia del heparán sulfato (HS) y de las lectinas tipo C, particularmente DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) como receptores primarios de DENV.

HS es un miembro de la familia de los glucosaminoglicanos sulfatados compuesto por unidades repetitivas de disacáridos conteniendo ácido urónico o ácido L-idurónico y glucosaminas O-sulfatadas que se asocian a proteínas para formar los HS proteoglicanos (HSPG). Los HSPG están presentes en gran abundancia en las células de mamífero, tienen una carga neta negativa, conferida por los grupos sulfato, que posibilitan la interacción electrostática con grupos de aminoácidos básicos presentes en la glicoproteína E. Esta interacción no es inespecífica ya que E requiere formas muy sulfatadas de HS para unirse y en el extremo C-terminal de E se identificaron posibles motivos de unión a HS (Chen *et al.*, 1997).

DC-SIGN es una molécula muy abundante en las células del sistema inmune, importantes en la infección natural de DENV, que presenta un dominio de reconocimiento de carbohidratos que interactúa con las cadenas de oligosacáridos presentes en E. Se ha demostrado que DC-SIGN permite la adsorción de los cuatro serotipos de DENV, pero que no es necesario para la internalización viral (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Tassaneetrithep *et al.*, 2003; Lozach *et al.*, 2005).

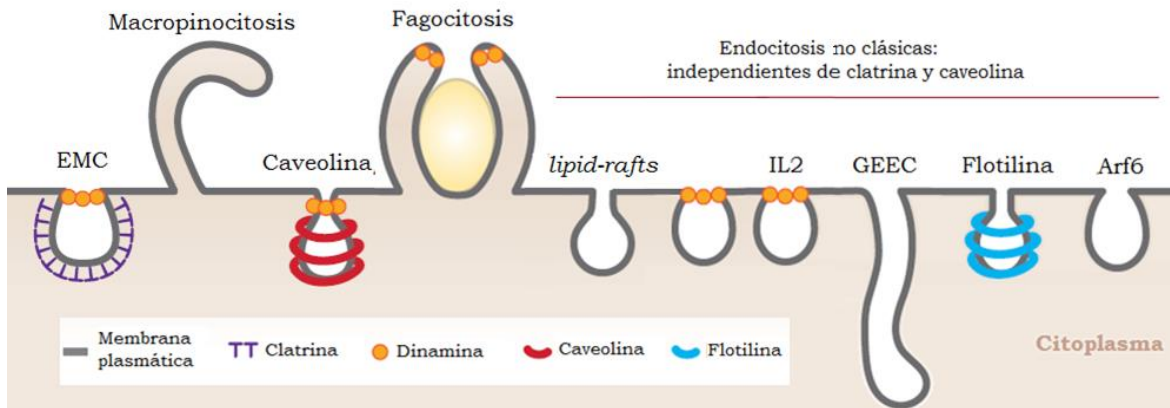
También se han propuesto como receptores de DENV en células de mamífero las proteínas de shock térmico HSP70 y HSP90 (Reyes del Valle *et al.*, 2005), GRP78 (Jindadamrongwech *et al.*, 2004), TIM/TAM que son familias de receptores transmembrana que se unen a fosfatidilserina (Meertens *et al.*, 2012), proteínas asociadas

a CD14 en macrófagos (Chen *et al.*, 1999) y el receptor de manosa (Miller *et al.*, 2008), entre otros. En células de mosquito también se han detectado varias moléculas con capacidad de unirse a DENV, como una proteína de 48 kDa similar a tubulina, prohibitina, el receptor de laminina, glicosfingolípidos y otras proteínas desconocidas de las que sólo se determinó su peso molecular (Castilla *et al.*, 2015).

Dada la diversidad de receptores descritos, se ha postulado que la entrada de DENV fuera un proceso que involucra varios pasos, consistente en interacciones secuenciales con un receptor primario, como HSPG, DC-SIGN o TIM/TAM, que permite unir y concentrar el virus en la superficie celular, y así aumentar la posibilidad de unión a un receptor secundario de alta afinidad (Castilla *et al.*, 2015). Podría ser también que DENV utilice diferentes receptores o co-receptores dependiendo del serotipo y de la célula blanco (Acosta *et al.*, 2014a).

#### 4.2. *La internalización viral*

Luego de la adsorción ocurre la internalización de la partícula viral, que en el caso de los virus envueltos implica la fusión de membranas a nivel de membrana plasmática o en compartimentos subcelulares luego de entrar a la célula por endocitosis. Al respecto, la endocitosis celular representa una interesante ruta de entrada para la infección viral ya que ofrece ventajas para establecer la infección productiva, como ser el ocultamiento frente al sistema inmune por no dejar en la membrana plasmática epitopes virales y el aprovechamiento del tránsito vesicular endosomal para alcanzar el sitio de replicación propicio del virus (Lozach *et al.*, 2011). Las células de mamífero presentan una amplia diversidad de mecanismos endocíticos. Las vías mejor caracterizadas son la endocitosis mediada por clatrina, la endocitosis dependiente de caveolas/*lipid-rafts* y la macropinocitosis, por otro lado existen vías menos caracterizadas llamadas vías independientes de clatrina y de caveolina, que pueden depender de dinamina, del receptor de IL-2, de GEEC (*GPI-anchored-protein enriched endosomal compartment*), del factor de flotilina, y de Arf6 (factor de ADP-ribosilación 6) (Figura I.7) (Mercer *et al.*, 2010). Varias de ellas son utilizadas por los virus para ingresar a la célula, otras aún no se han detectado como rutas de entrada de virus.



**Figura 1.7: Mecanismos endocíticos de células de mamífero.** IL2: interleuquina 2; GEEC: GPI-anchored-protein enriched endosomal compartment; Arf6: factor de ADP-ribosilación 6. Esquema modificado de Mercer *et al.*, 2010.

Los primeros trabajos sobre la entrada de DENV propusieron que la internalización de los viriones era por fusión directa con la membrana plasmática en base a imágenes de microscopía electrónica de células de mosquito C6/36, monocitos de sangre periférica humana y células BHK-21 (Hase *et al.*, 1989; Lim & Ng, 1999). Sin embargo, estudios posteriores indicaron que para lograr establecer la infección DENV requiere transitar por compartimentos ácidos como las vesículas endosomales. La primera evidencia fue la capacidad de DENV de inducir la formación de sincicios a pH ácido en células de mosquito (Randolph & Stollar, 1990). Luego se publicaron una serie de trabajos que confirman la dependencia de pH en la entrada de DENV mediante la implementación de distintos acercamientos metodológicos. El primero de ellos utilizó la técnica de seguimiento en tiempo real de una partícula de DENV marcada fluorescentemente en células BSC-1 y se concluyó que la fusión de membranas es estrictamente dependiente de la exposición del virus a pH ácido, que ocurre en la mayoría de los casos en la zona perinuclear y en menor medida en vesículas localizadas en la periferia celular (van der Schaar *et al.*, 2007). En otro trabajo mediante la utilización de un pseudotipo de retrovirus conteniendo las proteínas prM y E se corroboró el requerimiento de exposición a pH ácido para la entrada de DENV en células Huh7 (Hu *et al.*, 2007). Finalmente, hay reportes que documentan que el aumento de pH de los endosomas celulares por acción de agentes lisosomotrópicos inhibe fuertemente la entrada de DENV en distintas clases de células (Krishnan *et al.*, 2007; Acosta *et al.*, 2008; 2011; Mosso *et al.*, 2008). Estos resultados concuerdan con los estudios sobre la propiedad de la proteína E de exponer el péptido de

fusión a partir de cambios conformacionales irreversibles inducidos por la exposición a pH ácido. E posee un tracto de histidinas que funcionan como sensores de pH (Zhang *et al.*, 2013): en medio ácido, las histidinas se protonan, los dímeros de E se disocian y se exponen los péptidos de fusión que se insertan en la membrana endosomal y dan a lugar a la fusión de membranas por un mecanismo de clase II (Kuhn *et al.*, 2002).

Respecto de la vía de endocitosis para el ingreso a la célula, la mayoría de las infecciones con virus animales ocurre por la ruta de clatrina, tal como se ha descrito para el virus de Semliki Forest, Influenza A, virus de estomatitis vesicular, adenovirus 2 y 5, virus de la fiebre aftosa y rinovirus humano 2 (Cossart & Helenius, 2014). La endocitosis dependiente de clatrina es un mecanismo de internalización de ligando mediado por receptor que se produce constitutivamente en la mayoría de las células de mamíferos. En el proceso participan la proteína clatrina junto con proteínas adaptadoras como AP-2, AP180 y Eps15 y otros factores implicados en la selección de la carga (Schelhaas, 2010). Las vesículas recubiertas de clatrina son escindidas de la membrana plasmática por medio de la actividad GTPasa de la dinamina, luego de este acontecimiento se disocia la jaula de clatrina y la vesícula cargada se une con los endosomas.

En el caso de los flavivirus, la endocitosis mediada por clatrina ha sido reportada como vía de entrada a la célula para HCV (Blanchard *et al.*, 2006), WNV (Chu & Ng, 2004) y JEV (Nawa *et al.*, 2003). Respecto de DENV, se ha corroborado por distintas técnicas bioquímicas, moleculares y de microscopía que los cuatro serotipos utilizan la vía de clatrina para ingresar a células de mosquito (Acosta *et al.*, 2008-2011; Mosso *et al.*, 2008). En células de mamífero, se ha reportado que la entrada de DENV-2 es dependiente de clatrina en células BSC-1 (van der Schaar *et al.*, 2008), HeLa (Krishnan *et al.*, 2007), HepG2 (Alhoot *et al.*, 2012), A549 (Acosta *et al.*, 2009), ECV304 (Peng *et al.*, 2009) y en monocitos humanos (Alhoot *et al.*, 2011). La infección por los cuatro serotipos de DENV es inhibida por el silenciamiento génico de la vía de clatrina en células hepáticas Huh7 (Ang *et al.*, 2010).

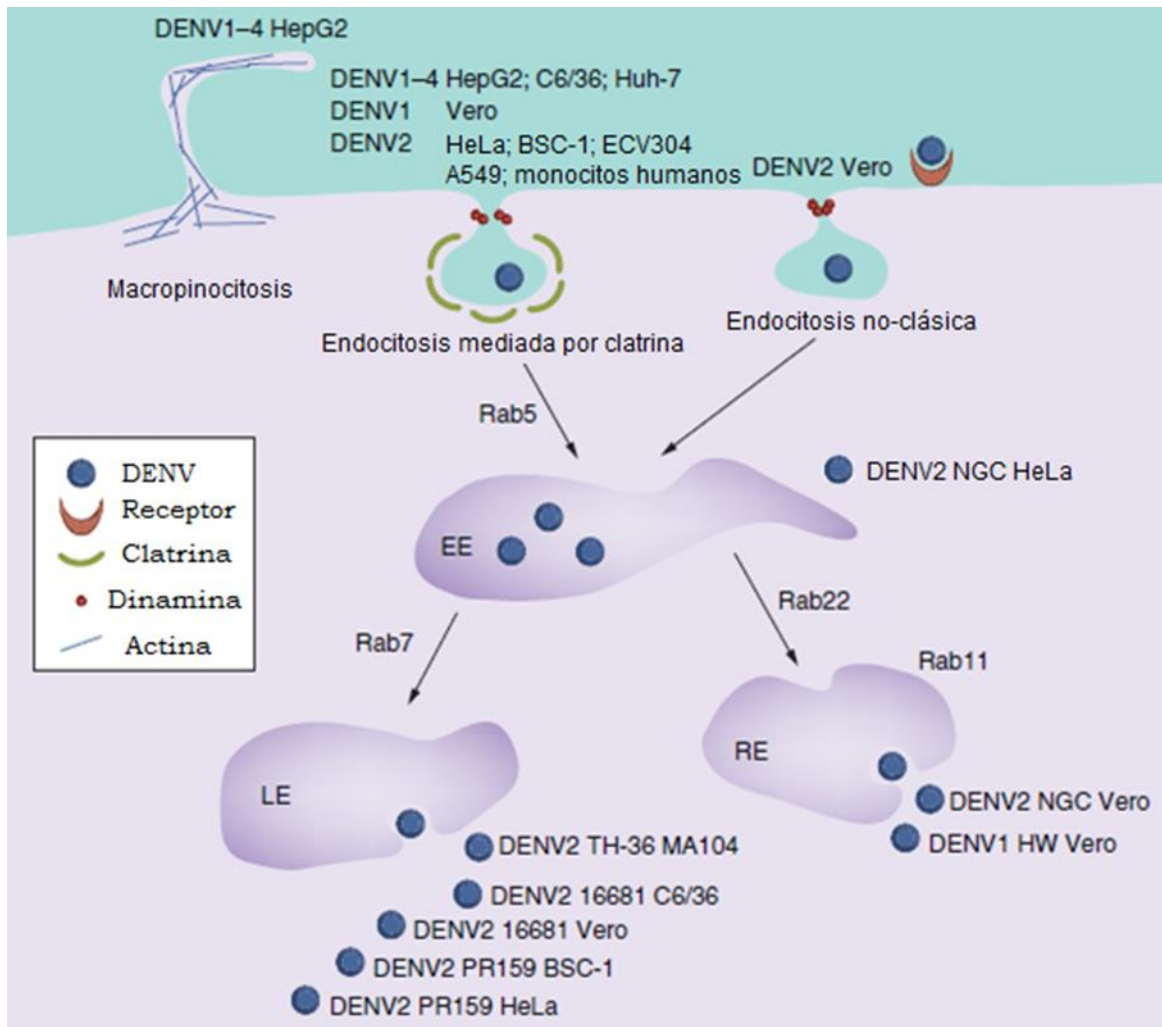
Una respuesta diferente y llamativa se encontró al estudiar la internalización en células Vero, donde DENV-1 utiliza también la ruta de clatrina, pero DENV-2 ingresa por una vía endocítica no clásica independiente de la participación de vesículas recubiertas de clatrina o de caveolas y dependiente de dinamina. Estos hallazgos demostraron por



primera vez un mecanismo diferencial para la entrada infectiva de dos serotipos en un mismo tipo celular (la línea celular Vero), como asimismo rutas de entrada alternativas para DENV-2 según la célula hospedadora (Acosta *et al.*, 2008; 2009; 2011). En concordancia con la multiplicidad de estrategias de entrada que parece presentar DENV, también se ha publicado el posible uso de más de una vía de entrada, endocitosis dependiente de clatrina y macropinocitosis, para los cuatro serotipos de DENV en células HepG2 (Suksanpaisan *et al.*, 2009). Asimismo, estudios recientes con JEV mostraron que este flavivirus ingresa por la ruta de clatrina a células Vero, pero utiliza una vía no clásica, independiente de clatrina para infectar células neuronales (Zhu *et al.*, 2012; Kalia *et al.*, 2013). Cabe acotar que también se ha demostrado con otros virus el uso de vías alternativas de entrada en los mismos o diferentes tipos de células (Sieczkarski & Whittaker, 2002; de Vries *et al.*, 2011; Aleksandrowicz, 2011; Bangphoomi *et al.*, 2014).

Una representación integradora de los diferentes mecanismos de internalización utilizados por los serotipos de DENV según la célula hospedadora puede observarse en la parte superior de la figura 1.8.

Dado que DENV es un virus envuelto y que su entrada involucra la fusión de membranas es altamente probable que los lípidos jueguen un rol importante más allá del propuesto como receptores o co-receptores antes detallado. El colesterol es un esteroide que afecta la fluidez de las membranas, por lo que ha sido ampliamente estudiada su influencia en la infección con resultados controversiales. La entrada de DENV resultó independiente de la composición de colesterol de las membranas celulares en células C6/36, Vero, A549, HepG2, ECV404, U937, K562 y Raji-DC-Sign (Acosta *et al.*, 2008; 2009; 2011; Mosso *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009; Suksanpaisan *et al.*, 2009; Carro *et al.*, 2013), pero en monocitos humanos y en células de neuroblastoma de ratón N18 se reportó dependencia de colesterol para la infección (Reyes del Valle *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008). La mayoría de estos trabajos se basan en tratamientos con los compuestos nistatina, metil- $\beta$ -ciclodextrina y filipina que interactúan con el colesterol secuestrándolo o formando agregados con el mismo dentro de las membranas lipídicas. Por otro lado, la ausencia de dependencia de colesterol celular también se corroboró utilizando otro método de depleción de colesterol, por pasajes seriados de DENV-1 y DENV-2 en células de mosquito C6/36 en un medio con suero deslipidado (Umashankar *et al.*, 2008).



**Figura I.8: Rutas de internalización y el tránsito intracelular de DENV.** Vías endocíticas utilizadas por diferentes combinaciones de cepa/serotipo de DENV-célula hospedadora para la infección productiva de la célula según los reportes bibliográficos. Modificado de Castilla *et al.*, 2015.

#### 4.3. *El tránsito intracelular y el desnudamiento viral*

Una vez que los viriones son internalizados llegan a una localización subcelular determinada donde ocurre el desnudamiento. El mecanismo de penetración y desnudamiento de los flavivirus ha sido poco estudiado y presenta resultados controversiales, la mayoría de los reportes nuevamente fueron realizados principalmente con el serotipo DENV-2, con poca o nula información sobre los restantes serotipos.

La partícula viral internalizada es transportada a través del sistema endosomal hasta llegar al sitio específico donde se produce la fusión entre la envoltura del virión y la

membrana endosomal, para lograr la salida de la nucleocápside al citoplasma. El sistema endosomal está compuesto por diferentes compartimentos vesiculares, cada uno con su pH característico y proteínas marcadoras Rab GTPasas, que son reguladores maestros y contribuyen a la identidad estructural y funcional de las membranas intracelulares (Wandinger-Ness y Zerial, 2014). Las proteínas Rab4, Rab5 y Rab15 están presentes en los endosomas tempranos (EE) aunque no exclusivamente. Rab5 participa en la carga de las vesículas recubiertas de clatrina y la posterior fusión con los EE. (Rodman y Wandinger-Ness, 2000). Por otra parte, los EE también son llamados endosomas de clasificación porque pueden entregar las moléculas de carga a diferentes destinos: continuar por la ruta degradativa o enviarlas a la vía de reciclaje. Existen dos rutas de reciclaje que se inician en microdominios de los EE ricos en Rab 4, una de ellas es una vía directa a la membrana plasmática, y la otra se llama ruta de reciclaje lenta en la que interviene Rab22 y los endosomas de reciclaje perinuclear (RE) ricos en Rab11. En cambio, la vía de degradación implica la participación de Rab7 en la progresión de EE a endosomas tardíos (LE) y finalmente a los lisosomas (Stein, 2003). Según en cuales de estos compartimentos subcelulares ocurre el desnudamiento viral se determina el tiempo de fusión medio de los virus, un parámetro que permite caracterizarlos en virus de penetración temprana, con tiempos de penetración inferiores a los 5 min, cuando la fusión ocurre en los EE, o de penetración tardía, cuyo tiempo de fusión varía entre 10-15 min hasta algunas horas, cuando ocurre en los RE o LE (Lozach *et al.*, 2011).

El primer estudio sobre la vía de penetración seguida por DENV-2 y WNV fue llevado a cabo por Krishnan *et al.* (2007), quienes determinaron que se requiere Rab5 pero no Rab7 para la entrada a las células HeLa utilizando ARN de interferencia y dominantes negativos de las proteínas Rabs, por lo que concluyeron que ambos virus requieren el transporte a EE pero no a LE. Sin embargo, todos los estudios posteriores mostraron que DENV-2 puede ser clasificado como virus de penetración tardía, de hecho, aunque el umbral de pH de la glicoproteína E de DENV se corresponde con el pH de los EE, esta proteína dispone de un mecanismo de retardo de la actividad de fusión por la necesidad de interactuar con lípidos aniónicos presentes en las membranas de los LE, esta interacción provoca el avance desde los primeros intermediarios de hemifusión a la apertura del poro de fusión (Zaitseva *et al.*, 2010). La pertenencia a esta clasificación es apoyada por varios trabajos que documentan que la fusión de las partículas de DENV-1 y DENV-2 se produce entre 10 y 17 min después de la infección mediante diferentes

enfoques metodológicos, como el seguimiento de una única partícula viral fluorescente (van der Schaar *et al.*, 2007; Zaitseva *et al.*, 2010), el análisis del tiempo de penetración de DENV de acuerdo con el tiempo requerido para llegar a ser resistentes al agente lisosomotrópico cloruro de amonio y por el seguimiento de la proteína C del inóculo viral por inmunofluorescencia (Acosta *et al.*, 2012) y también por ensayos de colocalización de los marcadores de EE y LE con las partículas de DENV (Mosso *et al.*, 2008, Ang *et al.*, 2010, Shrivastava, 2011).

Asimismo, ensayos con versiones salvajes y mutantes dominantes negativas de las distintas Rab GTPasas marcadoras de EE, LE y RE y con técnicas de colocalización confirmaron la diversidad de posibilidades de tránsito intracelular hasta la fusión de membranas y desnudamiento en la entrada de DENV-2. Estos estudios realizados con diferentes cepas de DENV-2 han permitido concluir que el requerimiento de LE o RE como sitio para la fusión y penetración de este serotipo en la infección productiva es variable según el tipo de célula y la cepa viral (Van der Schaar *et al.*, 2008; Mosso *et al.*, 2008; Acosta *et al.*, 2012), como se detalla en la Figura I.8. También se ha analizado el tránsito intracelular de una cepa de DENV-1 en células Vero, no hay estudios con los restantes serotipos DENV-3 y DENV-4.

## 5. *La infección mediada por anticuerpos*

En 1954 Quintos *et al.* describieron 21 casos de una enfermedad hemorrágica y febril grave en niños filipinos que, siguiendo la historia de investigación realizada, puede en retrospectiva tomarse como la primera publicación sobre casos de dengue grave. En la década del 60 la llamada “fiebre hemorrágica Thai” presentaba una tasa de mortalidad del 24 % en niños autóctonos, pero la infección por el mismo virus en residentes extranjeros, mayormente adultos, progresaba en la clásica fiebre de dengue. Fuertes interrogantes se alzaron y llevaron al trabajo concertado de varios investigadores, quienes definieron por vez primera el cuadro clínico asociado al síndrome de shock por dengue. Ellos notaron que de 196 pacientes en shock, 186 estaban cursando una infección secundaria por DENV y que los 10 que presentaban infección primaria eran infantes menores de un año cuyas madres poseían inmunidad frente a DENV, por lo que plantearon como factor de riesgo a alguna clase de respuesta de Ac secundaria (Halstead & Cohen, 2015). En la

actualidad, aunque no está fehacientemente probado, tiene aceptación en la comunidad científica la hipótesis del incremento mediado por Ac o ADE (del inglés *antibody-dependent enhancement*) como mecanismo explicativo a los datos clínicos relatados, planteando que existe una infección aumentada cuando DENV es opsonizado por Ac subneutralizantes. Justamente, se considera ilustrativa del fenómeno de ADE en medicina humana la alta tasa de infantes menores de un año que desarrollan la afección grave cursando una infección primaria por DENV cuando los Ac policlonales anti-DENV maternos tienen un nivel menor que el protectorio (Halstead, 2014).

El primer reporte de ADE *in vitro* se realizó con el virus de la encefalitis del valle de Murray (MVEV) en monocapas de fibroblastos embrionarios de pollo cuando la infección se realizó con una preincubación con diluciones de antisuero de pollo frente a la infección control en ausencia de antisuero (Hawkes, 1964). Los fundamentos de estos resultados se obtuvieron cuando se detectó la infección aumentada de DENV en cultivos de células mononucleares de sangre periférica proveniente de primates inmunizados con el virus en comparación con animales no inmunizados. Estudios posteriores permitieron atribuir este fenómeno a la infección aumentada de DENV en monocitos y macrófagos en presencia de Ac subneutralizantes (revisado en Halstead, 2014).

Estudios clínicos han documentado que la infección primaria tiene un periodo refractario de aproximadamente tres meses en los cuales hay protección frente a una infección secundaria heteróloga. Más aún, también se registró que la frecuencia y gravedad del dengue grave aumenta a medida que se extiende el periodo de tiempo transcurrido entre la primera y segunda infección por diferentes serotipos de DENV (Halstead, 2014). ¿Cómo se explica no sólo la existencia de Ac subneutralizantes, sino que pareciera ser que a medida que transcurre el tiempo sería mayor la probabilidad que los Ac de memoria anti-DENV funcionen de manera subneutralizante? Existe un fuerte consenso en la comunidad científica sobre que los flavivirus poseen un mecanismo de neutralización de impactos múltiples, es decir la neutralización ocurre solamente cuando un virión es reconocido y se une a un Ac en una estequiometría tal que supere un umbral (Down & Pierson, 2011). Por lo tanto, los acontecimientos clínicos podrían explicarse por la disminución del título de los Ac DENV.

Por otro lado, hay estudios sobre ADE realizados con Ac específicos contra la glicoproteína E que documentan que la partícula viral opsonizada con ocupancia

incompleta, definida como el número de epitopes “ocupados” por el Ac, o sea menor a la necesaria para superar el umbral de neutralización, tendría facilitada la entrada mediante los receptores de la porción Fc de los Ac (FcR) que poseen macrófagos, monocitos y células dendríticas (Dowd & Pierson, 2011). Incluso, más aún a favor de esta hipótesis, se describió cómo partículas no infectivas de DENV por ser inmaduras pueden adquirir capacidad de infectar células al unirse a Ac anti prM presentes en el suero de pacientes infectados (Cardosa *et al.*, 2002; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010a). Este último hallazgo tiene importantes implicancias en el entendimiento de la patogénesis, ya que se sabe que una alta proporción de los viriones de DENV exocitados son inmaduros y se creía que no participaban en la patogenia viral por ser partículas no infectivas. Sin embargo, los Ac anti-prM tienen reactividad cruzada contra todos los serotipos y generalmente tienen una bajísima capacidad neutralizante, propiciando fuertemente el fenómeno de ADE (Halstead, 2014).

Los receptores de la porción Fc de los Ac involucrados en este fenómeno son los denominados gamma por unir inmunoglobulinas (Ig) de tipo G involucradas en las respuestas inmunes de memoria. Los FcγR son los más importantes en el proceso de fagocitosis de patógenos opsonizados. Se clasifican en varios tipos que difieren en su afinidad por las IgG, por ejemplo FcγRI presenta una mayor afinidad que FcγRIIA y FcγRIII.

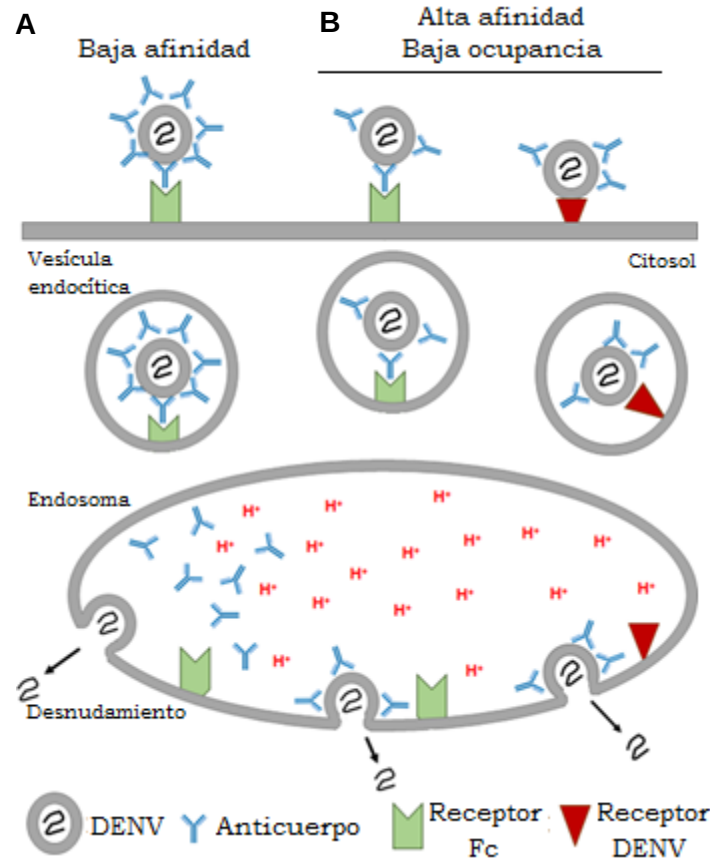
En cuanto a la internalización de los complejos inmunes de DENV se determinó que están involucrados los receptores FcγRI y FcγRIIA (Kontny *et al.*, 1988; Littaua *et al.*, 1990) y que la internalización de dichos complejos a través de FcγRIIA es más eficaz que por FcγRI, a pesar de que la unión a ambos receptores activa de manera similar vías de señalización celular que inducen la fagocitosis mediada por receptor. Una posible explicación para esta observación sería que los distintos FcγR determinaran diferentes vías de tránsito intracelular y que la interacción de los complejos inmunes de DENV con FcγRIIA llevaría al virus a un compartimento endosomal más favorable para la fusión de membranas (van der Schaar *et al.*, 2009). En particular se determinó que el receptor humano FcγRI media la entrada de los complejos inmunes vía fagocitosis a diferencia de FcγRIIA que media tanto la entrada por fagocitosis como el llamado ADE intrínseco, el cual hace referencia a un fenómeno inmunopatológico que involucra, frente a la infección por estos complejos inmunes de DENV, la supresión de los sistemas antivirales innatos en monocitos o macrófagos, derivando en un aumento logarítmico de la multiplicación

intracelular de DENV, más allá del clásico aumento de la infectividad conocido como ADE extrínseco (Rodrigo *et al.*, 2006; Halstead, 2014).

Una vez formados los complejos inmunes de DENV la internalización puede ser por el propio receptor de DENV si la ocupancia del Ac es baja y deja disponible epitopes de E que interactúen con el o los receptores de DENV o mediada por FcγRI o FcγRIIA (van der Schaar *et al.*, 2009). Después de la internalización por fagocitosis mediada por los FcγR se desconoce el mecanismo por el cual los viriones escapan de la vía degradativa. En la figura 1.9 se detallan dos modelos explicativos de ese fenómeno: en un modelo la opsonización subneutralizante por un Ac anti DENV con baja ocupancia, dejaría libres glicoproteínas E que al no estar unidas a Ac sufren los rearrreglos que median la fusión de membranas al pasar por los compartimentos ácidos endosomales, y en otro modelo los Ac con baja afinidad se disocian del virus en el medio ácido endosomal, dejando libre al virión para proseguir con la infección (van der Schaar *et al.*, 2009).

## 6. *La entrada de DENV como blanco antiviral*

Como se mencionó, en la actualidad no hay quimioterapia antiviral específica contra DENV y sólo puede realizarse un tratamiento de apoyo para aliviar los síntomas del paciente. El desarrollo de agentes antivirales se intenta tanto a través del ataque dirigido a blancos virales como blancos celulares. Las drogas que afectan blancos virales garantizan mayor especificidad y selectividad, pero en tratamientos prolongados presentan el serio problema de la selección de variantes virales resistentes al fármaco. Por el contrario, los compuestos que afectan un componente celular esencial para el ciclo de multiplicación viral tienen menor riesgo de desarrollar resistencia y existe la posibilidad de obtener un agente con amplio espectro de acción antiviral contra virus no relacionados. Sin embargo, este abordaje requiere analizar cuidadosamente la citotoxicidad de los compuestos evaluados y su aplicación resulta más factible en infecciones virales agudas. Ambas estrategias se han aplicado en la búsqueda de agentes inhibidores de DENV (Noble *et al.*, 2010).



**Figura I.9: Modelos de los mecanismos posibles para la infección viral por ADE.** A. Los Ac con baja afinidad, independientemente de la ocupancia, se disocian de la partícula viral en el endosoma a pH ácido y dejan al virión libre para la fusión viral. B. Las partículas virales opsonizadas con alta afinidad a una baja ocupancia pueden ser internalizadas tanto por medio de un receptor viral como por un receptor de Fc, una vez en el endosoma, las moléculas de glicoproteína E libres (que no están interactuando con un Ac) pueden mediar la fusión de las membranas y alcanzar el citoplasma. Adaptado de van der Schaar, 2009.

La entrada del virus a la célula huésped se ha tornado en los últimos años una alternativa atractiva como nueva estrategia antiviral (Altmeyer, 2004). Este abordaje permite bloquear el ciclo de multiplicación viral en etapas tempranas limitando posiblemente la viremia y la hiperactivación del sistema inmune, lo que podría prevenir el progreso a dengue grave y la transmisión del virus, con la ventaja extra de que puede no ser requerido el ingreso de la droga a la célula (Castilla *et al.*, 2015). La acción antiviral se produce por bloqueo de las interacciones entre DENV y la célula hospedadora afectando la adsorción, internalización y/o fusión de membranas. Se han reportado diversos inhibidores de la unión inicial virus-célula que interactúan con el dominio de unión al receptor presente en DIII, como por ejemplo péptidos sintéticos (Alhoot *et al.*, 2013), Ac



monoclonales con capacidad terapéutica (Crill & Roehrig, 2001; Shresta *et al.*, 2010), lectinas que se unen a carbohidratos y bloquean la unión de E a DC-SIGN (Alen *et al.*, 2011) y el análogo del antibiótico teicoplanina LCTA-949 (De Burghgraeve *et al.*, 2012). Otras moléculas inhiben también a nivel de penetración porque están dirigidas al bolsillo hidrofóbico presente en E e impiden el rearrreglo conformacional de la proteína requerido para la fusión, por ejemplo péptidos (Costin *et al.*, 2010), el derivado de doxorubicina SA-17 (Kaptein *et al.*, 2010) y dos derivados de tetraciclina (Yang *et al.*, 2007). Otra clase de compuestos inhibidores de adsorción y penetración de DENV, pero actuando a nivel de la interacción del virus con HS, son taninos (Lin *et al.*, 2013) y polisacáridos sulfatados, estos últimos estudiados en esta tesis.

A pesar de los numerosos estudios realizados *in vitro* sobre agentes antivirales que afecten la entrada de DENV, son muy escasas las pruebas realizadas en modelos animales *in vivo* y, menos aún, los ensayos clínicos. Al presente, sólo ha sido probado en humanos el efecto de cloroquina, compuesto lisosomotrópico que eleva el pH endosomal y bloquea la penetración de DENV en cultivos celulares. Se realizaron dos ensayos clínicos controlados en Brasil y Vietnam con cloroquina, droga que se utiliza contra la malaria. No se obtuvieron resultados que mostraran diferencias significativas en parámetros virológicos y clínicos en los pacientes infectados con DENV tratados con cloroquina en comparación con pacientes tratados con placebo (Tricou *et al.*, 2010; Borges *et al.*, 2013).

## 6.1 *Los polisacáridos sulfatados*

Los polisacáridos sulfatados (PS) mimetizan las moléculas de HS, por lo que interfieren en las interacciones entre la glicoproteína E y los HSPG que actúan como receptores primarios de DENV en las células de mamífero.

Diversas clases de PS presentan actividad anti-DENV en células de mamífero: heparina, dextran sulfato, condroitin sulfato, curdlan sulfato, xilomananos, DL-galactanos híbridos, fucoidanos y carragenanos (revisado en Castilla *et al.*, 2015). De esta variedad de PS, los carragenanos se encuentran entre los más potentes y selectivos agentes antivirales. Los carragenanos son galactanos sulfatados que se aíslan a partir de algas rojas ya que son muy abundantes en la matriz extracelular. Su estructura consiste en

cadena lineales alternantes de  $\beta$ -D-galactopiranosas enlazadas por la posición 3 y  $\alpha$ -D-galactopiranosas o 3,6-anhidrogalactopiranosas enlazadas por la posición 4, sustituidas con grupos sulfato en diferentes posiciones (Damonte *et al.*, 2004b). Varias clases de carragenanos se encuentran en la naturaleza en algas marinas, pero tres tipos principales son comercializados para distintos usos: kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) y lambda ( $\lambda$ ), que presentan distinto grado de sulfatación, solubilidad y propiedades gelificantes.

Se ha demostrado que la actividad anti-DENV de los carragenanos es variable con el serotipo, disminuyendo la eficiencia en el orden DENV-2>DENV-3>DENV-4>DENV-1, y con la célula huésped, ya que fueron efectivos en células Vero, HepG2 y PH, pero inactivos en células de mosquito C6/36, con la sola excepción del carragenano  $\iota$  (Talarico *et al.*, 2005; 2007; 2011). Asimismo, la actividad antiviral de los carragenanos es influenciada por el número y posición de los grupos sulfatos, la composición y número de repeticiones del azúcar (Talarico *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción antiviral de los carragenanos sólo se ha estudiado en la infección de células Vero con DENV-2. Estos PS inhibieron no sólo la adsorción, como está descrito para otros virus, sino que también la penetración viral interfiriendo con el desnudamiento del virión en el endosoma y la liberación de la nucleocápside al citoplasma (Talarico & Damonte, 2007). Por pasajes seriados en presencia de carragenano  $\lambda$ , se han aislado variantes de DENV-2 resistentes al PS. Algunos clones resistentes presentaron dos mutaciones en la glicoproteína E mientras que en otros clones igualmente resistentes no se detectaron cambios genómicos en E (Talarico & Damonte, 2016). Por otro lado, el pasaje seriado de DENV-2 en células Vero produjo la selección de una población viral con alteraciones en el mecanismo de internalización en células Vero, pasando de una entrada por una vía no clásica independiente de clatrina a una endocitosis mediada por clatrina, fenómeno que estuvo acompañado de una menor susceptibilidad antiviral a los PS (Acosta *et al.*, 2014b). Estos últimos resultados parecerían indicar una probable asociación, al menos para el serotipo DENV-2, entre el modo de ingreso de DENV a la célula y la susceptibilidad antiviral frente a ciertos inhibidores de la entrada viral.

# OBJETIVOS

Según los antecedentes expuestos en la Introducción acerca del conocimiento actual de las etapas tempranas de la infección con DENV, el objetivo general del presente trabajo fue extender al serotipo DENV-3 el estudio del mecanismo de entrada viral a células de mamífero y sus posibles implicancias en la actividad de agentes antivirales con este blanco de acción.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Mecanismo de entrada de DENV-3 células Vero y A549: Análisis de la vía de endocitosis, tránsito intracelular y penetración a la célula huésped, participación del citoesqueleto.
- Influencia de la célula huésped en la ruta de endocitosis para el ingreso de DENV-3: comparación con células hepáticas y mieloides.
- Caracterización de la actividad antiviral de carregenanos frente a DENV-3 en células Vero, A549, HepG2, U937 y K562.
- Actividad antiviral de carragenanos en la infección con DENV-3 mediada por Ac.
- Análisis en forma comparativa de los mecanismos y respuestas de DENV-3 con los serotipos DENV-1 y DENV-2.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Células

La línea celular continua Vero (ATCC, CCL-81), proveniente de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*, fue crecida en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) (GIBCO) suplementado con 5 % de suero de ternero recién nacido inactivado (GIBCO) y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich). En el medio de mantenimiento (MM) la concentración de suero fue reducida a 1,5 %.

La línea celular continua A549 (ATCC, CCL-185), proveniente de carcinoma de pulmón humano, fue crecida en MEM suplementado con 10 % de suero de ternero recién nacido inactivado (GIBCO) y 50 µg/ml de gentamicina. Para el MM la concentración de suero se redujo a 1,5 %.

La línea celular continua HepG2 (ATCC, HB-8065), proveniente de un hepatocarcinoma humano, fue crecida en MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado (GIBCO), piruvato de sodio (200 mM), glutamina 2 mM y 50 µg/ml de gentamicina. Para el MM la concentración de suero se redujo a 1,5 %.

Las líneas celulares en suspensión U937 (ATCC CRL-1593.2), mielomonocitos provenientes de un linfoma histiocítico humano, y K562 (ATCC CCL-243), derivada de eritroleucemia humana, ambas provistas por la Dra. R. Gamberale de la Academia Nacional de Medicina, fueron propagadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB (GIBCO) inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Para el MM la concentración de SFB se redujo a 5%.

La línea celular de mosquito C6/36 HT, adaptada a crecer a 33°C, proveniente de larvas de *Aedes albopictus*, se obtuvo del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) Dr. Julio Maiztegui (Pergamino, Argentina). Las células se crecieron en medio L-15 (Leibovitz) (GIBCO) suplementado con 0,3 % de caldo triptosa fosfato, 0,02 % de glutamina, 1% de solución de aminoácidos no esenciales MEM (GIBCO), 5 % de SFB (GIBCO) inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Para el MM la concentración de suero se redujo a 2 %.

Cuando los cultivos se incubaron en estufa con 4 % de CO<sub>2</sub>, los medios se suplementaron con HEPES 20 µM (Sigma-Aldrich) o con ácido clorhídrico 1N y se llevaron a pH 7,2 con bicarbonato de sodio 7,5 %.

## **2. Virus**

### **2.1. Cepas**

La cepa de referencia H87 de DENV-3 (Lanciotti *et al.*, 1994) fue provista por la Dra. A. Mistchenko (Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina) y la cepa de referencia 16681 de DENV-2 (Kinney *et al.*, 1997) fue provista por la Dra. A. Gamarnik (Fundación instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina) Además se utilizó también la cepa XJ Clon 3 del virus Junín (JUNV) (Candurra *et al.*, 1990).

### **2.2. Preparación de las suspensiones virales**

La preparación de las suspensiones de DENV fue realizada infectando células C6/36 HT con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 UFP/célula. El inóculo viral se adsorbió durante 1 h a 33°C, luego se removió y se agregó MM. Los sobrenadantes se titularon al quinto, sexto y séptimo día post-infección (p.i.). Las suspensiones virales, cuyos títulos oscilaron entre  $10^5$  y  $10^6$  UFP/ml, se fraccionaron en alícuotas a -70°C hasta su uso.

### **2.3. Ensayo de formación de placas de lisis**

Esta técnica permite la cuantificación de las suspensiones virales. Para ello, células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con 100  $\mu$ l de diluciones seriadas al décimo de las suspensiones virales en buffer fosfato salino (PBS). Luego de 1 h de incubación a 37°C se retiraron los inóculos y las monocapas celulares se cubrieron con medio de plaqueo. Este medio consistió en MEM suplementado con 0,5 % de suero de ternera (GIBCO), 50  $\mu$ g/ml de gentamicina y 1% metilcelulosa (Sigma-Aldrich). Cada dilución se ensayó por duplicado. Luego de 6 días de incubación a 37°C con 4% de CO<sub>2</sub>, los cultivos se fijaron con formol 10 %.

### **2.4. Concentración de las suspensiones virales**

#### **2.4.i Por ultracentrifugación y purificación en gradiente discontinuo**

Los sobrenadantes cosechados al quinto, sexto y séptimo día fueron unificados en una única muestra. En primer lugar los sobrenadantes se clarificaron mediante una centrifugación a 10000 x g durante 10 min a 4°C. Luego, se concentraron por

ultracentrifugación (rotor Beckman SW28), a 26000 rpm durante 90 min a 4°C. Posteriormente, el sedimento se sembró en un gradiente discontinuo de sacarosa (15%-60%) solubilizada en buffer TES (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y se centrifugó a 46000 rpm (rotor Beckman SW55Ti) por 90 min a 4°C. La banda conteniendo los viriones se extrajo utilizando una pipeta Pasteur y luego se diluyó en buffer TES hasta alcanzar un volumen final de 5 ml y se centrifugó por 90 min a 46000 rpm (rotor Beckman SW55Ti) a fin de remover los restos de sacarosa. El sedimento se resuspendió en 100 µl de buffer TES.

## **2.4.ii Por ultrafiltración**

Para obtener una suspensión viral concentrada se utilizaron también filtros Ultra-15 100K (Amicon). Se colocaron 15 ml de suspensión viral de título  $1.10^6$  UFP/ml en un tubo falcon de 50 ml que incluye el filtro concentrador (ambos implementos provistos en el equipo comercial), y se procedió a centrifugar a 4000 x g durante 30 min utilizando un rotor con cubeta oscilante en centrifuga Eppendorf 5810R. Usualmente se obtienen alrededor de 250 µl de material concentrado.

## **3. Determinación de la viabilidad celular**

### **3.1. Método de MTS**

El efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular en las líneas celulares adherentes se determinó mediante el ensayo colorimétrico MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (Promega). La enzima NADPH deshidrogenasa de las células viables reduce el compuesto de tetrazolio MTS dando como producto formazán, un compuesto coloreado y soluble en el medio de cultivo celular. La cuantificación del producto de la reacción se realiza mediante la medición de la absorbancia a 490-500 nm, dicha absorbancia es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo. Monocapas confluentes de células Vero, A549 o HepG2, crecidas en microplacas de 96 cavidades, se trataron con 200 µl de diluciones seriadas al medio de los compuestos por triplicado. El tiempo de tratamiento con cada inhibidor se ajustó de manera que no se viese alterada la morfología celular, pero a su vez asegurando el efecto deseado sobre los procesos celulares (ver secciones siguientes). A



continuación se retiraron los sobrenadantes y se agregó a cada cavidad 100  $\mu$ l de MM junto con 15  $\mu$ l del reactivo comercial MTS. Luego de 30 minutos, 1 h y 2 h de incubación se determinó la densidad óptica (DO) utilizando un lector de microplacas ELx808 BioTek. El porcentaje de células viables fue calculado para cada concentración de compuesto como la relación entre la DO promedio de la muestra y la DO promedio del control de células sin tratar con compuesto, multiplicado por 100.

### **3.2. Método de exclusión de azul tripán**

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos ensayados sobre las células en suspensión se utilizó la tinción con azul tripán, un colorante azoico. Las células vivas se observan claras y refringentes debido a la permeabilidad selectiva de la membrana celular, a diferencia de las células muertas, que se tiñen de color azul oscuro. Cultivos de células U937 y K562 fueron tratados con diluciones seriadas de los compuestos a ensayar, por duplicado. El tiempo de tratamiento se ajustó como en el ítem 3.1. Luego de transcurrido dicho intervalo de tiempo, las suspensiones celulares se sometieron a una centrifugación a 2000 x g durante 5 min y se resuspendieron en PBS y el procedimiento de lavado se repitió tres veces. La tinción se realizó incubando 100  $\mu$ l de suspensión celular y 300  $\mu$ l de azul tripán 0,4% durante 5 min a temperatura ambiente. El recuento de células vivas y totales fue realizado en cámara de Neubauer, lo cual permitió calcular el porcentaje de células viables.

## **4. Microscopía de fluorescencia: ensayo de inmunofluorescencia indirecta**

Monocapas celulares, crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con DENV-3 y luego de transcurrida 1 hora de infección, las células se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con metanol (Merck) durante 10 min a -20 °C. Luego de la fijación se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno en agitación y a continuación las células se incubaron durante 30 min a 37°C con una dilución 1:300 de un Ac monoclonal de ratón que reconoce la proteína de envoltura de los cuatro serotipos virales (Abcam). Las incubaciones fueron realizadas en cámara húmeda. Luego se realizaron nuevamente tres lavados de 5 min cada uno con PBS. Los complejos antígeno-Ac se revelaron por medio de una segunda incubación durante 30 min a 37 °C con inmunoglobulinas (Igs) de cabra reactivas contra las Igs de ratón conjugadas a

isotiocianato de fluoresceína (FITC) o rodamina (TRITC) (Sigma-Aldrich). En el caso del uso de FITC se realizaron a continuación tres lavados de 5 min cada uno con PBS y para el TRITC se hicieron seis lavados de 5 min cada uno, en ambos casos el lavado final fue con agua de calidad MilliQ. Las muestras se montaron en un portaobjetos sobre una gota de glicerina tamponada conteniendo 2,5% de 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano (DABCO). Las fotomicrográficas se obtuvieron con una amplificación de 100, 400 o 1000 aumentos en un microscopio Olympus BX51 acoplado a una cámara digital Collsnap-Pro (Media Cybernetics) y se analizaron con el software Image-Pro Plus.

## **5. Cinética de entrada viral**

### **5.1. Cinética de internalización viral: ensayo de centros infecciosos**

Monocapas de células Vero o A549, crecidas en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con DENV-3 a una m.i. de 1 UFP/célula. Luego de 1 h de incubación a 4°C se retiraron los inóculos virales, se realizaron tres lavados con PBS frío y se adicionó MM precalentado a 37°C para dar inicio al proceso de internalización. Los cultivos se incubaron a 37°C y a diferentes tiempos se lavaron con PBS y se trataron con 1 mg/ml de proteinasa K (Invitrogen) de manera de eliminar el virus adsorbido pero no internalizado. A continuación se bloqueó la acción enzimática con el agregado de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM, inhibidor de proteasas, en PBS conteniendo 3 % de seroalbúmina bovina (BSA). Las células se centrifugaron durante 10 min a 2000 x g y luego se lavaron con PBS conteniendo 0,3 % de BSA. Finalmente, las células se resuspendieron en MM y se realizaron diluciones seriadas al décimo que se sembraron (volumen de inóculo de 0,1 ml) sobre nuevas monocapas de células Vero. Luego de 2 h de adsorción a 37°C las monocapas celulares se cubrieron con medio de plaqueo y se incubaron a 37°C durante 7 días. En este ensayo cada placa formada deriva de una única célula en la cual hubo internalización de una partícula viral dando lugar a una infección productiva. A fin de determinar el porcentaje de virus internalizado en cada tiempo se procesó en paralelo otra serie de cultivos en los que la proteinasa K fue reemplazada con PBS. Para cada tiempo de tratamiento el porcentaje de virus internalizado se calculó como la relación entre el número de UFP en el cultivo tratado con proteinasa K y el número de UFP en el cultivo sin tratar con la enzima, multiplicado por

100. La determinación de la cinética de internalización en ausencia de sincronización se realizó exactamente de la misma manera, pero evitando el paso de incubación a 4°C.

## **5.2. Cinética de fusión viral: ensayo de susceptibilidad a cloruro de amonio**

Monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, se infectaron a 4°C con 100-150 UFP/cavidad de DENV-3. Luego de 1 h de incubación a 4°C se realizaron 3 lavados con PBS frío y se adicionaron 450 µl de MM precalentado a 37°C para dar inicio a la internalización viral. Los cultivos se transfirieron a un baño térmico a 37°C y a distintos tiempos de incubación (0; 2,5; 5; 10; 20; 30 y 60 min) se agregaron 50 µl de MM conteniendo cloruro de amonio de manera tal que la concentración final en el cultivo fuera de 50 mM; para cada tiempo ensayado se realizó un duplicado. Las células se incubaron en presencia del cloruro de amonio a 37°C durante 3 h y luego las monocapas se trataron durante 1 min con buffer citrato (ácido cítrico 40 mM, KCl 10 mM, NaCl 135 mM, pH 3) para inactivar las partículas virales presentes en el medio extracelular. Luego de realizar tres lavados con PBS las monocapas celulares se cubrieron con medio de plaqueo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de partículas internalizadas con respecto a un control en el que no se agregó cloruro de amonio.

## **6. Determinación de la actividad virucida**

Suspensiones de DENV-3 cuyo título era  $1.10^6$  UFP/ml se incubaron con volúmenes iguales de medio de cultivo sin suero en presencia de distintas concentraciones de nistatina, metil-β-ciclodextrina, o MM, como control, durante 1 h en baño térmico a 37°C. Luego, a partir de cada muestra se realizaron diluciones seriadas al décimo para cuantificar la infectividad viral remanente por UFP en células Vero. El porcentaje de infectividad remanente se calculó como la relación entre el título del virus tratado y el título del virus control sin droga por 100.

## 7. Inhibidores químicos: determinación de su efecto sobre la entrada y la multiplicación viral

### 7.1. Mediante ensayos de inhibición del rendimiento viral

Monocapas de células Vero, A549 o HepG2 crecidas en microplacas de 24 cavidades, o suspensiones de células U937 y K562, se trataron con concentraciones crecientes de inhibidores específicos de las vías endocíticas. La ausencia de toxicidad de las drogas, en las concentraciones presentadas en la tesis, se verificó mediante ensayos de viabilidad celular. Todos los inhibidores farmacológicos se adquirieron en Sigma-Aldrich.

Las condiciones de tratamiento para cada inhibidor fueron las siguientes:

- Para las células Vero y A549:

En el caso de nistatina las células se pretrataron con el compuesto durante 5 h a 37 °C y el rango de concentraciones utilizado fue de 6,3 a 100  $\mu$ M en medio de cultivo sin suero. Para clorpromazina (10 – 50  $\mu$ M), colchicina (12,5 – 200  $\mu$ M), nocodazol (2,5 – 30  $\mu$ M) las células fueron pretratadas durante 2 h a 37 °C. Para cloruro de amonio (10 – 50 mM), concanamicina A (0,62 – 10 nM), metil- $\beta$ -ciclodextrina (0,62 – 5 mM en medio de cultivo sin suero), dinasore (20 – 150  $\mu$ M) y faloidina (0,0167 – 1,670  $\mu$ M en medio de cultivo sin suero) las células fueron pretratadas durante 1 h a 37 °C. Por último, en el caso de dansilcadaverina (100 – 500  $\mu$ M), citocalasina D (0,6 – 2,5  $\mu$ M), latrunculina A (1 – 6  $\mu$ M para células Vero y 0,05 – 0,5  $\mu$ M para las células A549) el pretratamiento fue de 30 min a 37 °C.

- Para las células HepG2: las células se pretrataron con clorpromazina (1,25 – 20  $\mu$ M) durante 1 h a 37 °C.

Luego de la incubación con los compuestos las células se infectaron con DENV-3 a una m.i. de 0,1 UFP/célula en presencia de las drogas, a excepción de las células tratadas con nistatina y metil- $\beta$ -ciclodextrina debido a su actividad virucida. Estos dos compuestos se eliminaron de los cultivos en forma previa a la infección por medio de tres lavados con PBS de 5 min cada uno en constante agitación. Los inóculos virales se retiraron luego de 1 h de incubación a 37°C, las monocapas celulares se lavaron con PBS

y se cubrieron con MM sin compuesto. A las 48 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó la multiplicación viral por el método de UFP en células Vero.

- Para las células U937 y K562:

Las condiciones de tratamiento con clorpromazina en células U937 (10 - 20  $\mu$ M) difiere de las utilizadas con las células K562 (10 - 40  $\mu$ M). Las células se pretrataron durante 2 h a 37 °C con las concentraciones indicadas en cada caso; Luego de la incubación las células se infectaron con DENV-3 a una m.i. de 5 UFP/célula para la entrada en ausencia de Ac o con una mezcla de DENV-3-2H2 de m.i. de 0,5 UFP/célula para la entrada en presencia de Ac, en ambos casos en presencia de la droga. Los inóculos virales se retiraron luego de 2 h de incubación a 37 °C, se lavaron las células con PBS y se cubrieron con MM sin compuesto. A las 72 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon en células Vero.

En todos los casos, se calculó el porcentaje de multiplicación viral como la relación entre el título viral en la muestra tratada con droga y el título viral en el control de virus sin tratar con compuesto multiplicado por 100.

## 7.2. Mediante ensayos de centros infecciosos

El efecto de los inhibidores sobre la internalización de los viriones de DENV-3 se evaluó mediante ensayos de centros infecciosos.

Cultivos de células Vero o A549 se trataron con concentraciones crecientes de las drogas y se infectaron con DENV-3 a una m.i. de 1 UFP/célula durante 1 h a 37 °C. Luego se retiraron los inóculos virales, se lavaron con PBS y se trataron con proteinasa K (1 mg/ml) para remover el virus extracelular. Dicha enzima no sólo remueve los viriones adsorbidos-no internalizados, sino que también causa el levantamiento de la monocapa celular, por lo que su actividad se frenó con el agregado de PMSF 2 mM en PBS con BSA 3 %. Se realizaron lavados con PBS 0,3 % BSA, se resuspendieron las células y se infectaron células Vero con diluciones seriadas de las mismas durante 2 h. Luego se cubrieron las células con MP y se fijaron a los 6 días p.i. para el recuento de los centros infecciosos.

### 7.3. Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta

Monocapas de células Vero o A549, crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades, se pretrataron con la máxima concentración de droga evaluada en los ensayos de inhibición del rendimiento viral y durante el mismo tiempo de tratamiento en cada caso. Luego, las células se infectaron con DENV-3 a una m.i. de 1 UFP/célula en presencia o ausencia de las drogas. Al cabo de 1 h de incubación a 37°C se retiraron los inóculos virales, se realizaron tres lavados con PBS y las células se cubrieron con MM. Al cabo de 24 h de incubación a 37°C las células se fijaron con metanol y se procesaron para revelar la proteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta.

### 7.4. Mediante PCR cuantitativa

Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 6 pocillos se trataron durante 90 min con clorpromazina 50  $\mu$ M y luego se infectaron con DENV-3 a una m.i. 1. Luego de 1 h a 37°C, se realizaron 3 lavados con PBS y se extrajo el ARN total con Trizol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo comercial. La cantidad de ARN extraído fue cuantificada y verificada su pureza en NanoDrop 2000 (Thermo scientific). Para realizar una curva estándar que permita cuantificar la cantidad de genomas virales presentes en una muestra se cuantificó el ARN extraído de una suspensión viral concentrada por ultracentrifugación y se estimó la cantidad de genomas utilizando los datos del genoma de DENV-3 NC\_001475.2 y la herramienta online Oligocalc de Basic Northwestern. La reacción de retrotranscripción del ARN en ADN copia fue realizada utilizando 1,5  $\mu$ g de ARN muestra, el primer 3' (5'GGCGTTCTGTGCCTGGAATGATG3') y la retrotranscriptasa de M-MLV (Promega), según los requerimientos del protocolo comercial. En paralelo se realizó el mismo proceso con diluciones seriadas del estándar de ARN genómico de DENV-3 para obtener la curva patrón. Con el ADN copia generado se realizó la reacción de PCR cuantitativa con la tecnología TaqMan, utilizando el primer 5' (5'AAGGACTAGAGGTTATAGGAGACC 3') y la sonda ([6~FAM]AACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACC[TAMRA~6~FAM]) marcada con FAMRA. El protocolo para la amplificación de las muestras con la enzima GoTaq polimerasa (Promega) consistió en un primer ciclo de calentamiento a 94°C por 3 min, 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y una extensión final de 5 min a 72°C, utilizando un termociclador MyiQ2 (BioRad).

## 8. Inhibidores moleculares: determinación de su efecto sobre la entrada y la multiplicación viral

### 8.1. Construcciones plasmídicas

Se utilizaron construcciones plasmídicas para expresar una serie de proteínas celulares y sus respectivas mutantes dominantes negativas. Las construcciones de Eps15, tanto la mutante dominante negativa EH29 como la proteína control DIIIΔ2, fueron cedidas por la Dra. C. Shayo (IBYME, Argentina); las construcciones de caveolina-1, *cav-1 wild type* (wt) control, y dos mutantes dominantes negativas *cav-1-DN* y *cav-1-Y14F* fueron provistas por el Dr. J. M. Bergelson (Universidad de Pensilvania, EEUU); las construcciones de dinamina II, *dyn II wt* y la mutante dominante negativa *dyn II K44A* fueron cedidas por el Dr. M. A. McNiven (Clínica Mayo, EEUU); las construcciones de Rab5 y Rab7, tanto Rab5 wt y la mutante negativa Rab5 S34N, como Rab7 wt control y la mutante dominante negativa Rab7 N125I, fueron provistas por la Dra. M. I. Colombo (Universidad Nacional de Cuyo, Argentina). Las secuencias codificantes se encuentran insertas en los plásmidos pEGFP-C1 o pEGFP-N1 (Clontech), por lo que las proteínas se expresan como proteínas de fusión a GFP (*green fluorescent protein*).

### 8.2. Amplificación y purificación de las construcciones plasmídicas

A fin de realizar la transformación de bacterias competentes, primeramente se descongelaron las mismas por incubación en hielo durante 15 min. Luego de este período, se agregó 1 µl del plásmido a ensayar y se incubó durante 30 min en hielo. Posteriormente se realizó un shock térmico a 42°C durante 1 min y se agregó 1 ml de caldo Luria-Bertani (LB). Las bacterias se incubaron 2 h a 37°C con agitación y luego se sembraron en LB-agar conteniendo kanamicina (50 µg/ml). Las placas se incubaron toda la noche y al día siguiente se repicaron las colonias a fin de realizar cultivos en 5 ml de caldo LB conteniendo el antibiótico de selección correspondiente. El ADN plasmídico se preparó utilizando columnas de intercambio aniónico comerciales, *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification system* (Promega), según las indicaciones del proveedor. La purificación se realizó a partir de 5 ml de cultivo saturado de bacterias transformadas. La cuantificación de los plásmidos purificados se realizó empleando el NanoDrop 2000 (Thermo scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante.

### 8.3. Transfección de cultivos celulares

Monocapas de células Vero crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades se transfectaron utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor. Se diluyeron 0,8 µg de cada plásmido en 50 µl de Opti-MEM (Gibco) y se combinaron con 1 µl de lipofectamina diluida en 50 µl de Opti-MEM. Luego de 40 min de incubación a temperatura ambiente los complejos ADN-liposomas se sembraron sobre los cultivos celulares y se incubaron por aproximadamente 4 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y se adicionó Opti-MEM conteniendo 2 % SFB. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 h.

### 8.4. Infección de cultivos celulares transfectados y análisis de la multiplicación viral

Para determinar el efecto de la expresión de proteínas dominantes negativas sobre la multiplicación viral, cultivos de células Vero transfectados durante 24 h se infectaron con DENV-3 a una m.i. de 1 UFP/célula. Luego de 1 h de incubación a 37°C se retiraron los inóculos virales y se adicionó MM. Las células se incubaron a 37°C durante 24 h y luego se fijaron con metanol. Para revelar el antígeno viral producido se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón reactivo contra la proteína de envoltura del virus (Abcam), y como anticuerpo secundario se utilizaron Igs de cabra reactivas contra las inmunoglobulinas de ratón conjugadas a TRITC (Sigma-Aldrich). Las muestras se visualizaron bajo un microscopio Olympus BX51 con una amplificación de 400 o 1000 aumentos. La determinación del porcentaje de infección de células transfectadas se realizó mediante un recuento de células infectadas sobre 250 células transfectadas que expresaban niveles similares de EGFP.

## 9. Evaluación del efecto de inhibidores químicos y moleculares sobre procesos celulares

### 9.1. Tinción de células vivas con naranja de acridina

Para corroborar el aumento del pH en las vesículas intracelulares por efecto de los compuestos cloruro de amonio y concanamicina A se realizaron tinciones de las células con el colorante naranja de acridina. Cultivos de células Vero y A549 fueron tratadas con cloruro de amonio (50 mM) o concanamicina A (10 nM) durante 1 h a 37°C y luego se



incubaron con naranja de acridina (1  $\mu\text{g/ml}$  en MM sin suero) durante 15 min a 37°C en presencia de los compuestos. Paralelamente, se trabajó con cultivos sin tratar con las drogas (controles). A continuación las células se lavaron tres veces con PBS, se montaron en un portaobjetos sobre una gota de PBS y se visualizaron bajo un microscopio Olympus BX51 con una amplificación de 400 aumentos.

## 9.2. Ensayos de internalización de ligandos marcados con fluorocromos

A fin de corroborar la efectividad del tratamiento con las drogas o la expresión de proteínas dominantes negativas sobre los procesos endocíticos se analizó la internalización de los ligandos transferrina y toxina colérica.

Monocapas de células Vero, A549 o HepG2, crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades, se trataron o no (control) con los inhibidores clorpromazina (30  $\mu\text{M}$  para las células Vero y A549; 20  $\mu\text{M}$  para las células HepG2), dansilcadaverina (200  $\mu\text{M}$ ) o dynasore (150  $\mu\text{M}$ ) o se transfectaron con las construcciones de Eps15. Luego del pretratamiento con las drogas o de 24 h de transfección con los plásmidos, los cultivos se incubaron con transferrina humana conjugada a TRITC 15  $\mu\text{g/ml}$  (Molecular Probes) durante 1 h a 37°C. A continuación los cultivos se lavaron tres veces con PBS a fin de eliminar la proteína no internalizada y se fijaron con metanol durante 10 min a -20°C. Para corroborar el efecto de los inhibidores de caveolas/*lipid-rafts* los cultivos se pretrataron con nistatina (100  $\mu\text{M}$ ) o metil- $\beta$ -ciclodextrina (5 mM) en MM sin suero y luego de intensos lavados con PBS se incubaron con la subunidad B de la toxina colérica conjugada a FITC 0,3  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma-Aldrich) o conjugada a Alexa 555 0,3  $\mu\text{g/ml}$  (Life Technologies) durante 1 h a 37°C. Finalmente los cultivos se procesaron como se describió anteriormente.

## 9.3. Tinción de microtúbulos y microfilamentos

Monocapas de células Vero o A549, crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades, se trataron con los agentes despolimerizantes de microfilamentos o microtúbulos en las mismas condiciones que las utilizadas en los ensayos de inhibición del rendimiento viral. Luego los cultivos se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4 % durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación durante 10 min a temperatura ambiente con cloruro de amonio 50 mM en PBS. Finalmente las células se permeabilizaron por tratamiento con PBS conteniendo 0,2 % de tritón X-100.

Para la visualización de los microfilamentos de actina las monocapas se incubaron con faloidina-FITC 10 µg/ml (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37 °C. La visualización de los microtúbulos se realizó con un Ac monoclonal de ratón reactivo contra  $\alpha$ -tubulina (Sigma-Aldrich), seguido de una incubación con un antisuero de cabra conjugado a FITC reactivo contra IgGs de ratón.

## **10. Análisis de la infección de DENV-3 mediada por Ac**

### **10.1. Establecimiento del sistema *in vitro* de entrada de DENV-3 mediada por Ac**

Se utilizó el Ac monoclonal anti-DENV MAb8705 del clon 2H2 (D3-2H2-9-21, subtipo IgG2a) (Chemicon) reactivo contra los 4 serotipos virales. Para verificar si 2H2 media la infección por DENV-3 y para establecer las condiciones de infección que dieran un máximo incremento de multiplicación viral respecto del control de virus sin Ac, 50 µl de una suspensión de DENV-3 (m.i. 0,5) y 50 µl de distintas diluciones de Ac 2H2 (1/10000 - 1/10) se incubaron durante 1 h a 37 °C. Se infectaron células U937 con las mezclas DENV-3-2H2 durante 2 h, homogeneizando las suspensiones cada 20 min. Luego de ese tiempo, se lavaron las células tres veces con PBS y se incubaron en microplacas de 24 pocillos con MM. Se cosecharon los sobrenadantes a las 48, 72 y 96 h p.i. y se titularon por UFP en células Vero.

### **10.2. Bloqueo de la entrada mediada por Ac**

Para bloquear el receptor Fc de baja afinidad FcγRII (CD32) se utilizó el Ac específico AT.10 (provisto por la Dra. Mirta Giordano, Academia Nacional de Medicina) o IgG humanas previamente agregadas durante 15 min a 62 °C. Para bloquear el receptor de alta afinidad FcγRI (CD64) se utilizaron IgG humanas solubles obtenidas por centrifugación durante 30 min a 15000 g. El bloqueo se realizó incubando células U937 con 30 µg/ml de AT.10 o IgG agregadas o solubles durante 30 min a 4 °C. Luego de ese tiempo, se eliminaron los Ac no unidos mediante centrifugación a 2000 g durante 5 min. Se incubaron las células así tratadas con las mezclas DENV-3-2H2 a 4 °C durante 2 h, como fue descripto previamente. En paralelo, se realizó la incubación de las células sin Ac, sin IgG o sin virus como control de cada tratamiento. Luego de ese tiempo, se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se incubaron en MM durante 72 h a

37 °C. El rendimiento viral en el sobrenadante de los cultivos se cuantificó por UFP en células Vero.

## 11. Actividad antiviral de polisacáridos sulfatados sobre la infección con DENV-3

### 11.1. Compuestos

Se utilizaron carragenano- $\iota$  y carragenano- $\lambda$  (Sigma-Aldrich) (Figura MyM.1). Las soluciones madres de ambos compuestos se prepararon a una concentración 10 mg/ml en agua bidestilada y se conservaron a 4°C.

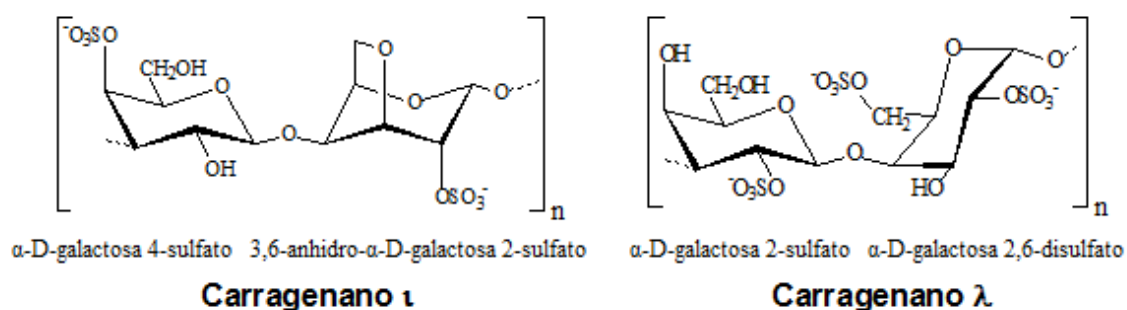


Figura MyM.1: Estructura química de los carragenanos.

### 11.2. Actividad antiviral en células Vero, A549 y HepG2

Primero se evaluó la citotoxicidad de los carragenanos por el método de MTS luego de incubar cultivos de células Vero, A549 y HepG2 durante 48h en presencia de distintas concentraciones de carragenano. Se calculó la concentración citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) como la concentración de carragenano que produce 50% de reducción de la viabilidad celular.

Para determinar la actividad antiviral, se infectaron cultivos de células Vero, A549 y HepG2 con DENV-3 (m.i. 0,1) durante 1 h a 37 °C en presencia o ausencia de distintas concentraciones no citotóxicas de carragenano. Luego se realizaron tres lavados con PBS y se agregó MM. El rendimiento viral se cuantificó a las 48 h p.i. por UFP en células

Vero. Se calculó la concentración efectiva 50% ( $CE_{50}$ ) como la concentración de carragenano que reduce el rendimiento viral al 50%. El índice de selectividad (IS) resulta del cociente  $CC_{50}/CE_{50}$ .

### **11.3. Mecanismo de acción: efecto en las etapas tempranas**

Para evaluar el efecto del tiempo de adición de los carragenanos sobre la actividad antiviral, se infectaron células Vero y A549 crecidas en microplacas de 24 cavidades con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) y se agregaron los compuestos (20  $\mu$ g/ml) simultáneamente con el virus (tiempo 0) o a 1, 2, 5 y 8 h p.i. A las 10 h p.i. se descartó el sobrenadante de los cultivos, se lavaron con PBS y se trataron con 1 mg/ml de proteinasa K para realizar un ensayo de centros infecciosos como en 7.2.

Para verificar un efecto del polisacárido sobre las etapas tempranas del ciclo de multiplicación de DENV-3 en células Vero y A549 se realizó un ensayo de reducción del rendimiento viral empleando diferentes condiciones de tratamiento, de modo que el carragenano estuviera presente sólo en la adsorción, sólo en la internalización o en ambos procesos. Adsorción viral: Se infectaron las células en presencia de compuesto (20  $\mu$ g/ml) y luego de 1 h de adsorción a 4 °C, se cubrieron con MM sin compuesto y se incubaron 1 h a 37 °C. Internalización viral: Luego de 1 h de adsorción a 4 °C en ausencia de compuesto, se agregó MM con carragenano y se incubó durante 1 h a 37 °C. Adsorción e internalización virales: Las células se mantuvieron en MM con carragenano durante 1 h a 4 °C y 1 h a 37 °C. En todos los casos, luego de la hora de internalización a 37 °C se realizó un lavado con buffer citrato (pH 3) para remover el virus no internalizado, se cubrió con MM y a las 48 h p.i. se titularon los sobrenadantes por UFP en células Vero.

### **11.4. Actividad antiviral en células mieloides humanas en ausencia o presencia de Ac**

Se evaluó la citotoxicidad por el método de Azul tripan luego de incubar cultivos de células U937 y K562 durante 72h en presencia de distintas concentraciones de carragenano  $\lambda$  y se calcularon los valores de  $CC_{50}$ .

Para evaluar la actividad antiviral se infectaron cultivos celulares con DENV-3 (m.i. 5) o con la mezcla DENV-3-Ac 2H2 (pre-incubadas durante 1 h a 37 °C en las condiciones

establecidas en 10.1) durante 2 h a 37 °C en presencia de distintas concentraciones no citotóxicas de carragenano  $\lambda$  o en su ausencia como control. Luego de ese tiempo, se lavaron los cultivos tres veces con PBS, se agregó MM en presencia del compuesto y se cuantificó el rendimiento viral a las 72 h p.i. por UFP en células Vero. Se calcularon los valores de CE<sub>50</sub>.

# RESULTADOS

## CAPITULO 1: LA ENTRADA DEL VIRUS DENGUE A LA CÉLULA HUÉSPED

### 1- EL MECANISMO DE ENTRADA DE DENV-3

En esta primera sección del presente trabajo de tesis se trata de dilucidar cuál es la vía de endocitosis empleada por DENV-3 para la entrada productiva en células Vero y A549. Con ese objetivo, el abordaje metodológico se basa en la utilización de diferentes inhibidores farmacológicos de procesos celulares plausibles de estar involucrados en la entrada viral y de inhibidores moleculares de proteínas que participan en distintos procesos endocíticos celulares.

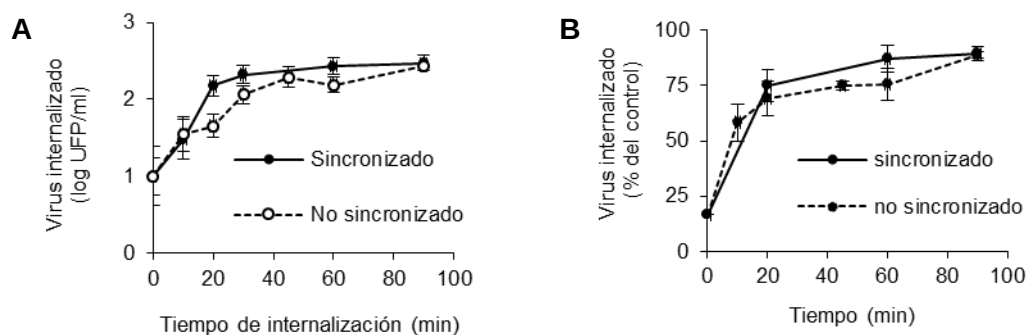
#### *1.1. La cinética de internalización de DENV-3 a células Vero*

Para poder estudiar la entrada de DENV-3 a la célula huésped resulta esencial conocer su cinética de internalización viral, ya que la misma da cuenta del tiempo necesario para que un porcentaje significativo de viriones logren penetrar a la célula para realizar una infección productiva. La definición de dicho tiempo forma parte del diseño de los estudios que nos permitan dilucidar el mecanismo por el cual ingresaría el virus a la célula susceptible.

En primera instancia, la curva de internalización viral se realizó de manera sincronizada, ya que se permitió la adsorción de los viriones a la superficie celular durante 1 h a 4 °C, condición en la que el virus se encuentra imposibilitado de entrar a la célula hasta que la temperatura alcance los 37 °C. A distintos tiempos posteriores al pasaje de 4 °C a 37 °C el virus adsorbido fue inactivado con la enzima proteinasa K (1 mg/ml), mientras que las partículas que a ese momento ya fueron internalizadas quedan protegidas de la acción de la misma y prosiguen con el ciclo de multiplicación viral. Dicha enzima posee en simultáneo la capacidad de desprender las células adherentes, por lo cual se procedió a la cuantificación de las partículas virales infectivas internalizadas mediante el ensayo de centros infecciosos, el cual consiste en sembrar suspensiones de las células tratadas sobre una monocapa de células Vero y cubrir con medio semisólido para permitir la formación de placas de lisis. La curva de internalización viral no

sincronizada se realizó de igual manera, pero obviando el paso a 4 °C. En este caso, los viriones son adsorbidos e internalizados a 37 °C.

En la figura R.1.A se observa que los perfiles de las curvas de internalización sincronizada y no sincronizada son similares con igual cantidad de virus internalizado a partir de los 45 min p.i. Por otro lado, el mismo procedimiento pero con el reemplazo del tratamiento de la proteinasa K por PBS permite cuantificar el virus asociado total, el cual incluye tanto los viriones adsorbidos como las partículas internalizadas. El porcentaje de partículas infectivas internalizadas a cada tiempo luego del cambio de temperatura se calculó como la relación entre las partículas internalizadas y las partículas totales asociadas, o sea, el número de UFP en los cultivos tratados con proteinasa K respecto del número de UFP en el cultivo tratado con PBS. En el tiempo 0 representado en la figura R.1.B se observa que el tratamiento con proteinasa K elimina el 80 % de las partículas adsorbidas antes del proceso de internalización. Nuevamente, los cultivos no sincronizados y sincronizados mostraron tasas similares de internalización viral, con un máximo de aproximadamente 80 % de viriones internalizados en los tiempos ensayados.



**Figura R.1: Cinética y tasa de internalización de DENV-3 en células Vero.** **A.** Cultivos celulares fueron infectados con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) a 37°C (no sincronizado) o a 4 °C 1 h para sincronizar la infección y luego a 37 °C. A diferentes tiempos de incubación a 37 °C se inactivó el virus extracelular con proteinasa K (1mg/ml) y con la suspensión celular se realizó un ensayo de centros infecciosos en células Vero. Los resultados se expresan como el logaritmo del número de UFP internalizadas. **B.** Los valores de virus internalizado calculados en A se relativizan respecto de un control en el que se sustituyó la proteinasa K con PBS. En A y B los resultados representan el valor medio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE.

En base a estos resultados, se decidió trabajar en todos los ensayos siguientes con cultivos no sincronizados para evitar el estrés y daño celular que puede producirse ocasionalmente al incubar los cultivos celulares a 4 °C durante 1 h.

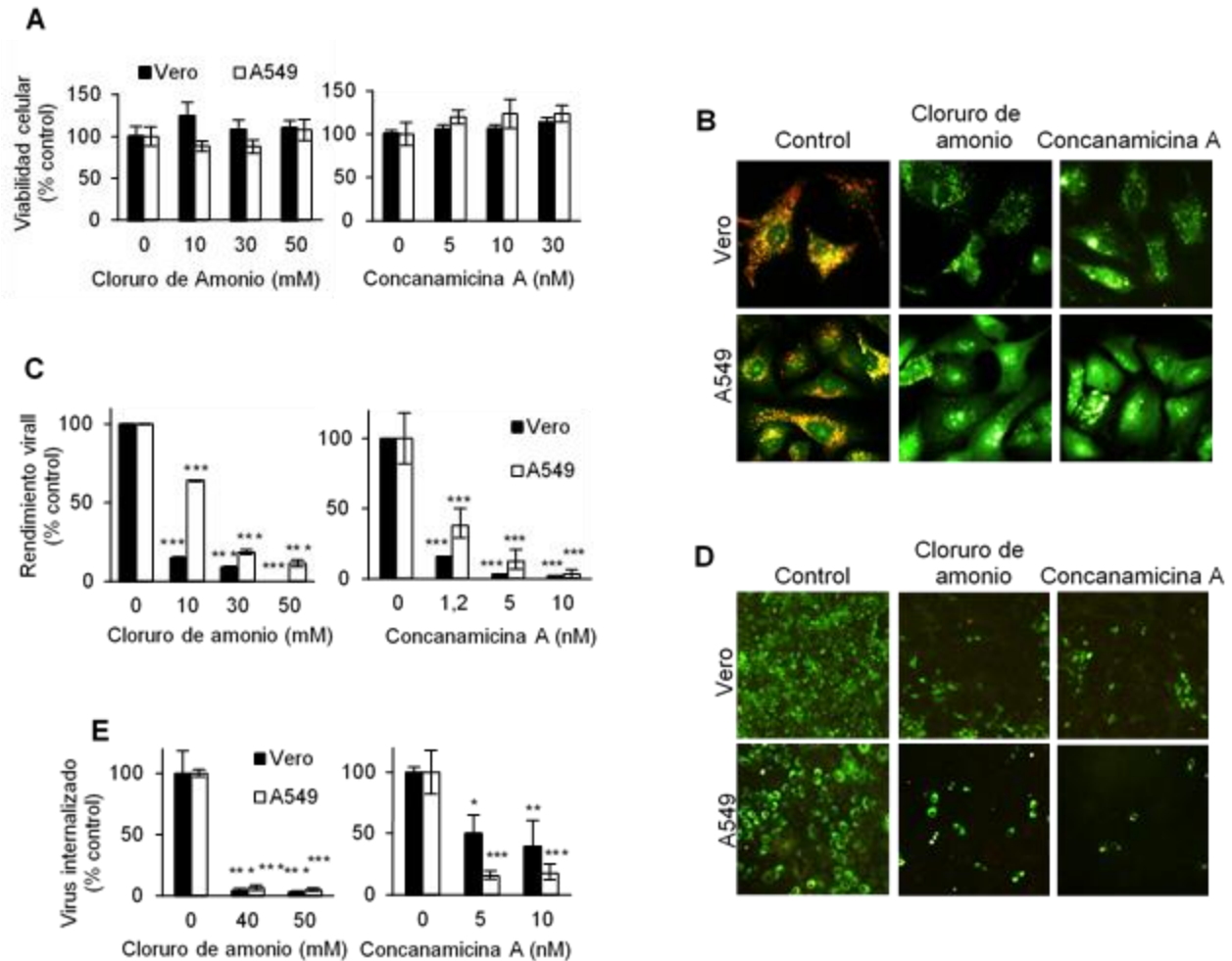


## 1.2. Análisis de la dependencia de pH para la entrada viral

En varios trabajos se demostró que el pH ácido produce cambios conformacionales en la glicoproteína E viral que exponen el péptido fusogénico e inician el proceso de fusión de las membranas celulares y virales (Zhang *et al.*, 2004; Modis *et al.*, 2004; Smit *et al.*, 2011; Stiasny *et al.*, 2011). Por lo tanto, resulta relevante evaluar la dependencia del pH en la entrada infectiva de DENV-3 a cultivos de células Vero y A549 mediante el uso de inhibidores químicos que producen un aumento del pH de las vesículas intracelulares. Tanto el cloruro de amonio, que es una base lisosomotrópica débil (Mizzen *et al.*, 1985; Castilla *et al.*, 1994), como la concanamicina A, un potente inhibidor de la ATPasa vacuolar (Woo *et al.*, 1992; Muroi *et al.*, 1993), generan un aumento del pH en las vesículas endosomales.

Se determinaron las condiciones experimentales en las cuales ambas drogas resultaran no citotóxicas y efectiva su acción. En primer lugar se evaluó la viabilidad celular por el método colorimétrico MTS; el mismo da cuenta de la actividad metabólica de las células viables, ya que generan un producto coloreado al reducir el MTS tetrazolio. Para ello se trataron los cultivos de células Vero y A549 con concentraciones crecientes de cloruro de amonio y concanamicina A durante 2 h, luego la viabilidad remanente se calculó como la relación entre la absorbancia a 490 nm de los cultivos tratados respecto de un cultivo no tratado con las drogas. En la figura R.2.A se observa la ausencia de citotoxicidad de las drogas en ambos tipos celulares para las concentraciones y tiempo de exposición ensayados, con valores de viabilidad que rondan el 100 % incluso para las concentraciones máximas estudiadas. En segundo lugar, se verificó que el cloruro de amonio y la concanamicina A aumentaran el pH endosomal en las condiciones determinadas. Para ello se utilizó el colorante naranja de acridina, que se acumula en el interior de las vesículas ácidas intracelulares y emite una fluorescencia naranja, en cambio en condiciones de pH alcalino colorea por igual ácidos nucleicos y vesículas emitiendo en verde (Palmgren, 1991). Se trataron monocapas de ambos tipos celulares con 50 mM de cloruro de amonio o 10 nM de concanamicina A durante 1 h a 37 °C, luego de ese tiempo se agregó al medio de cultivo naranja de acridina en una concentración final de 1 µg/ml durante 15 min y se procedió a la observación de las células teñidas en el microscopio de fluorescencia. En la figura R.2.B se observa que los controles no tratados presentan el sistema vesicular celular teñido de color naranja brillante, indicativo de pH ácido, a diferencia de los cultivos tratados que presentan una fluorescencia verde

característica del pH alcalino y una ausencia total de vesículas teñidas de naranja. Se concluye que los tratamientos son altamente efectivos en generar un aumento de pH en las vesículas celulares.



**Figura R.2: Efecto de inhibidores de la acidificación endosomal.** **A.** Cultivos celulares se trataron con concentraciones crecientes de las drogas durante 2 h y luego se evaluó la viabilidad celular por el método de MTS. **B.** Las células se trataron con cloruro de amonio 50 mM o concanamicina A 10 nM durante 1h a 37°C, luego se agregó naranja de acridina (1 µg/ml) durante 15 min y se montaron los vidrios sobre una gota de PBS para su observación al microscopio de fluorescencia. Aumento 400X. **C.** Las células se pretrataron durante 1 h con concentraciones crecientes de ambas drogas y luego se infectaron con DENV-3 (m.i. 0,1 UFP/célula) en presencia de las mismas. Después de 1 h de incubación, se retiraron los inóculos virales, se agregó MM y se determinaron los rendimientos virales a las 48 h p.i. por el método de UFP en células Vero. **D.** Las células se trataron con cloruro de amonio 50 mM o concanamicina A 10 nM durante 1h a 37°C y luego se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) en presencia de las drogas. A las 24 h p.i. se fijaron las células y se procesaron para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 100X. **E.** Células tratadas con las drogas como en D se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) en presencia de las mismas. Luego de 1 h de infección, las células se trataron con proteinasa K (1mg/ml) y se cuantificó el virus internalizado mediante un ensayo de centros infecciosos en células Vero. En A, C y E los resultados se expresan como el valor medio de tres réplicas independientes  $\pm$  DE y los asteriscos indican significancia estadística respecto del control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

Con el objetivo de estudiar el efecto del aumento de pH de los endosomas sobre la infección se procedió a realizar un ensayo de rendimiento viral en células Vero y A549 tratadas con concentraciones crecientes de cloruro de amonio y concanamicina A antes y durante 1 h de infección. En la figura R.2.C se observa que en esas condiciones los rendimientos virales a las 48 h p.i. se ven significativamente inhibidos con ambas drogas con valores máximos de inhibición de 93-100 % en células Vero y 88-100 % en células A549. De manera similar, también se observó una fuerte disminución en el número de células que expresan glicoproteína E viral a las 24 h p.i. (Figura R.2.D).

Para corroborar el requerimiento de pH ácido en las etapas tempranas de la infección se procedió a analizar el efecto del incremento de pH sobre la internalización viral por medio del ensayo de centros infecciosos. En la figura R.2.E se evidencia una fuerte y significativa inhibición de la internalización de los viriones cuando tiene lugar en presencia de cloruro de amonio o concanamicina A.

El conjunto de los resultados aquí presentados verifican la necesidad de pH ácido endosomal para la entrada de DENV-3 en células Vero y A549.

### *1.3. La endocitosis mediada por clatrina como posible vía de entrada de DENV-3*

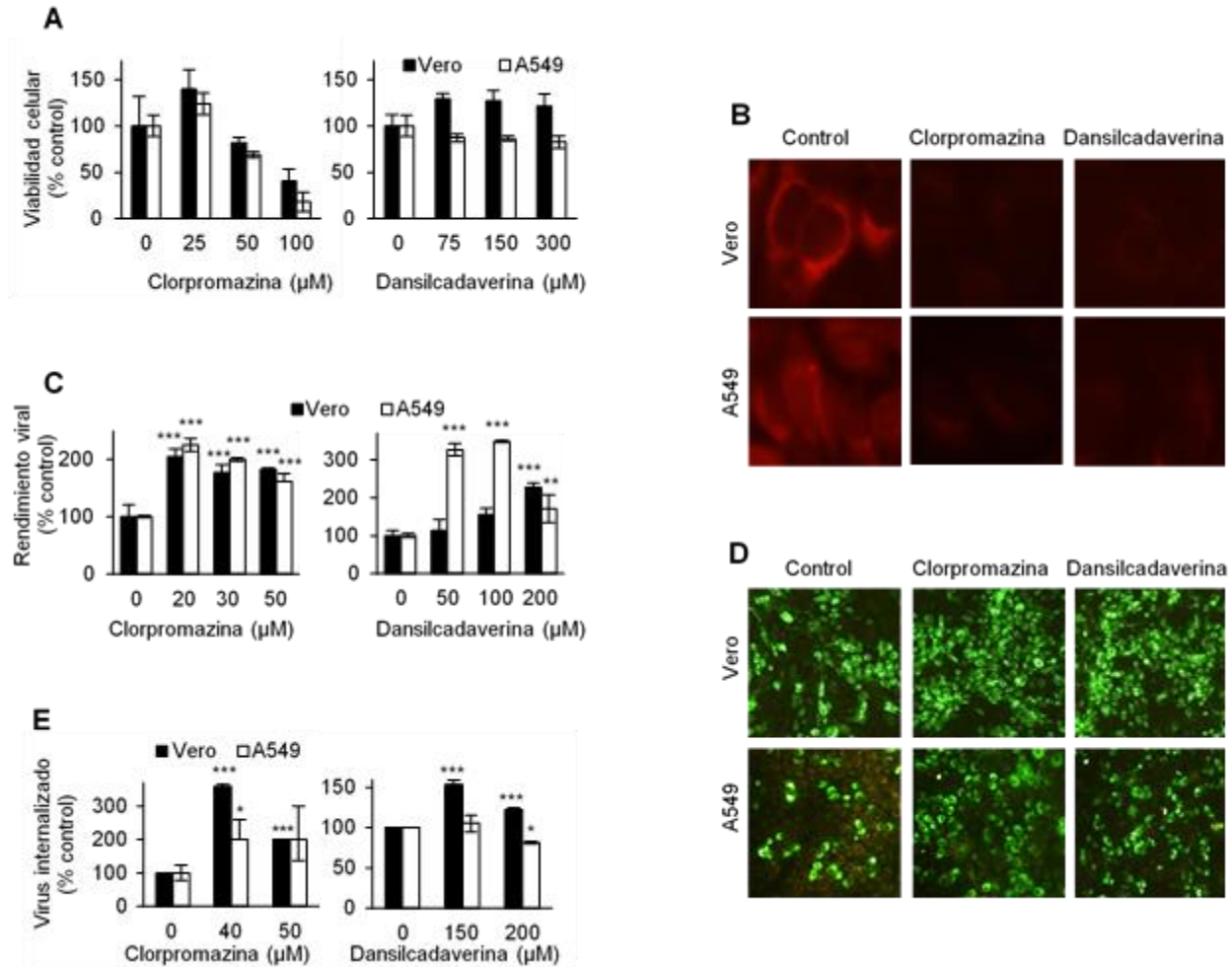
La endocitosis mediada por clatrina es la vía dependiente de pH ácido utilizada por una amplia variedad de virus para entrar a la célula, incluido DENV en ciertas líneas celulares (Acosta *et al.*, 2008; 2009; 2011; Mercer *et al.*, 2010; Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). Se evaluó la participación de esta vía endocítica en la entrada de DENV-3 a células Vero y A549 utilizando inicialmente dos inhibidores farmacológicos de la endocitosis dependiente de clatrina: clorpromazina y dansilcadaverina. La primera ejerce su acción al perturbar el ensamblaje de la clatrina en las invaginaciones de la membrana plasmática celular (Wang *et al.*, 1993), en cambio, la segunda impide la internalización de los complejos ligando receptor porque inhibe su agrupamiento (Levitzi *et al.*, 1980).

En primer lugar se determinaron las concentraciones no citotóxicas de ambos compuestos en células Vero y A549 mediante el método de MTS. En la figura R.3.A se

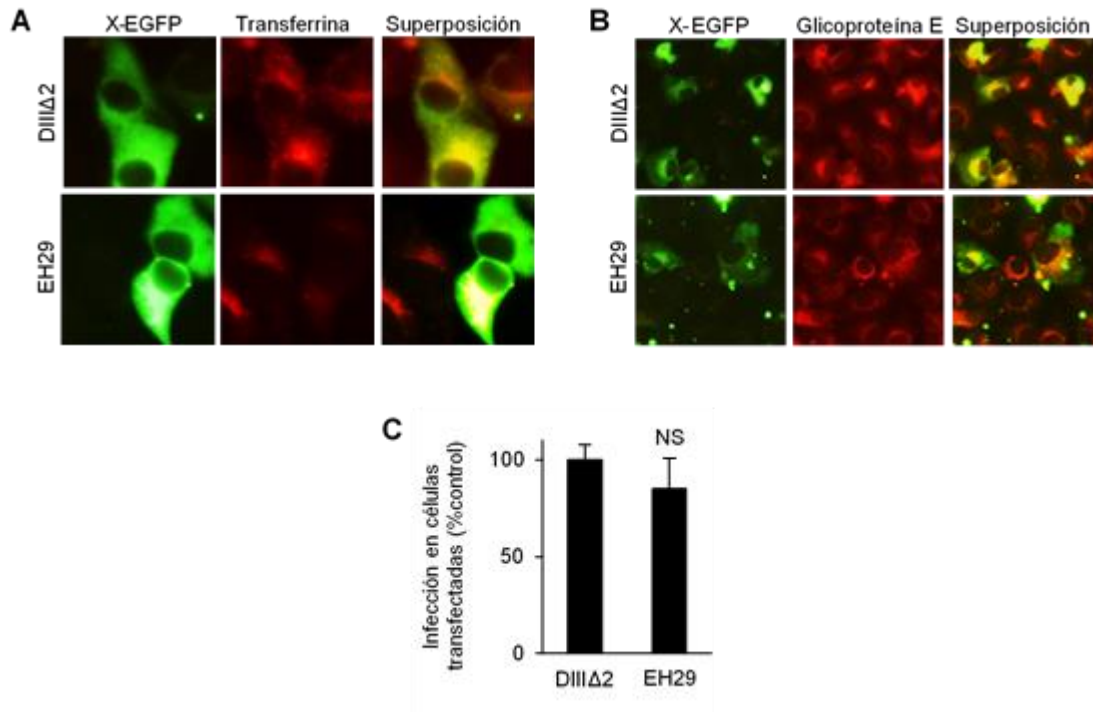
observa que la concentración máxima no citotóxica para ambos tipos celulares es de 50  $\mu$ M para clorpromazina y 200  $\mu$ M para dansilcadaverina.

La inhibición de la endocitosis dependiente de clatrina por acción de ambas drogas se comprobó con transferrina, proteína reconocida como marcador de esta vía de entrada (Dautry-Varsat, 1986). En la figura R.3.B se observa que en los cultivos no tratados, el ligando marcado fluorescentemente fue incorporado al interior de la célula, mientras que en las células tratadas con las drogas se observa una fluorescencia muy tenue, prácticamente nula. Por lo tanto, las concentraciones no citotóxicas presentan actividad inhibitoria de la endocitosis mediada por clatrina.

Luego se determinó el efecto de la inhibición de la endocitosis dependiente de clatrina sobre la multiplicación de DENV-3 mediante un ensayo de rendimiento viral. Como se observa en la figura R.3.C no hubo inhibición de la multiplicación viral en presencia de las drogas. Por el contrario, en las células donde la vía de entrada dependiente de clatrina se encuentra bloqueada se produjo un significativo aumento en los rendimientos de DENV-3, con incrementos en los títulos que pueden llegar a 200-300 % según la droga y el tipo de célula. Asimismo, se detectó un aumento en el número de células que expresan glicoproteína E viral en los cultivos tratados e infectados en las mismas condiciones experimentales en comparación con los cultivos controles (Figura R.3.D). Por último, el número de viriones internalizados en forma productiva, tal como se determina mediante un ensayo de centros infecciosos luego de 1h de infección, también resultó significativamente aumentado en presencia de clorpromazina o dansilcadaverina (Figura R.3.E). En conclusión, DENV-3 no sólo no utiliza la vía de endocitosis mediada por clatrina para infectar productivamente a las células Vero y A549, sino que incluso el bloqueo de esa vía parece favorecer la infección.



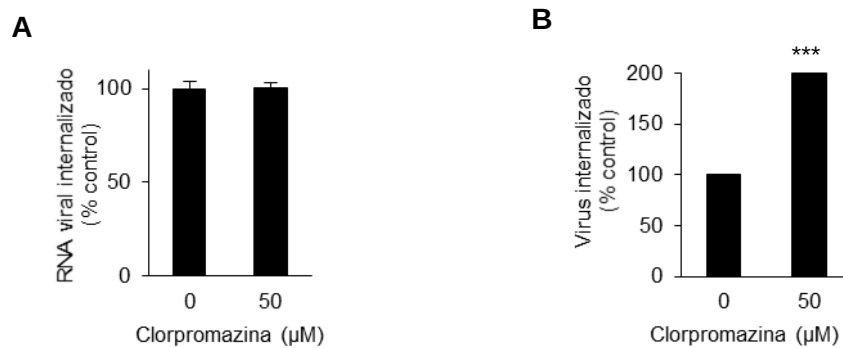
**Figura R.3: Efecto de inhibidores farmacológicos de la endocitosis mediada por clatrina sobre la entrada de DENV-3.** **A.** Cultivos celulares se trataron con concentraciones crecientes de clorpromazina durante 3 h y de dansilcadaverina durante 90 minutos. Luego se evaluó la viabilidad celular por el método de MTS. **B.** Células se trataron con clorpromazina 50  $\mu\text{M}$  durante 2 h o dansilcadaverina 200  $\mu\text{M}$  durante 30 min a 37°C. Luego se incubaron con transferrina-TRITC (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 1 h a 37 °C y fueron fijadas para su observación al microscopio de fluorescencia. Aumento 400X. **C.** Las células se pretrataron durante 2 h o 30 min con concentraciones crecientes de clorpromazina o dansilcadaverina, respectivamente, y luego se infectaron con DENV-3 (m.i. 0,1 UFP/célula) en presencia de las drogas. Después de 1 h de incubación, se retiraron los inóculos virales, se agregó MM y se determinaron los rendimientos virales a las 48 h p.i. por el método de UFP en células Vero. **D.** Células pretratadas con las drogas como en B se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) en presencia de las mismas. A las 24 h p.i. se fijaron las células y se procesaron para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 100X. **E.** Células pretratadas con las drogas como en C se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) en presencia de las mismas. Luego de 1 h de infección, las células se trataron con proteinasa K (1mg/ml) y se cuantificó el virus internalizado mediante un ensayo de centros infecciosos en células Vero. En A, C y E los resultados se expresan como el valor medio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE y los asteriscos indican significancia estadística respecto del control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).



**Figura R.4: Efecto del inhibidor molecular de Eps15 sobre la infección de DENV-3 en células Vero. A.** Cultivos celulares se transfectaron con los plásmidos que expresan la proteína Eps 15 DIIIΔ2 (salvaje) o EH29 (mutante dominante negativa) fusionadas a EGFP y a las 24 h se incubaron con transferrina-TRITC (15 µg/ml) durante 1h a 37°C. Los cultivos se fijaron y montaron para su observación al microscopio de fluorescencia. Aumento 1000X. **B.** Células transfectadas como en A, se infectaron a las 24 h post-transfección con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula). A las 24 h p.i. los cultivos se procesaron para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 400X. **C.** Cuantificación de células infectadas sobre 250 células transfectadas en los preparados realizados en B. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones independientes ± DE. NS: no significativo.

Debido a que los inhibidores farmacológicos pueden presentar efectos pleiotrópicos, se procedió a corroborar el rol de la endocitosis dependiente de clatrina en la entrada de DENV-3 utilizando un inhibidor molecular específico. La interacción de la proteína Eps 15 y el complejo adaptador de clatrina AP-2 es esencial para el normal funcionamiento de la endocitosis mediada por clatrina (Benmerah *et al.*, 1998). La sobreexpresión de EH 29, una mutante dominante negativa de Eps 15 que presenta deletados dos motivos EH de interacción proteína-proteína, interfiere con la formación de vesículas de clatrina específicamente sin afectar las rutas de entrada independientes de clatrina (Benmerah *et al.*, 1999). En la figura R.4.A se observa el efectivo bloqueo de la endocitosis dependiente de clatrina, que impide la incorporación a la célula de la proteína marcadora transferrina, cuando las células Vero fueron transfectadas con el plásmido que expresa la mutante EH29 fusionada a EGFP y el normal funcionamiento de la vía frente a la transfección con el plásmido control DIIIΔ2, que expresa una versión truncada de Eps15

que no interfiere con la ruta de entrada por clatrina. Luego, células Vero transfectadas con las respectivas construcciones plasmídicas se infectaron con DENV-3 y a las 24 h p.i. se detectó la expresión de EGFP y la producción de antígeno viral por inmunofluorescencia. El porcentaje de células transfectadas e infectadas con DENV-3 es similar en los cultivos que expresan la proteína control o la proteína mutante (Figuras R.4.B y R.4.C), confirmando que hay infección productiva de células Vero con DENV-3 en ausencia de endocitosis dependiente de clatrina.



**Figura R.5: Aumento de la multiplicación viral frente al tratamiento con clorpromazina.** **A.** Células Vero se pretrataron por 2 h con clorpromazina 50 μM y se infectaron en presencia de la droga con DENV-3 (m.i. 1 UFP /célula) durante 1 h a 37 °C. Luego se removió el virus extracelular con buffer citrato (pH 3), se extrajo el RNA total intracelular y se determinó el número de moléculas de RNA de DENV-3 por RT-PCR cuantitativa. **B.** Células Vero fueron pretratadas e infectadas como en A y luego de 1 h a 37 °C se procesaron para cuantificar el número de UFP internalizadas por centros infecciosos. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones independientes ± DE. Los asteriscos indican significancia estadística respecto del control (\*\*p<0,001).

Con el fin de dilucidar las razones del sorprendente y considerable aumento en el número de viriones internalizados cuando la vía de ingreso dependiente de clatrina está bloqueada, se evaluó en paralelo, por RT-PCR cuantitativa, la cantidad de moléculas de RNA viral internalizadas en presencia o ausencia de clorpromazina. Cultivos de células Vero pre-tratados con clorpromazina durante 2 h se infectaron con DENV-3 a una m.i. 1 UFP/célula durante 1 h a 37 °C y luego se cuantificó el RNA viral internalizado. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de genomas virales en el interior de la célula luego de una hora de infección al comparar el cultivo control y el tratado con clorpromazina (Figura R.5A). Por el contrario, la cantidad de partículas virales que completaron una infección productiva en las mismas condiciones, medidas por centros infecciosos, mostraron un incremento del 200 % (Figura R.5B), tal como se había observado anteriormente. Por lo tanto, el aumento en el virus infeccioso internalizado y,

posteriormente, en la producción viral cuando está obstruida la vía de clatrina no se debe a una diferencia en el número de viriones que ingresan a la célula sino a la más eficiente utilización de la ruta de entrada independiente de clatrina que conduce a una infección productiva.

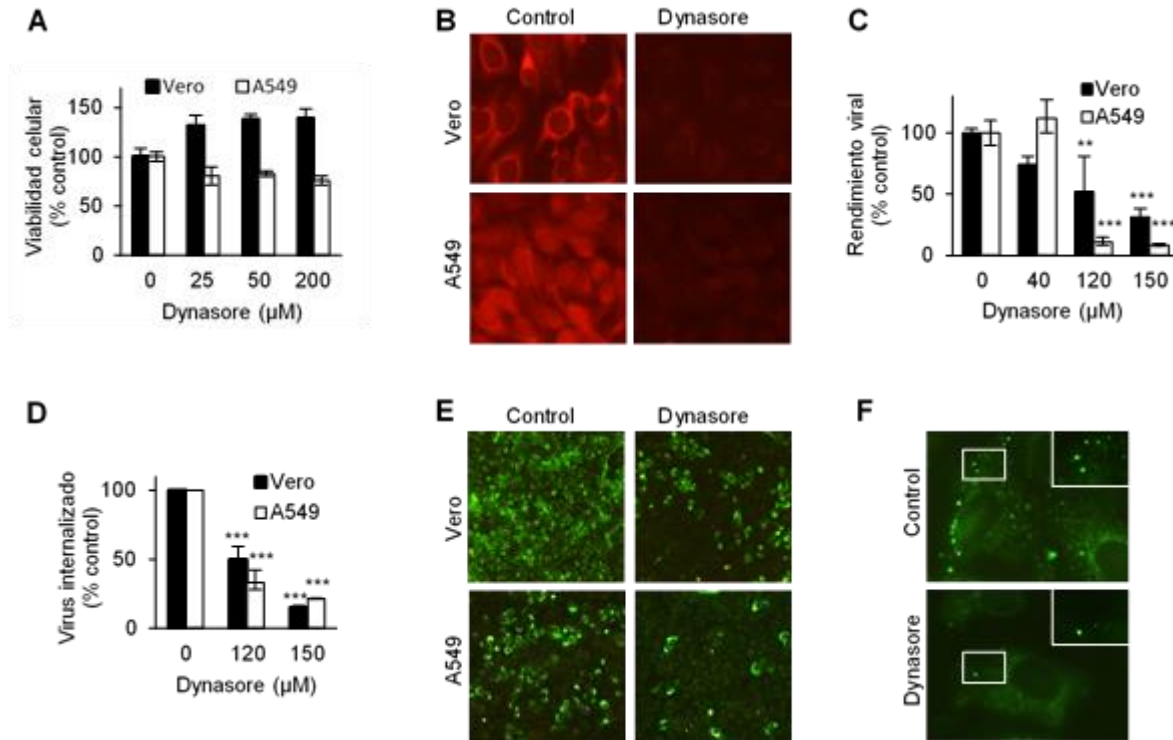
#### *1.4. Estudio de la participación de la proteína dinamina en la entrada de DENV-3*

Dinamina es una proteína motora que participa en la escisión de las vesículas en formación en la membrana plasmática. La actividad de dinamina es esencial para la endocitosis mediada por clatrina o por caveolas, pero no siempre está involucrada en otras vías endocíticas no clásicas (Marsh & Helenius, 2006; Acosta *et al.*, 2008; Mercer, 2010). Para investigar la participación de dinamina en la entrada de DENV-3 a células Vero y A549 se utilizó dynasore, un potente inhibidor específico de la actividad GTPasa de las proteínas dinamina I, dinamina II y Drp1, una dinamina mitocondrial (Macia *et al.*, 2006).

En primera instancia se determinó que dynasore presentara actividad inhibitoria de dinamina en concentraciones no citotóxicas. En la figura R. 6A se observa que la viabilidad celular no se vio afectada significativamente hasta la máxima concentración ensayada de 200  $\mu$ M. En la figura R. 6.B se evaluó la inhibición de dinamina, utilizando como marcador a la proteína transferrina que depende para su ingreso de clatrina y, por ende, de dinamina. En el citoplasma de las células control se observa en rojo brillante la presencia de la transferrina marcada con el fluoróforo, por lo que se deduce que pudo ingresar por endocitosis; en cambio, cuando ambos tipos celulares fueron tratados con dynasore 150  $\mu$ M durante 2 h las células presentaron un patrón fluorescente difuso y opaco, evidenciando la ausencia o mínimo ingreso de transferrina-TRITC.

Una vez definidas las condiciones óptimas de trabajo se evaluó el efecto de dynasore sobre la infección con DENV-3. El tratamiento con esta droga produjo una significativa reducción en la producción de virus infeccioso a las 48 h p.i. (Figura R.6.C), en la cantidad de virus infectivo internalizado (Figura R.6.D) y, en el número de células que expresan la glicoproteína viral E (Figura R.6.E) en células Vero y en células A549.

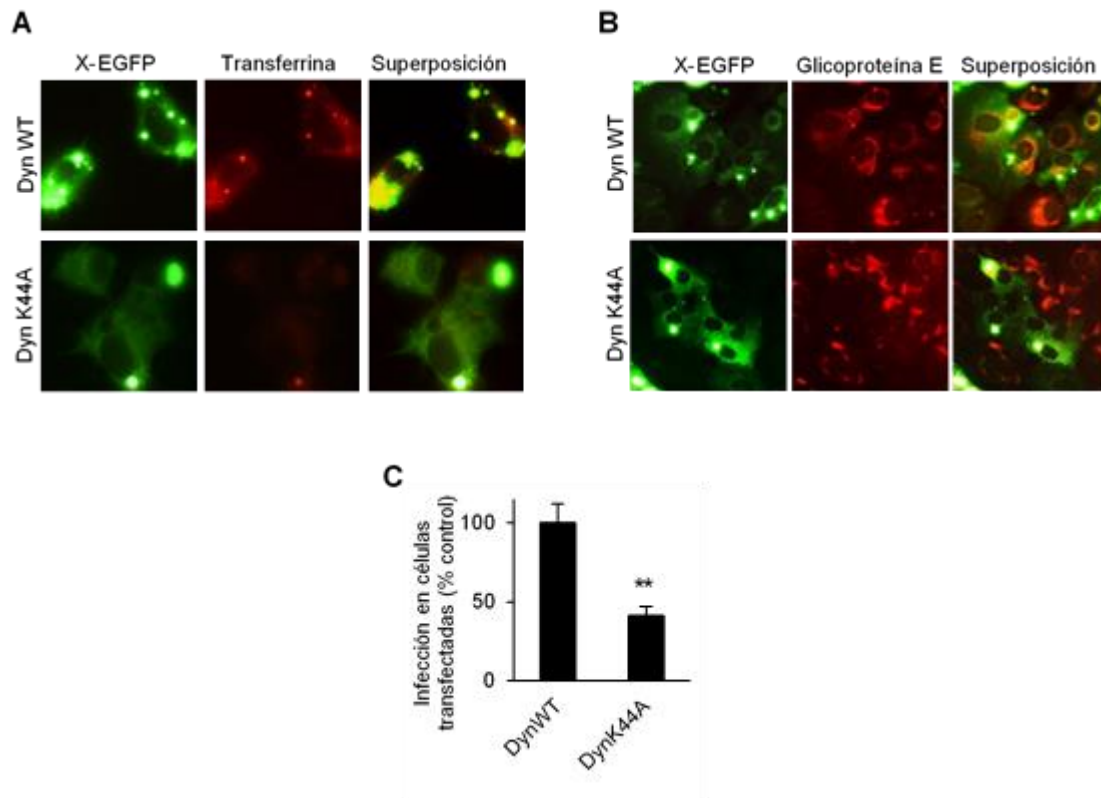




**Figura R.6: Efecto de un inhibidor farmacológico de dinamina sobre la entrada de DENV-3.** **A.** Cultivos celulares se trataron con concentraciones crecientes de dynasore durante 2 h y luego se evaluó la viabilidad celular por el método de MTS. **B.** Las células se trataron con dynasore 150 μM durante 1 h a 37°C y luego se agregó transferrina-TRITC (15 μg/ml) en presencia de la droga durante 1 h a 37°C. Los cultivos fijados se observaron al microscopio de fluorescencia. Aumento 400X. **C.** Las células se pretrataron durante 1 h con concentraciones crecientes de dynasore y se infectaron con DENV-3 (m.i. 0,1 UFP/célula) en presencia del compuesto. Luego de 1 h de incubación, se retiraron los inóculos virales, se agregó MM y se determinó el rendimiento viral a las 48 h p.i. por el método de UFP en células Vero. **D.** Células pretratadas como en C se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) durante 1 h a 37°C en presencia de dynasore, luego las células se trataron con proteinasa K (1mg/ml) y se cuantificó el virus internalizado mediante un ensayo de centros infecciosos en células Vero. **E.** Células pretratadas como en B se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/ml) durante 1 h en presencia de la droga. Se fijaron a las 24 h p.i. y se procesaron para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 100X. **F.** Células Vero pretratadas con dynasore como en B, se infectaron con DENV-3 (m.i. 10 UFP/célula) en presencia de la droga y a los 30 min p.i. fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 1000X. En A, C y D los resultados se expresan como el valor medio de tres determinaciones independientes ± DE y los asteriscos indican significancia estadística respecto del control (\*p<0,05; \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001).

Finalmente, como la formación y escisión de las vesículas endosomales son eventos extremadamente tempranos, se examinó la acción de dynasore sobre la entrada de DENV-3 a los 30 min p.i., por detección de la glicoproteína E por inmunofluorescencia indirecta. En las células infectadas no tratadas con droga se observa un patrón de fluorescencia puntillado de la glicoproteína E en el citoplasma y en la región perinuclear, indicando que las partículas virales fueron internalizadas (Figura R.6.F). En presencia de

dynasore, hay una drástica reducción en la fluorescencia brillante y puntillada en el interior de la célula.



**Figura R.7: Efecto del inhibidor molecular de dinamina-II sobre la infección de DENV-3 en células Vero.** **A.** Cultivos celulares se transfectaron con los plásmidos que expresan la proteína dinamina Dyn WT (salvaje) o Dyn K44A (mutante dominante negativa) fusionada a EGFP y a las 24 h se incubaron con transferrina-TRITC durante 1h a 37°C. Los cultivos se fijaron y montaron para su observación al microscopio de fluorescencia. Aumento 1000X. **B.** Células transfectadas como en A, se infectaron a las 24 h post-transfección con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula). A las 24 h p.i. los cultivos se procesaron para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 400X. **C.** Cuantificación de células infectadas sobre 250 células transfectadas en los preparados realizados en B. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE y los asteriscos indican significancia estadística respecto del control (\*\* $p < 0,01$ ).

La participación de dinamina en la entrada de DENV-3 se aseguró utilizando como inhibidor molecular específico la mutante dominante negativa de dinamina dyn II K44A, una versión de esta proteína que posee reducida su capacidad de unión e hidrólisis de GTP (Oh *et al*, 1998; Sauvonnnet *et al*, 2005). Como control se verificó el bloqueo en la internalización de transferrina en células Vero transfectadas con el plásmido que expresa dinamina mutante fusionada a EGFP (EGFP-dyn II K44A), en comparación con células transfectadas con el plásmido que expresa la correspondiente proteína salvaje (EGFP-

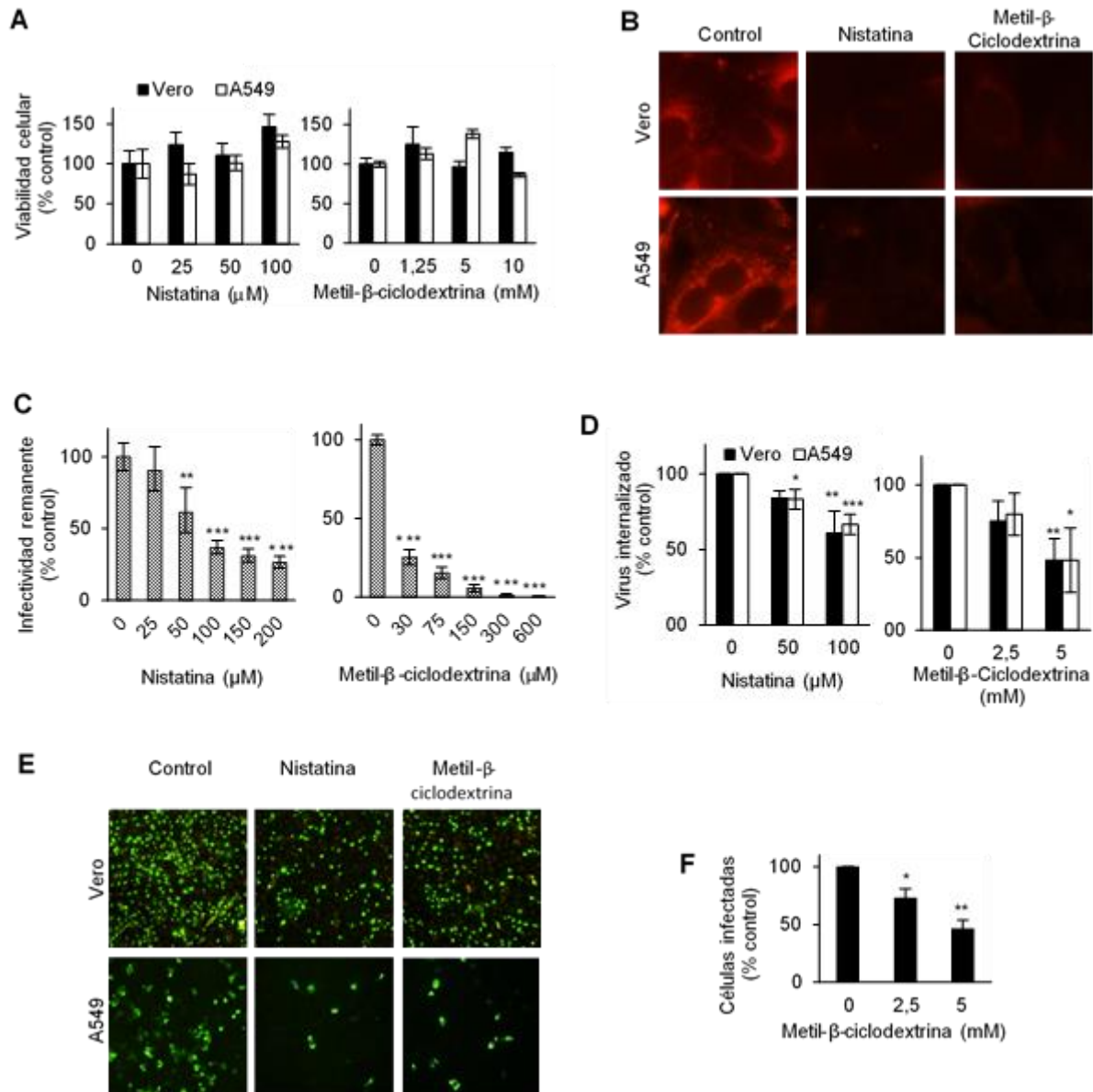
dyn II wt) (Figura R.7.A). Luego, células Vero transfectadas con cada plásmido se infectaron con DENV-3 y a las 24 h p.i. los cultivos se procesaron para revelar la glicoproteína viral por inmunofluorescencia y se realizó el recuento de aproximadamente 250 células transfectadas. En concordancia con los resultados obtenidos con el inhibidor químico, la infección con DENV-3 resultó significativamente reducida por la expresión de la dinamina mutada dyn II K44A (Figura R.7.B y C).

### 1.5. Evaluación del efecto del colesterol sobre la entrada de DENV-3

El colesterol afecta la fluidez de las membranas celulares y participa en distintos mecanismos endocíticos, como por ejemplo la endocitosis mediada por caveolas y la entrada dependiente de *lipid-rafts* (Mercer *et al.*, 2010; Ewers *et al.*, 2011). Por ello, se estudió a continuación el efecto sobre la entrada de DENV-3 de drogas que interaccionan con colesterol alterando las membranas que lo contienen. La nistatina es un polieno que desestructura las membranas al formar agregados de colesterol produciendo poros (Bolard, 1986; Silva *et al.*, 2006) y la metil- $\beta$ -ciclodextrina es un oligosacárido cíclico de  $\alpha$ -D-glucopiranosido, su estructura con forma de cono le permite albergar en su interior moléculas hidrófobas aumentando su solubilidad, por lo que extrae el colesterol de las membranas celulares (Ohtani *et al.*, 1989; Rodal *et al.*, 1999).

En la figura R.8.A se muestra la ausencia de citotoxicidad de ambas drogas en células Vero y A549 en las condiciones ensayadas. La toxina colérica es un ligando que ingresa a las células por la vía de caveolas/*lipid-rafts*, con requerimiento de colesterol, por lo que es un marcador de dicha vía (Lajoie & Nabi, 2007). Los tratamientos con nistatina 50  $\mu$ M y con metil- $\beta$ -ciclodextrina 5 mM impidieron la internalización de la toxina colérica, mientras que en los cultivos no tratados esta proteína estuvo distribuida en el citoplasma celular (Figura R.8.B), verificando la efectiva alteración del colesterol en las membranas celulares por acción de ambos compuestos.

DENV brota de las células llevando consigo parte de la membrana celular, la cual conforma su envoltura, por lo cual se evaluó el efecto de nistatina y de metil- $\beta$ -ciclodextrina sobre la envoltura viral y sus consecuencias en la infectividad de DENV-3 en un ensayo virucida. El tratamiento con ambas drogas de una suspensión de DENV-3 conteniendo  $1 \times 10^6$  UFP durante 1 h a 37 °C redujo drásticamente la capacidad de infectar



**Figura R.8: Importancia del colesterol en la internalización de DENV-3.** **A.** Cultivos celulares se trataron con concentraciones crecientes de nistatina durante 6 h o de metil- $\beta$ -ciclodextrina por 2 h. Luego se evaluó la viabilidad celular por el método de MTS. **B.** Las células se trataron con nistatina 50  $\mu\text{M}$  durante 5 h o metil- $\beta$ -ciclodextrina 5 mM durante 1 h, luego se incubaron con toxina colérica-Alexa555 (0,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 1 h. Los cultivos se fijaron y observaron al microscopio de fluorescencia. Aumento 1000X. **C.** Suspensiones virales de DENV-3 ( $1 \times 10^6$  UFP/ml) se incubaron con concentraciones crecientes de ambas drogas durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Luego se tituló la infectividad remanente mediante el método de UFP en células Vero. **D.** Las células se pre-trataron durante 5 h con concentraciones crecientes de nistatina o durante 2 h con metil- $\beta$ -ciclodextrina, luego se lavaron exhaustivamente e infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) durante 1 h. Después las células se trataron con proteinasa K y se cuantificó el virus internalizado mediante un ensayo de centros infecciosos en células Vero. **E.** Células tratadas como en B se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula). A las 24 h p.i. se fijaron las células y se procesaron para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 100X. **F.** Cuantificación del porcentaje de células que expresan glicoproteína E a partir del recuento de 20 campos tomados al azar de los cultivos de células Vero tratados con metil- $\beta$ -ciclodextrina. En A, C, D y F los resultados se expresan como el valor medio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE y los asteriscos indican significancia estadística respecto del control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

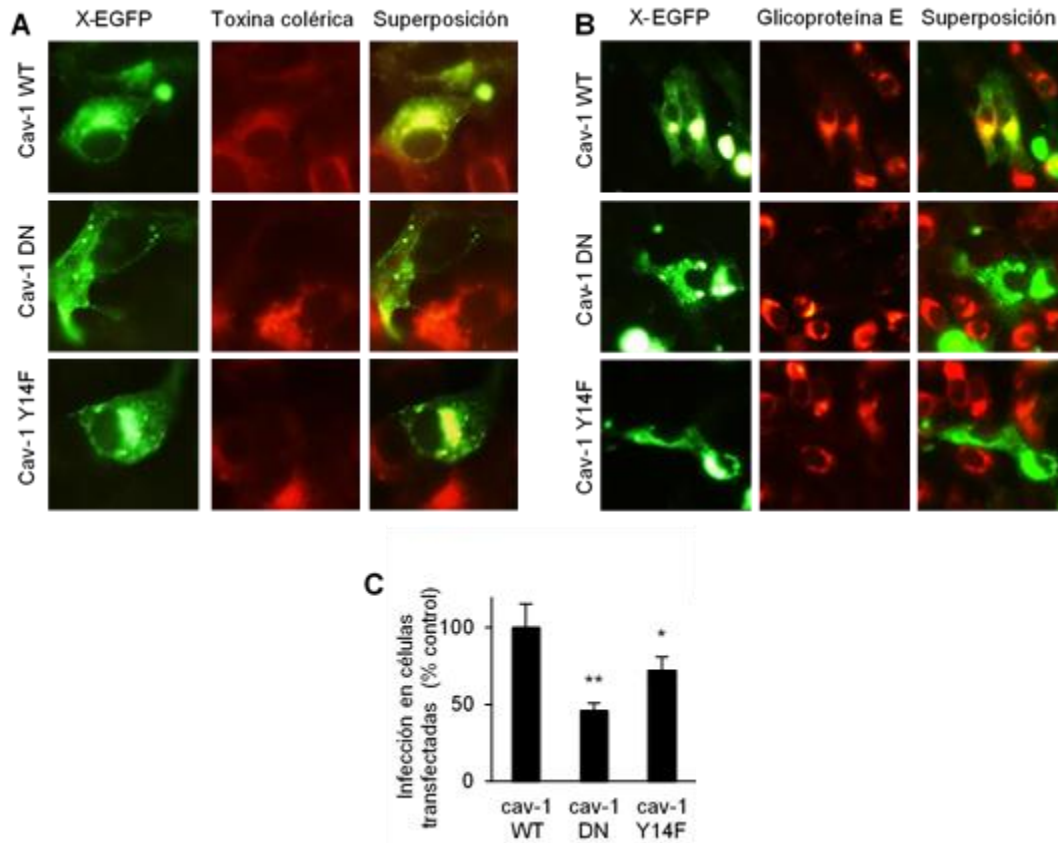
células Vero (Figura R.8.C). Esto implica que en los subsiguientes experimentos sólo se realizaron pretratamientos de los cultivos celulares seguidos de varios lavados para remover toda traza de las drogas y evitar el contacto de las mismas con los viriones.

El cambio en la composición lipídica de las membranas plasmáticas a causa de la formación de agregados o la extracción de colesterol por el pretratamiento con nistatina o metil- $\beta$ -ciclodextrina derivó en una disminución significativa de la internalización de DENV-3 en el orden de 40-50 % (Figura R.8.D) y en la reducción del número de células que expresan glicoproteína E viral luego de 24 h de infección (Figura R.8.E). Particularmente en el ensayo de inmunofluorescencia, las reducciones en el número de células Vero que expresan glicoproteína viral en cultivos pretratados con metil- $\beta$ -ciclodextrina 2,5 mM y 5 mM no superaron el 50 % pero fueron estadísticamente significativas (Figura R.8.F).

#### *1.6. La endocitosis dependiente de caveolas como posible vía de entrada de DENV-3*

Es ampliamente conocida la dependencia de colesterol que presenta la endocitosis mediada por caveolas (Root *et al.*, 2015) y como la infección de DENV-3 estuvo parcialmente disminuida por la alteración en la composición de colesterol de las membranas celulares, se procedió a evaluar la participación de esta vía endocítica en la entrada de DENV-3 a células Vero empleando inhibidores moleculares específicos.

La proteína caveolina-1 (cav-1) desempeña un papel integral en la regulación y mediación de la endocitosis de caveolas (Root *et al.*, 2015). La fusión de EGFP en el extremo carboxilo terminal de la proteína cav-1 no afecta la funcionalidad de la proteína y permite utilizar esta construcción como control (cav-1-wt), mientras que la fusión de EGFP en el amino-terminal altera su función actuando como mutante dominante negativa (cav-1-DN) (Pelkmans *et al.*, 2001). Otra mutante de cav-1, denominada cav-1-Y14F, se ha generado por una mutación que impide la fosforilación de la proteína en la tirosina Y14 y bloquea su internalización (Coyne & Bergelson, 2006).



**Figura R.9: Evaluación de la participación de caveolina-1 en la infección de células Vero con DENV-3.** **A.** Cultivos celulares se transfectoron con los plásmidos que expresan las proteínas Cav-1 WT (salvaje) o Cav-1 DN y Cav-1 Y14F (ambas mutantes dominantes negativas) fusionadas a EGFP, y a las 24 h se incubaron con toxina colérica-Alexa555 (0,3 µg/ml) durante 1 h a 37°C. Los cultivos se fijaron y montaron para su observación al microscopio de fluorescencia. Aumento 1000X. **B.** Células transfectadas como en A, se infectaron a las 24 h post-transfección con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula). A las 24 h p.i. los cultivos se procesaron para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 400X. **C.** Se seleccionaron células con niveles semejantes de expresión de EGFP para la cuantificación de células infectadas sobre 250 células transfectadas en los preparados realizados en B. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE y los asteriscos indican significancia estadística respecto del control (\* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ ).

En primer lugar se verificó que en células Vero transfectadas con el plásmido cav-1-wt no se afectó la incorporación de toxina colérica, proteína marcadora de la vía de caveolas, observándose superposición en el citoplasma de EGFP y fluorescencia roja (Figura R.9.A). Por el contrario, en las células transfectadas con los plásmidos que expresan ambas mutantes dominantes negativas de cav-1 sólo se detecta EGFP y no hay marca de toxina colérica. Cuando células transfectadas con las tres construcciones plasmídicas se infectaron con DENV-3, se detectó a las 24 h p.i. reducción en el número de células que simultáneamente expresan glicoproteína viral y las mutantes dominantes negativas de cav-1 (Figura R.9.B y C). Estos resultados, junto con el efecto de las drogas

que afectan al colesterol, sugieren que la endocitosis mediada por caveolas estaría participando en la infección por DENV-3 a células Vero.

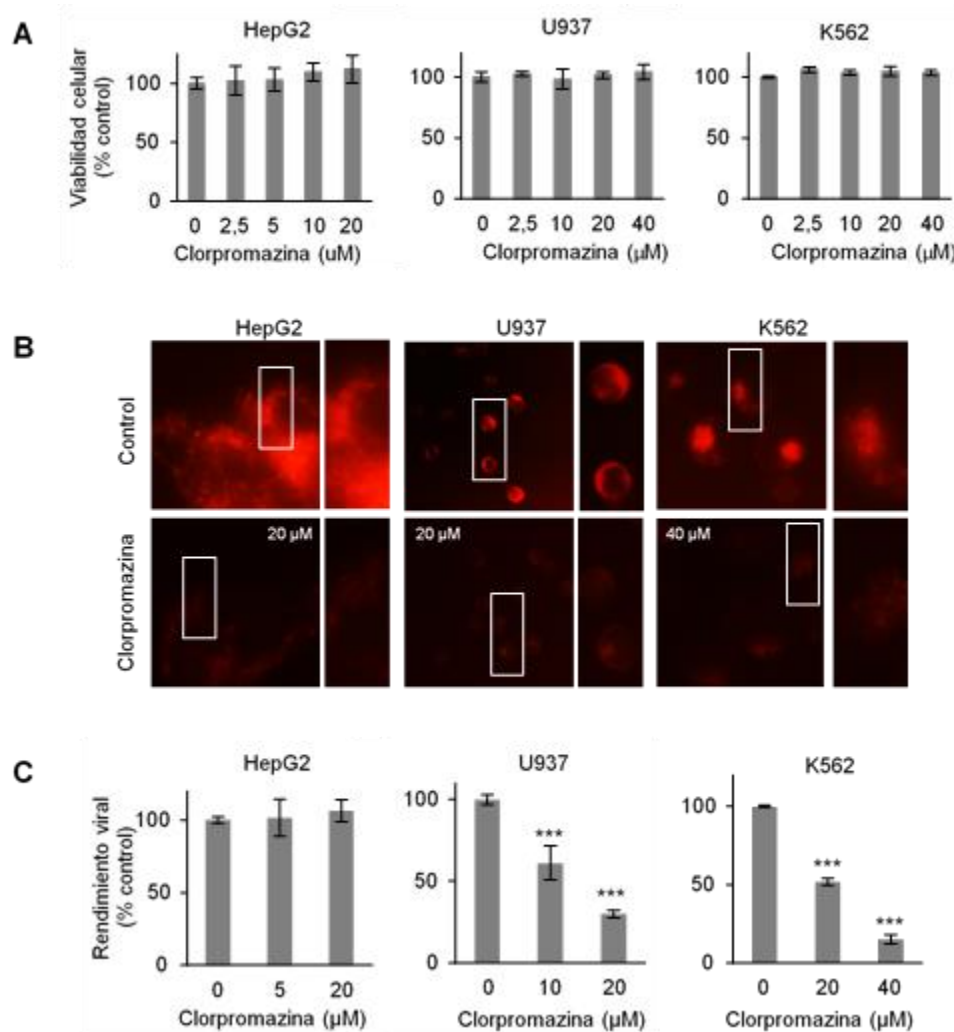
### *1.7. El requerimiento de clatrina para la entrada de DENV-3 depende de la célula huésped*

El resultado más llamativo que se obtuvo al estudiar la ruta endocítica empleada por DENV-3 para entrar a células Vero y A549 fue la independencia de la endocitosis mediada por clatrina para la entrada productiva de DENV-3 en dichas células y la mayor efectividad de la infección viral cuando la vía de clatrina está bloqueada. En contraposición, estudios previos de nuestro grupo reportaron que la entrada de DENV-3 a células de mosquito C6-36, al igual que los restantes serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-4, ocurre por endocitosis dependiente de clatrina (Acosta *et al.*, 2011). A raíz de estas diferencias atribuibles a la célula huésped, se decidió extender la evaluación de la dependencia de clatrina para la entrada a otras líneas celulares humanas, seleccionando modelos más representativos de la infección natural. Se determinó el efecto de clorpromazina como droga marcadora de la entrada mediada por clatrina. Una de las líneas celulares ensayadas fue HepG2, derivadas de carcinoma hepacelular humano, ya que está documentada la presencia de antígeno y ácido nucleico de DENV en el hígado de pacientes con DF (Couvelard *et al.*, 1999; Rosen *et al.*, 1999). Por otro lado nos interesamos en realizar también estos estudios en células mieloides, las líneas U937, de origen mielomonocítico, y K562, eritroleucémica, ya que son líneas celulares ampliamente utilizadas en el estudio de la diferenciación de los monocitos (Chanput *et al.*, 2015). Y está documentado que células dendríticas, monocitos y macrófagos son importantes para el ingreso y diseminación del virus *in vivo* (Wu *et al.*, 2000; Alhoot *et al.*, 2011; Schmid & Harris, 2014).

En primer lugar, se establecieron las concentraciones no citotóxicas de clorpromazina en las tres líneas celulares como se muestra en la Figura R10.A, así como el bloqueo efectivo de la vía en estas células mediante la incorporación de transferrina (Figura R.10.B). Cuando se analizó el efecto del tratamiento con clorpromazina sobre los rendimientos virales en las tres líneas celulares, los resultados fueron distintos a los obtenidos previamente en Vero y en A549, y a su vez variaron según el tipo de célula



(Figura R.10.C). En las células hepáticas HepG2 los rendimientos de DENV-3 no estuvieron afectados por el tratamiento con clorpromazina indicando que el virus ingresa por una vía independiente de clatrina, pero a diferencia de lo observado en células Vero y A549 no hubo incremento en la producción viral cuando la vía está bloqueada. Por su



**Figura R.10: Efecto de clorpromazina sobre la entrada de DENV-3 a otras líneas celulares humanas. A.** Cultivos celulares se trataron con concentraciones crecientes de clorpromazina durante 3 h (HepG2) o 4 h (U937 y K562). Luego se evaluó la viabilidad celular por el método de MTS en células HepG2 y por el método de exclusión de Azul de Tripán en células U937 y K562. **B.** Células HepG2 y U937 se trataron con clorpromazina 20 μM y K562 con clorpromazina 40 μM durante 2 h a 37°C. Luego se incubaron con transferrina-TRITC (15 μg/ml) 1 h a 37 °C en presencia de la droga y fueron fijadas para su observación al microscopio de fluorescencia. Aumento 1000X. **C.** Las células se pretrataron durante 2 h con concentraciones crecientes de clorpromazina y luego se infectaron con DENV-3 (m.i. 0,1 UFP/célula en las células HepG2 o 5 UFP/célula en las líneas celulares U937 y K562) en presencia de la droga. Después de 1 h (HepG2) o 2 h (U937 y K562) de incubación, se retiraron los inóculos virales, se agregó MM y se determinaron los rendimientos virales a las 48 h p.i. (HepG2) y a las 72 h p.i. (U937 y K562) por el método de UFP en células Vero. Los resultados presentados en A y C son el promedio de tres determinaciones independientes ± DE y los asteriscos representan la significancia estadística respecto del control no tratado (\*\*p < 0,001)



parte, en células U937 y K562 se registró una significativa inhibición en función de la dosis de clorpromazina, indicativa de una endocitosis dependiente de clatrina para la entrada en estas células. Por lo tanto, la ruta endocítica empleada por DENV-3 en distintas células en cuanto a su dependencia de clatrina es muy variable.

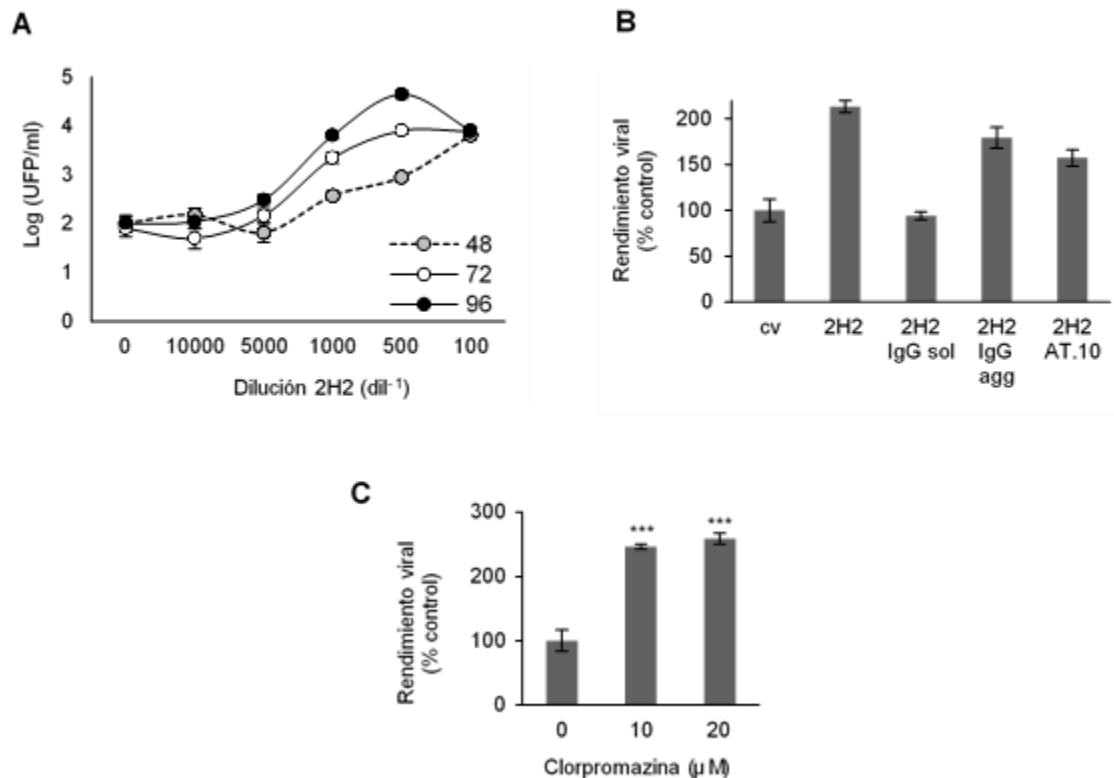
### *1.8. El requerimiento de clatrina para la entrada de DENV-3 en la infección mediada por Ac*

Tal como se mencionó en Introducción, estudios epidemiológicos indican que la reinfección con un serotipo heterólogo de DENV aumenta el riesgo de que la enfermedad progrese a dengue grave, habiéndose propuesto como uno de los mecanismos explicativos el fenómeno de ADE. Es por ello que se decidió evaluar también la participación de la endocitosis mediada por clatrina en la infección de DENV-3 mediada por Ac.

En primer lugar se debió establecer un sistema modelo in vitro de entrada de DENV-3 mediada por Ac. En ausencia de Ac la entrada viral se produce a través de su receptor celular específico, en presencia de Ac el virus forma complejos DENV-3-Ac que pueden entrar a la célula a través de los receptores para Ac  $Fc\gamma R$ . Aquí se utilizó el sistema células U937- Ac 2H2. Las células U937 poseen receptores  $Fc\gamma RIIA$  y B y  $Fc\gamma IA$  (Cameron *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2008), que se ha demostrado pueden mediar la infección con DENV (Rodrigo *et al.*, 2006; Kou *et al.*, 2008), y el Ac monoclonal 2H2 es de la subclase Ig2a y puede ser reconocido tanto por  $Fc\gamma RI$  como  $Fc\gamma RIIA$ , aunque con mayor afinidad por  $Fc\gamma RI$  (Ravetch & Kinet, 1991).

Se incubaron distintas diluciones de Ac 2H2 con una dosis de virus elegida de manera tal que la infección viral en ausencia de Ac, es decir mediada por el receptor viral específico, fuera despreciable y la entrada y producción viral resultante se debieran en forma predominante a la infección mediada por Ac. Por lo tanto, la m.i. al realizar la infección de células U937 con las mezclas virus-Ac resultó inferior a la empleada en la figura R.10 para estudiar la endocitosis por clatrina en ausencia de Ac. Luego de las incubaciones, se infectaron células U937 con las mezclas y se midieron los rendimientos

virales a las 48, 72 y 96 h p.i. Los incrementos máximos de infectividad se produjeron a las 72 - 96 h p.i. con una dilución 1/500 de 2H2 (Figura R.11.A).



**Figura R.11: Efecto de clorpromazina en la infección mediada por Ac de células U937.** **A.** Suspensiones con  $1,5 \cdot 10^5$  UFP de DENV-3 se incubaron con distintas diluciones del Ac 2H2 durante 1h a 37°C. Luego, se infectaron células U937 con las distintas mezclas virus-Ac durante 2 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se lavaron las células con PBS y se las incubó con MM a 37°C, determinando los rendimientos virales en los sobrenadantes a las 48, 72 y 96 h p.i. por UFP en células Vero. **B.** Suspensiones de células U937 se incubaron con 30 μg/ml de IgG solubles, IgG agregadas o Ac AT.10 durante 30 min a 4 °C, luego se infectaron con DENV-3-2H2 durante 2 h a 4°C. Se cosecharon y titularon los sobrenadantes a las 72 h p.i. por UFP en células Vero. **C.** Cultivos celulares tratados con concentraciones crecientes de clorpromazina durante 2 h se infectaron con DENV-3-2H2 por 2 h a 37 °C en presencia de la droga. Luego se retiraron los inóculos y se incubaron en MM. Se titularon los rendimientos virales a las 72 h p.i. por UFP en células Vero. Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE y los asteriscos representan la significancia estadística de los resultados respecto del control no tratado (\*\*\* $p < 0,001$ ).

Para corroborar que el aumento de producción viral observado se debe efectivamente a una entrada viral mediada por los receptores de Ac, se hicieron los controles de bloqueo de dichos receptores. En la figura R.11.B se observa que cuando los receptores celulares FcγRII están bloqueados por la acción de las IgG agregadas o por el Ac monoclonal específico AT.10 el efecto aumentador de la infección permanece, mientras que si los receptores FcγRI están bloqueados por preincubación con IgG solubles el nivel de infección es comparable al mínimo obtenido en ausencia de 2H2. Este

experimento estaría indicando que la infección por DENV-3-2H2 a células U937 sería efectivamente mediada por el receptor FcγRI. Una vez establecido el sistema de infección con DENV-3 mediada por Ac, se evaluó el efecto de clorpromazina. En la figura R.11.C se muestra que no hay inhibición en presencia de la droga sino un aumento en el rendimiento viral, sugiriendo que la entrada de DENV-3-2H2 por FcγRI no sería a través de endocitosis dependiente de clatrina, a diferencia de lo que ocurre en ausencia de Ac (Figura R.10.C).

## 2- EL TRÁNSITO INTRACELULAR DE DENV-3 EN CÉLULAS VERO

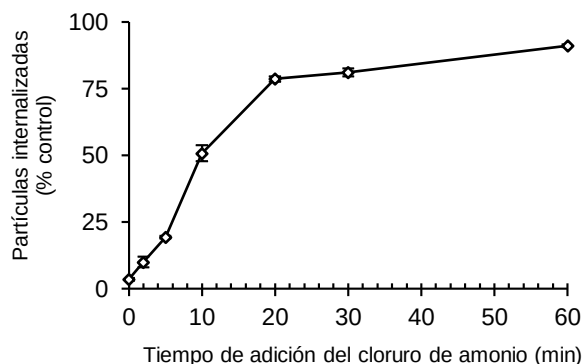
Una vez que los viriones ingresan a la célula resulta esencial para la progresión exitosa del ciclo de multiplicación que el desnudamiento y replicación virales ocurran en el compartimento subcelular propicio para que la infección sea productiva. Para ello los virus presentan diferentes estrategias que involucran procesos celulares como la maduración de los endosomas, hasta encontrar el sitio preciso de fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal, y el transporte a través del citoesqueleto celular. En esta sección, la propuesta fue estudiar el transporte intracelular de DENV-3 que conduce a la fusión en la vesícula endosomal con el consecuente desnudamiento viral y liberación de la nucleocápside al citoplasma, así como la participación del citoesqueleto en los eventos tempranos de la infección.

### *2.1. Análisis de la cinética de fusión de DENV-3 en células Vero*

Los diferentes virus tienen la capacidad de fusionar característicamente en distintos estadios del tránsito intracelular de las vesículas endocíticas. De esa manera se definen tiempos de fusión tempranos, entre 1 y 5 min, que se corresponden con eventos de desnudamiento en endosomas tempranos (Vonderheit & Helenius, 2005; Johannsdottir *et al.*, 2009) y tiempos de fusión tardíos, con valores de entre 10-15 min hasta algunas horas post-internalización cuando la penetración es perinuclear en endosomas tardíos, lisosomas, en alguna de las vías de reciclaje endosomal o en retículo endoplásmico (Lozach, *et al.*, 2011). El tiempo que requiere DENV-3 para realizar la fusión de su envoltura con la membrana de los endosomas y desnudarse se estudió realizando una cinética de fusión por un ensayo de susceptibilidad al cloruro de amonio.

Cultivos de células Vero se infectaron con 150 UFP de DENV-3 durante 1 h a 4 °C, luego se eliminó el virus no adsorbido por lavados con PBS frío y se permitió la internalización viral al agregar MM precalentado a 37 °C. A distintos tiempos después del pasaje a 37 °C se agregó cloruro de amonio 50 mM, que produce un aumento del pH instantáneo en el sistema vesicular celular. Luego de 3 h post-internalización con incubación en presencia de cloruro de amonio se realizó un lavado con buffer citrato pH 3 para inactivar el virus extracelular y se cubrieron las monocapas con medio de plaqueo. En la figura R.12 se observa que la fusión viral se inició antes de los 5 min, alcanzó su

valor medio a los 10-11 min y a partir de los 20-30 min la mayoría de las partículas virales habían penetrado en el citoplasma. La penetración de DENV-3 a células Vero presentó valores medios de fusión correspondientes a un evento tardío que se asemejan a los publicados por algunos investigadores para DENV-1 y DENV-2 (van der Schaar *et al.*, 2007; Mosso *et al.*, 2008; Zaitseva *et al.*, 2010; Ang *et al.*, 2010; Shrivastava *et al.*, 2011; Acosta *et al.*, 2012).

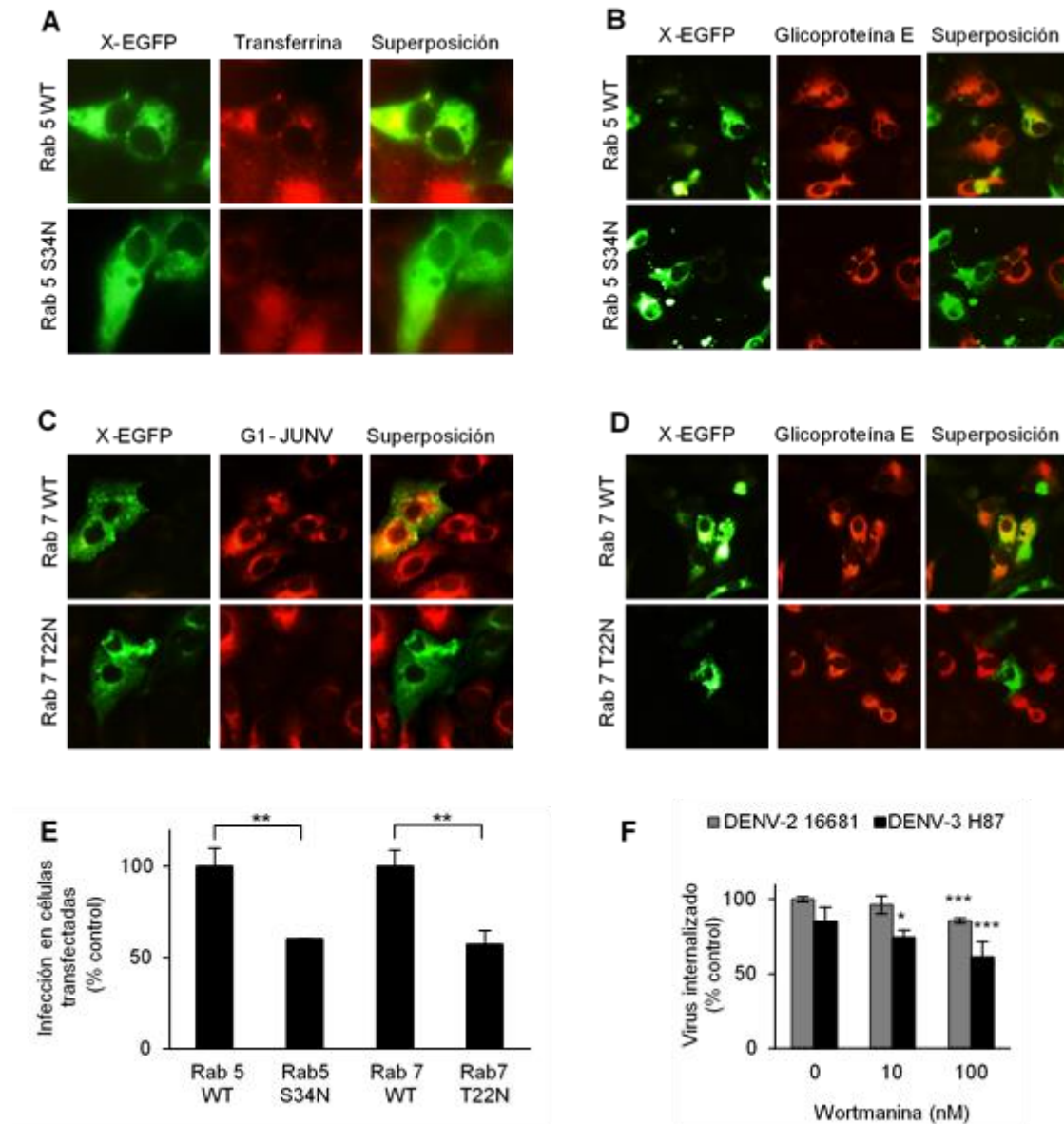


**Figura R.12: Cinética de fusión de DENV-3 en células Vero.** Cultivos celulares fueron infectados con 100-150 UFP de DENV-3 durante 1 h a 4°C. Luego se agregó MM precalentado a 37 °C para iniciar la internalización viral. A distintos tiempos de incubación a 37°C se agregó cloruro de amonio 50 mM. Después de una incubación total de 3 h, todos los cultivos se trataron con buffer citrato (pH 3) para inactivar el virus extracelular, se lavaron las monocapas con PBS y se cubrieron con medio de plaqueo. A los 6 días p.i. se hizo el recuento de UFP. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE.

## 2.2. Análisis del tránsito endosomal de DENV-3

La definición de virus de penetración tardía incluye eventos de desnudamiento en diversos compartimentos subcelulares, que incluyen endosomas tardíos, lisosomas, la vía de reciclaje o incluso el retículo endoplásmico (Lozach, *et al.*, 2011). El estudio de la participación del proceso de maduración desde endosomas tempranos a endosomas tardíos puede realizarse analizando la funcionalidad de la familia de Rab GTPasas. Estas proteínas, localizadas en distintas organelas de las vías de transporte intravesicular, actúan como reguladoras específicas involucradas en la estructura y la identidad funcional de las membranas intracelulares (Wandinger-Ness & Zerial, 2014). Dado que durante la maduración de los endosomas ocurre un reemplazo de la proteína Rab 5, característica de endosomas tempranos, por la proteína Rab 7, propia de los endosomas tardíos (Stein,

2003), se estudió el requerimiento funcional de ambas proteínas en la infección de células Vero con DENV-3 con mutantes dominantes negativos.



**Figura R.13: Estudio del tráfico intravesicular de DENV-3 en células Vero.** **A.** Cultivos celulares se transfectaron con los plásmidos que expresan la proteína salvaje Rab 5 WT o mutante dominante negativa Rab 5 S34N fusionadas a EGFP y a las 24 h se incubaron con transferrina-TRITC (15 µg/ml) durante 1h a 37°C. Los cultivos se fijaron y montaron para su observación al microscopio de fluorescencia. Aumento 1000X. **B.** Células transfectadas como en A, se infectaron a las 24 h post-transfección con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula). A las 24 h p.i. los cultivos se procesaron para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 400X. **C.** Cultivos celulares se transfectaron con los plásmidos que expresan la proteína salvaje Rab 7 WT o mutante dominante negativa Rab 7 T22N fusionadas a EGFP y a las 24 h se infectaron con JUNV (m.i. 1 UFP/célula) durante 1h a 37°C. A las 24 h p.i. los cultivos se fijaron y se procesaron para inmunofluorescencia contra la proteína G1 viral. Aumento 1000X. **D.** Células transfectadas como en C, se infectaron a las 24 h post-transfección con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula). A las 24 h p.i. los cultivos se procesaron para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 400X. **E.** Cuantificación de células infectadas sobre 250 células transfectadas que expresan niveles semejantes de EGFP en los preparados representados en B y D. **F.** Monocapas de células Vero se trataron con concentraciones crecientes y no citotóxicas de wortmanina durante 1 h a 37 °C, luego se infectaron con DENV-2 (16681) y DENV-3, a una m.i.

1 UFP/célula, en presencia de la droga por 1 h a 37 °C. Finalmente se trataron con proteinasa K (1mg/ml) y se cuantificó el virus internalizado mediante un ensayo de centros infecciosos. En E y F los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE y los asteriscos indican la significancia estadística respecto del control (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

Cultivos de células Vero se transfectaron con los plásmidos que expresan las versiones fusionadas a EGFP de la proteína salvaje Rab 5 wt como control o la proteína Rab 5 S34N, mutante dominante negativa que presenta una mayor afinidad por GDP impidiendo la hidrólisis de GTP. La efectividad del sistema se evaluó con el estudio de la internalización de transferrina (Stenmark *et al.*, 1994). En la figura R.13.A se observa la doble marca fluorescente en las células transfectadas con el plásmido control y luego incubadas con transferrina-TRITC durante 1 h a 37 °C. En cultivos transfectados con el plásmido que expresa Rab5 S34N se observa que las células que presentan fluorescencia verde (transfectadas) no presentan superposición con la fluorescencia roja de la transferrina-TRITC. Comprobada la eficacia de la expresión de la proteína Rab 5 mutante para evitar la internalización de ligandos a endosomas tempranos en células Vero, se pasó a evaluar el efecto sobre la infección con DENV-3. En células que expresan la proteína mutante Rab5 S34N no se detectó expresión simultánea de la glicoproteína viral (Figura R.13.B), a diferencia de las células transfectadas con el plásmido control que fueron permisivas a la infección. El recuento de células transfectadas e infectadas mostró una reducción estadísticamente significativa (Figura R.13.E), indicando la necesidad del tránsito por endosomas tempranos para la infección de células Vero con DENV-3.

El estudio del tráfico de DENV-3 por los endosomas tardíos se realizó utilizando construcciones plasmídicas que codifican para versiones fusionadas a EGFP de la proteína salvaje Rab7 wt o la proteína mutante dominante negativa llamada Rab7 T22N. Para evaluar que la sobreexpresión de Rab 7 wt no afecta la integridad de los endosomas tardíos y que Rab7 T22N sí la altera, se evaluaron sus efectos sobre la infección con el virus Junín (JUNV), cuya fusión en endosomas tardíos ha sido demostrada por Martínez *et al.* (2009). En la figura R.13.C se observa que las células transfectadas con Rab7 wt expresan también la proteína viral G1, en tanto que la sobreexpresión de la mutante Rab 7 T22N previene la infección por JUNV. Igualmente, cuando se infectaron con DENV-3 células transfectadas con ambos plásmidos se verificó una reducción significativa de la infección viral en las células que efectivamente expresaban la proteína mutante Rab 7 T22N respecto de las células infectadas que expresan Rab 7 wt (Figura R.13.D y R.13.E),

demostrando que el transporte a endosomas que contienen el marcador Rab 7 es necesario para la infección productiva de células Vero con DENV-3.

La wortmanina es un esteroide que evita la maduración de los endosomas tempranos a endosomas tardíos mediante su actividad inhibitoria de las fosfatidilinositol-3-kinasas (PI3-K) (Fernández-Borja *et al.*, 1999). Existen antecedentes que demuestran, por ensayos de colocalización de Rab5 y la proteína de cápside viral, que el tratamiento con wortmanina afecta el transporte de DENV-2 16681 hasta su lugar de fusión (Acosta *et al.*, 2012). Por lo tanto, para corroborar los datos obtenidos con las GTPasas Rab se decidió evaluar el efecto de la droga sobre la cantidad de DENV-3 internalizado en células Vero, utilizando a DENV-2 16681 como control positivo. Para ello, se pretrataron las células con concentraciones no citotóxicas y crecientes de wortmanina por 1 h, luego las monocapas se infectaron con DENV-3 o con DENV-2 16681 durante 1 h a 37 °C en presencia de la droga y la cantidad de virus internalizado se tituló por centros infecciosos. En la figura R.13.F se observa que el tratamiento con la droga inhibió significativamente la internalización de ambos virus, siendo mayor la disminución del título de DENV-3, con una reducción del 30 %, que la obtenida sobre DENV-2 16681, cuya inhibición fue del 15 %.

Los resultados demuestran que DENV-3 luego de ingresar a las células Vero por una vía endocítica no clásica proseguiría su ruta a través de los endosomas tempranos y tardíos, en donde realizaría la fusión de membranas a los 10-11 min post-internalización, alcanzando así la zona perinuclear de la célula.



### 3- PARTICIPACIÓN DEL CITOESQUELETO EN LA ENTRADA DE DENV-3 A CÉLULAS VERO Y A549

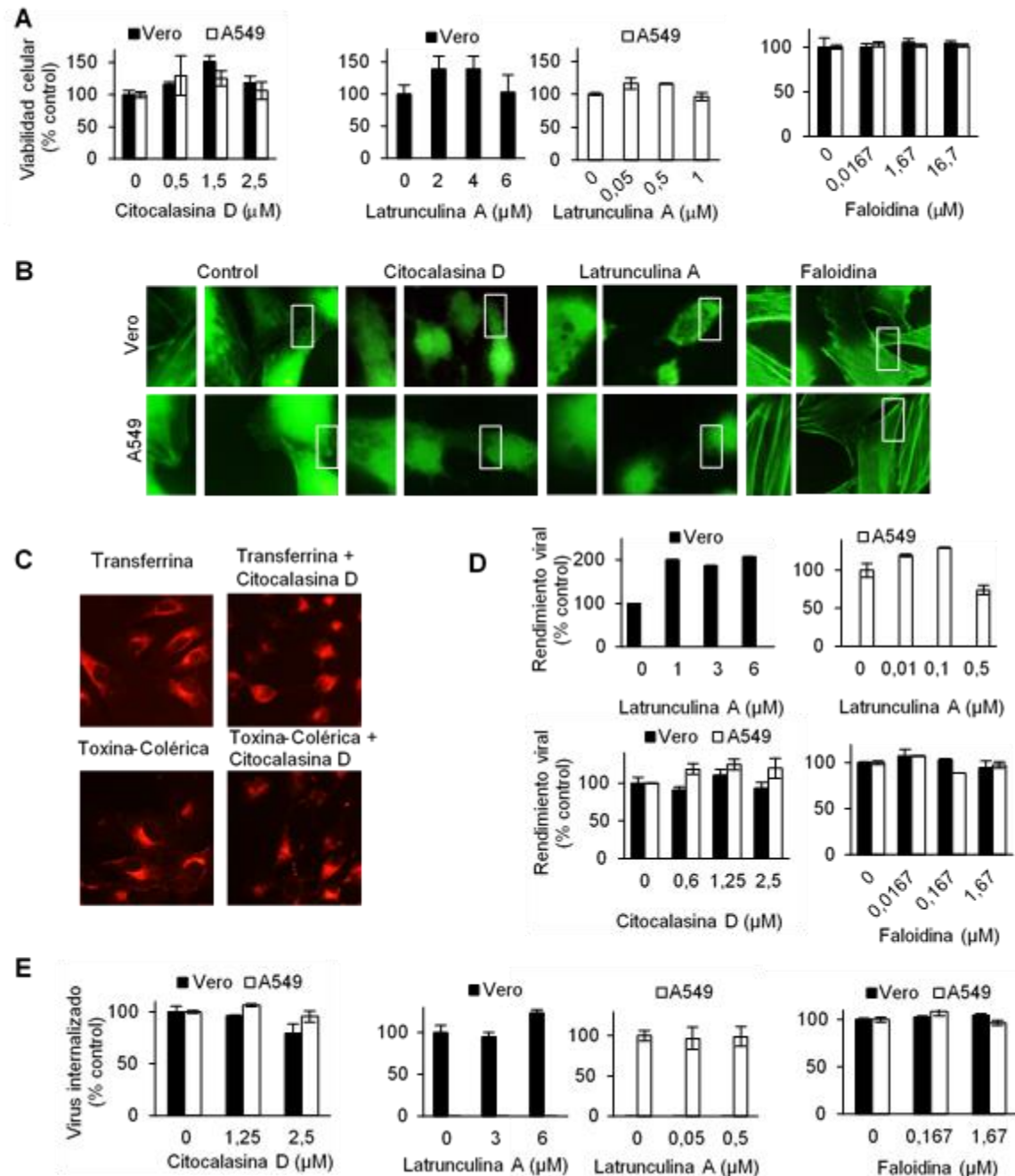
El citoesqueleto está involucrado en algunas de las vías endocíticas bien caracterizadas así como en el tránsito endosomal, tanto los microfilamentos (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003; Kaksonen, 2006; Phey Lim *et al.*, 2011) como los microtúbulos (Nielsen *et al.*, 1999; Caviston & Holzbaur, 2006). Por ello, se decidió estudiar la posible participación de los microfilamentos de actina y los microtúbulos en la entrada de DENV-3 a células Vero y A549.

#### 3.1 *Los microfilamentos de actina en la entrada de DENV-3*

Para evaluar el efecto de la alteración de la dinámica de los microfilamentos de actina se utilizaron drogas que inducen su despolimerización, como citocalasina D (Cooper, 1987) y latrunculina A (Morton *et al.*, 2000), y drogas que producen la estabilización de los microfilamentos, como faloidina (Estes *et al.*, 1981).

En primer lugar se evaluó la citotoxicidad de las drogas en las condiciones experimentales mediante el método de MTS. En la figura R.14.A se observa la ausencia de citotoxicidad en las concentraciones y tiempos ensayados para todas las drogas en ambos tipos celulares, particularmente las células A549 fueron más susceptibles a latrunculina A por lo que fue necesario utilizar concentraciones considerablemente menores que en las células Vero. Luego se verificó que las mismas estuvieran ejerciendo efectivamente su acción sobre los microfilamentos de actina. Para ello, se trataron monocapas de células Vero y A549 con la concentración máxima no citotóxica de las drogas y luego de 90 min se procesaron para inmunofluorescencia revelando los microfilamentos de actina con faloidina-FITC. Los tratamientos con citocalasina D y latrunculina A produjeron la desestructuración de los microfilamentos, observándose una profusa marca fluorescente en todo el citoplasma correspondiente a los monómeros de F-actina y la formación característica de glóbulos en donde dicha marca está ausente (Figura R.14.B). En cuanto al tratamiento con faloidina los microfilamentos presentaron marca más intensa que en los cultivos controles debido a su estabilización. Por otro lado, se comprobó que en las condiciones ensayadas la citocalasina D no afecta el normal funcionamiento de la endocitosis dependiente de clatrina, ni la mediada por caveolas, utilizando la transferrina-utilizando la transferrina-TRITC y la toxina colérica-Alexa555,

proteínas marcadoras de las vías respectivamente, a pesar de efectivamente desorganizar los microfilamentos de actina (Figura R.14.C).



**Figura R.14: Efecto de la desestabilización de la dinámica de los microfilamentos de actina sobre la entrada de DENV-3.** **A.** Cultivos celulares se trataron con concentraciones crecientes de las drogas durante 90 min y luego se evaluó la viabilidad celular por el método de MTS. **B.** Las células se trataron con citocalasina D 2,5  $\mu\text{M}$ , latrunculina 6  $\mu\text{M}$  (Vero) o 0,5  $\mu\text{M}$  (A549) y faloidina 1,67  $\mu\text{M}$  durante 90 min a 37°C. Luego se procesaron para microscopía de fluorescencia contra actina utilizando faloidina-FITC (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Aumento 1000X. **C.** Monocapas de células Vero se pretrataron con citocalasina D 2,5  $\mu\text{M}$  durante 30 min, luego se agregó transferrina-TRITC (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o toxina colérica-Alexa555 (0,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en presencia de la droga por 1 h a 37 °C y luego se observaron al microscopio de fluorescencia. Aumento 1000X. **D.** Monocapas de

células se pretrataron durante 30 min con concentraciones crecientes de las drogas. Luego se infectaron con DENV-3 (m.i. 0,1 UFP/célula) en presencia de los compuestos durante 1 h a 37 °C, después se retiraron los inóculos virales, se agregó MM y se determinó el rendimiento viral a las 48 h p.i. por el método de UFP en células Vero. **E.** Células pretratadas como en D se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula), luego fueron tratadas con proteinasa K (1mg/ml) y se cuantificó el virus internalizado mediante un ensayo de centros infecciosos en células Vero. En A, D y E los resultados se expresan como el valor medio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE. En todos los casos las diferencias fueron estadísticamente no significativas.

Luego se evaluó el efecto de los compuestos sobre la internalización de DENV-3, luego de 1 h de infección, y sobre el rendimiento viral, a las 48 h p.i. En ningún caso estuvo afectada la infección (Figura R.14 D y E), mostrando que la entrada de DENV-3 es independiente del citoesqueleto de actina.

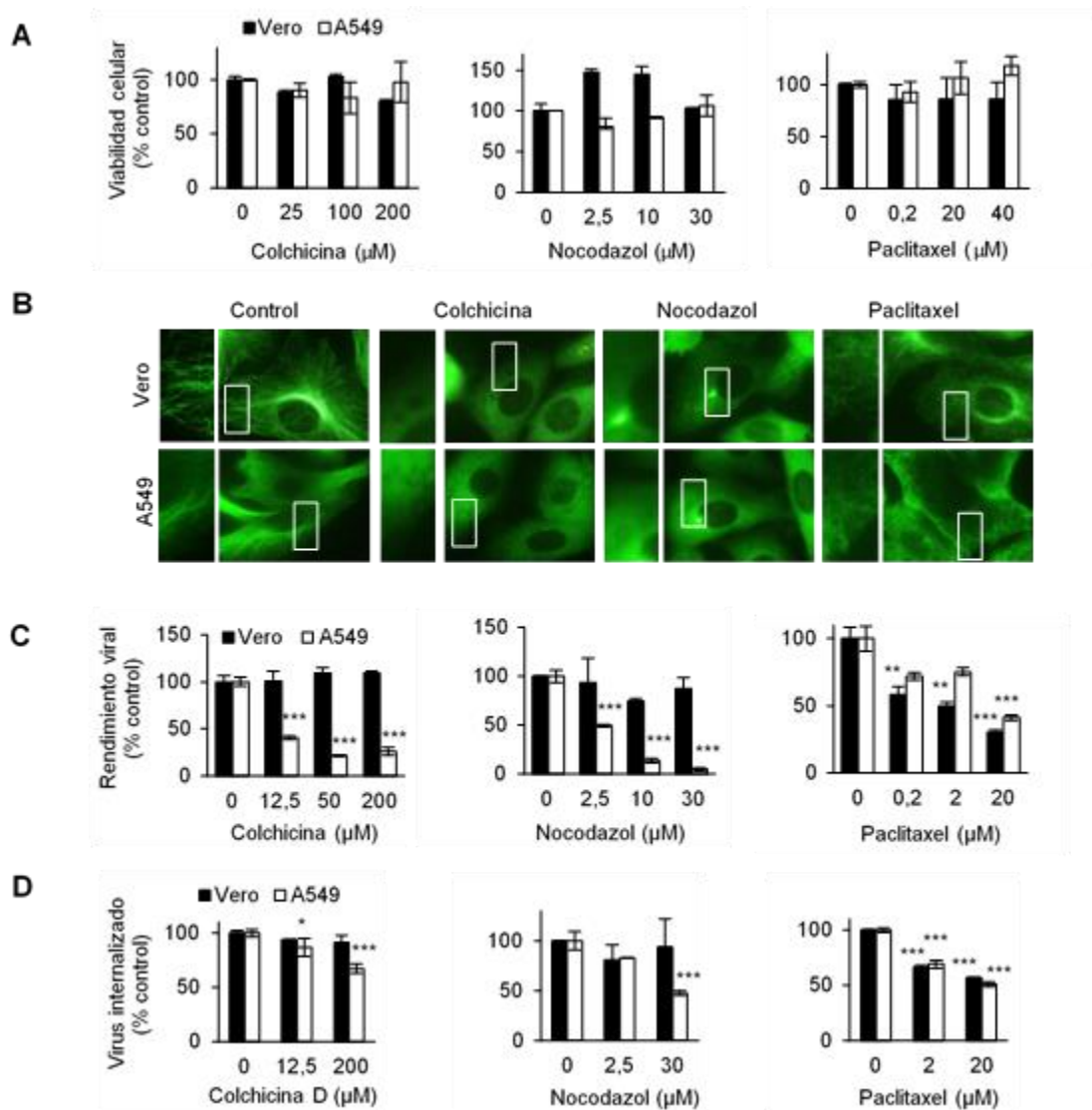
### 3.2 *Los microtúbulos en la entrada de DENV-3*

La participación de microtúbulos en la entrada de DENV-3 se analizó con inhibidores químicos que afectan la dinámica de los microtúbulos: colchicina (Hamel, 1996) y nocodazol (Zieve *et al.*, 1980) son drogas que causan la despolimerización de los microtúbulos, mientras que paclitaxel potencia su polimerización y los estabiliza por interacción directa (Horwitz, 1994; Eash & Atwood, 2005).

En la figura R.15.A se observa la ausencia de citotoxicidad de las tres drogas frente al tratamiento en células Vero y A549 en las condiciones experimentales ensayadas. Luego se evaluó el efecto del tratamiento sobre los microtúbulos, para ello se trataron las monocapas celulares con la concentración máxima no citotóxica de cada droga y se procesaron para inmunofluorescencia contra tubulina. En la figura R.15.B se observa que el tratamiento con las drogas despolimerizantes efectivamente destruye los filamentos que se observan en los cultivos controles, quedando una marca difusa en el citoplasma de ambos tipos celulares, a diferencia de lo que ocurre con paclitaxel, en cuyo caso se manifiesta una reorganización de los microtúbulos característica, con una extensa matriz de haces paralelos (Horwitz, 1994).

A continuación, se probó el efecto de las tres drogas en la internalización de DENV-3, luego de 1 h de infección, y en los rendimientos virales a las 48 h p.i. En las figuras R.15.C y D se observa el comportamiento diferencial de DENV-3 en las células Vero y A549, en las primeras no estuvo afectada la multiplicación ni la internalización del virus por parte de las drogas despolimerizantes, que sí produjeron inhibición en células

A549. Con paclitaxel hubo reducción significativa de la multiplicación y de la internalización viral en ambos tipos celulares.



**Figura R.15: Efecto de la desestabilización de la dinámica de los microtúbulos sobre la entrada de DENV-3.** **A.** Cultivos celulares se trataron con concentraciones crecientes de colchicina y nocodazol durante 3 h o paclitaxel durante 24 h y luego se evaluó la viabilidad celular por el método de MTS. **B.** Las células se trataron con colchicina 200 μM, nocodazol 30 μM durante 3 h o paclitaxel 20 μM durante 24 h a 37°C, luego se procesaron para microscopía de fluorescencia con un anticuerpo monoclonal contra tubulina. Aumento 1000X. **C.** Células pretratadas como en A se infectaron con DENV-3 (m.i. 0,1 UFP/célula) en presencia de los compuestos durante 1 h a 37 °C, después se retiraron los inóculos virales, se agregó MM y se determinó el rendimiento viral a las 48 h p.i. por el método de UFP en células Vero. **D.** Células pretratadas como en C se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula), luego fueron tratadas con proteinasa K (1mg/ml) y se cuantificó el virus internalizado mediante un ensayo de centros infecciosos en células Vero. En A, C y D los resultados se expresan como el valor medio de tres determinaciones independientes ± DE y los asteriscos indican significancia estadística respecto del control (\*p<0,05; \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001).

## CAPITULO 2: ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS CARRAGENANOS FRENTE A DENV-3

En esta segunda parte del trabajo de tesis se estudia la actividad antiviral *in vitro* frente a DENV-3 de los carragenanos, polisacáridos sulfatados que mimetizan al heparan sulfato. Para ello se evaluó su citotoxicidad y actividad antiviral frente a la infección con DENV-3 en distintas líneas celulares de mamífero.

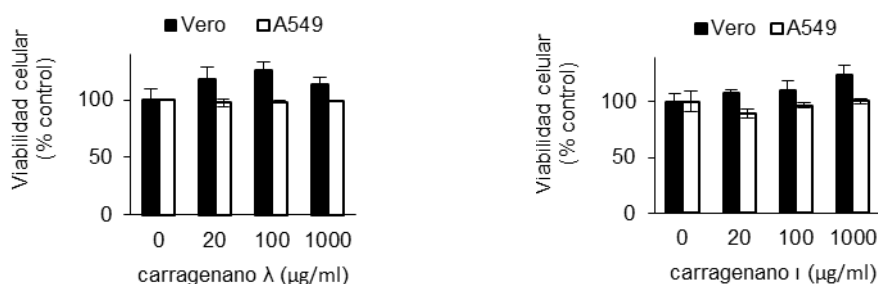
### *2.1. La actividad antiviral de carragenanos frente a DENV-3 en células Vero y A549*

En trabajos previos publicados por nuestro laboratorio ha sido demostrado que distintas clases de carragenanos presentan una potente actividad antiviral frente a DENV-2 y DENV-3 en células Vero y HepG2, mientras que no inhiben la infección con estos virus en células de mosquito (Talarico *et al.*, 2007; Acosta *et al.*, 2011). Incluso se ha postulado que las variaciones observadas en cuanto a la actividad antiviral de estos polisacáridos sulfatados en función del serotipo y de la célula hospedadora podría deberse a diferencias en la interacción virus-célula en la entrada viral (Talarico *et al.*, 2005). En base a estos antecedentes, se consideró pertinente evaluar la actividad antiviral que presentan estos compuestos frente a la infección con DENV-3 en distintos modelos *in vitro* y estudiar su posible relación con la entrada viral.

En primera instancia se evaluó la citotoxicidad de carragenano  $\kappa$  y carragenano  $\lambda$  sobre las células Vero y A549. En la figura R.16 se observa que ambos compuestos no resultaron citotóxicos para ambos sistemas celulares, aún en la mayor concentración ensayada de 1 mg/ml. Por lo tanto, la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>), es decir la concentración que reduce la viabilidad celular al 50 %, para ambos carragenanos resultó > 1 mg/ml.

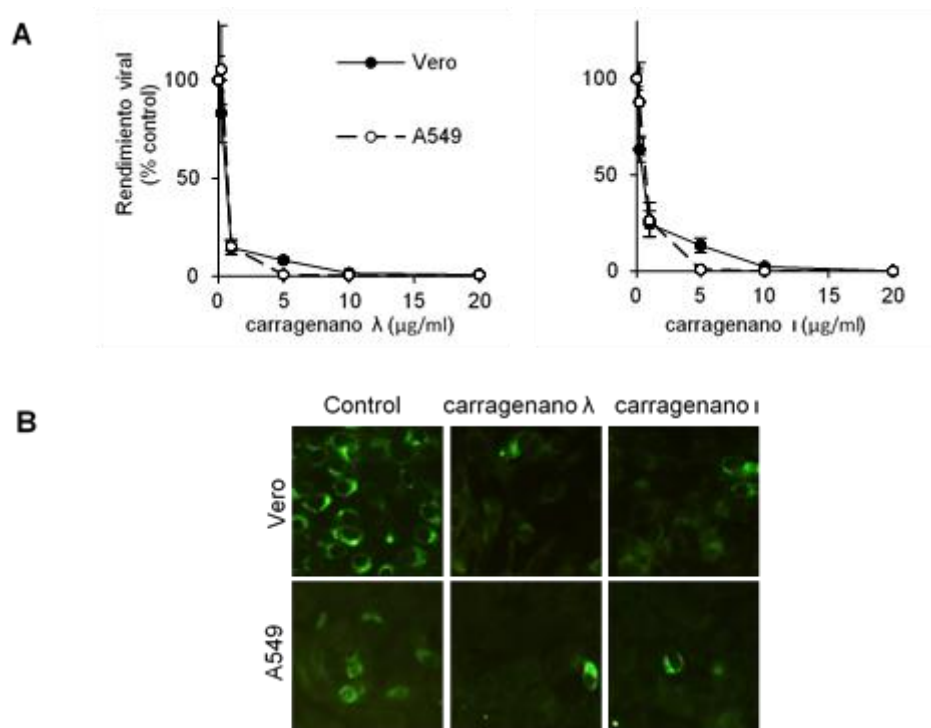
A continuación, se determinó la actividad antiviral de los carragenanos en la infección de células Vero y A549 con DENV-3 por un ensayo de reducción del rendimiento viral. Para ello se infectaron cultivos celulares a una m.i. de 0,1 UFP/célula en presencia de concentraciones crecientes de carragenano y se tituló la producción de virus en los

sobrenadantes celulares a las 48 h p.i.. En la figura R.17.A se observa una fuerte caída del título viral de DENV-3 en función de la concentración de carragenano. A partir de estas curvas de dosis-respuesta se calcularon las concentraciones efectivas 50 ( $CE_{50}$ ) como la concentración que reduce el rendimiento viral un 50 % respecto de la infección en ausencia de compuesto antiviral. Tanto en células Vero como en células A549, los valores de  $CE_{50}$  no mostraron diferencias significativas entre ambos carragenanos, ya que las variaciones observadas siempre estuvieron dentro del desvío estándar (Tabla R.1). Dada la falta de citotoxicidad que mostraron los carragenanos y la muy potente actividad antiviral, podemos concluir que estos compuestos son inhibidores muy selectivos de DENV-3 en estos dos tipos de células. Efectivamente, los valores de índice de selectividad (IS), es decir las relaciones  $CC_{50}/CE_{50}$ , variaron entre  $> 1449$  y  $> 2128$ , indicativos de la potencia y especificidad de la acción inhibitoria de los carragenanos sobre la infección de DENV-3



**Figura R.16: Citotoxicidad de los carragenanos.** Cultivos de células Vero y A549 se trataron con concentraciones crecientes de las drogas durante 48 h y luego se evaluó la viabilidad celular por el método de MTS. Los resultados se expresan como el valor medio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE.

Por otro lado, también se ensayó la actividad antiviral analizando el efecto de los carragenanos sobre el número de células que expresan la glicoproteína E de DENV-3, detectada por inmunofluorescencia a las 48 h p.i. En la figura R.17.B se observa una notable reducción en el número de células que expresan glicoproteína E frente al tratamiento con carragenanos, tanto en células Vero como A549.



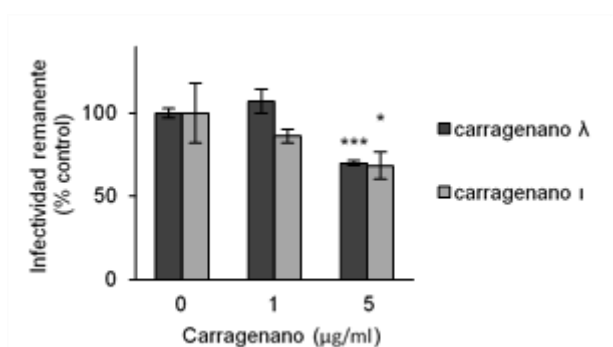
**Figura R.17: Actividad antiviral de los carragenanos.** **A.** Cultivos de células Vero y A549 se infectaron con DENV-3 (m.i. 0,1 UFP/célula) en presencia de concentraciones crecientes de carragenanos. Luego de 1 h de incubación a 37 °C, se retiraron los inóculos virales, se agregó MM conteniendo compuesto y se determinaron los rendimientos virales a las 48 h p.i. por el método de UFP en células Vero. Los resultados se expresan como el valor medio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE. La reducción en el rendimiento viral respecto del control fue estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) para todas las concentraciones de carragenano a partir de 1  $\mu\text{g/ml}$ . **B.** Monocapas celulares se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) en ausencia o presencia de 20  $\mu\text{g/ml}$  de carragenano. A las 24 h p.i. se fijaron las células y se procesaron para inmunofluorescencia contra la glicoproteína E. Aumento 400X.

**Tabla R.1: Actividad antiviral de carragenanos**

| Células | CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup> |                     |
|---------|----------------------------------------------------|---------------------|
|         | Carragenano $\lambda$                              | Carragenano $\iota$ |
| Vero    | 0,59 $\pm$ 0,14                                    | 0,47 $\pm$ 0,14     |
| A549    | 0,69 $\pm$ 0,08                                    | 0,69 $\pm$ 0,17     |

<sup>a</sup>Concentración efectiva 50%: concentración de compuesto requerida para reducir 50% el rendimiento viral. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE.

Para descartar la posibilidad de que la actividad inhibitoria de los carragenanos sobre la infección con DENV-3 pueda deberse a un efecto directo sobre los viriones, se realizó a continuación un ensayo de inactivación viral en presencia de los polisacáridos y en ausencia de células. La concentración máxima se eligió de modo tal que no hubiera interferencias con respecto a la concentración antiviral. Ambos compuestos no mostraron actividad virucida frente a DENV-3 a una concentración de 1 µg/ml, en tanto que a una concentración de 5 µg/ml se observa una muy baja reducción de infectividad, del orden del 30% (Figura R.18). Por lo tanto, la potente inhibición que se detecta en las células infectadas no se debe a un efecto virucida de los carragenanos, sino a interferencia con una etapa del ciclo de multiplicación viral.



**Figura R.18: Actividad virucida de carragenanos.** Suspensiones virales de DENV-3 ( $1 \times 10^6$  UFP/ml) se incubaron con concentraciones crecientes de ambos carragenanos durante 1 h a 37°C. Luego se tituló la infectividad remanente mediante el método de UFP en células Vero. Los resultados se expresan como el valor medio de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE y los asteriscos indican significancia estadística respecto del control (\* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

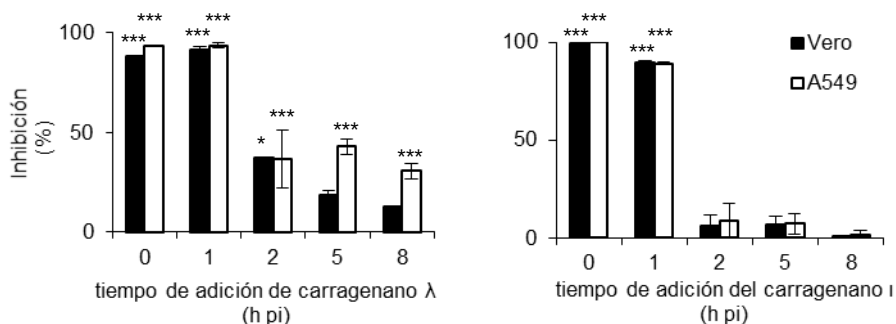
## 2.2. Modo de acción antiviral de los carragenanos en la infección de células Vero y A549 con DENV-3

Para el estudio del mecanismo de acción de los compuestos antivirales en las líneas celulares Vero y A549 se utilizó una concentración final de compuesto de 20 µg/ml, aproximadamente 40 veces superior a la  $CE_{50}$ , con el fin de obtener un alto efecto inhibitorio en todos los ensayos.



### 2.2.1 Influencia del tiempo de adición de los compuestos sobre la actividad antiviral contra DENV-3

Con la intención de dilucidar si la acción antiviral de los carragenanos es ejercida en etapas tempranas y/o tardías del ciclo de multiplicación viral se evaluó la influencia del tiempo de adición de los compuestos sobre su actividad antiviral en la infección con DENV-3. Los polisacáridos fueron agregados en la adsorción durante 1 h a 4 °C (tiempo 0) o a tiempos posteriores. Luego se colocaron los cultivos con los viriones adsorbidos en presencia o ausencia de los carragenanos a 37 °C hasta un tiempo total de 10 h p.i., cuando se cuantificó la infección por un ensayo de centros infecciosos. El carragenano  $\lambda$  produjo una inhibición superior al 90% en células Vero cuando fue agregado a las 0 y 1 h p.i., en tanto que a las 2 h el efecto se redujo al 40 % y más aún a tiempos posteriores (Figura R.19). En células A549 el perfil de acción fue similar, aunque a tiempos tardíos se mantiene una inhibición del orden de 30-40 %. Para el carragenano  $\iota$ , en ambas líneas celulares se detectó 99-100 % de inhibición cuando el compuesto se agregó al tiempo 0, 90 % de inhibición a 1 h p.i. y los agregados de compuesto a tiempos posteriores no inhibieron la infección de DENV-3 ni en las células Vero ni en las A549.

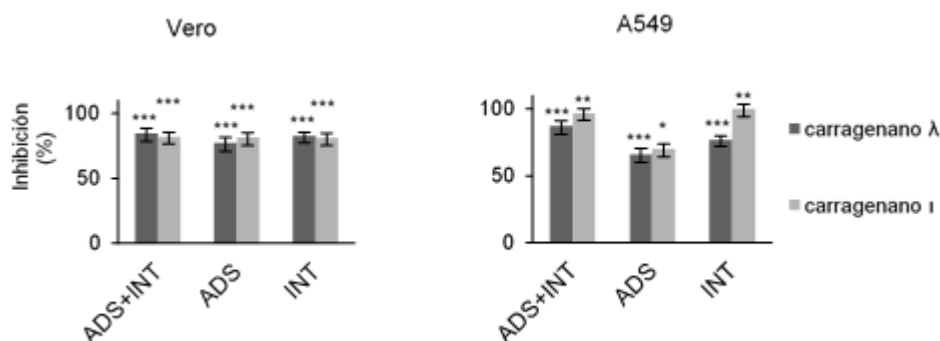


**Figura R.19: Efecto del tiempo de adición de los carragenanos sobre la actividad antiviral contra DENV-3.** Se infectaron células Vero y A549 con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) y se agregaron los compuestos (20  $\mu$ g/ml) simultáneamente con el virus (tiempo 0) o a 1, 2, 5 y 8 h p.i. A las 10 h p.i. se descartó el sobrenadante de los cultivos y luego de un tratamiento con 1 mg/ml de proteinasa K se realizó un ensayo de centros infecciosos en células Vero. Los resultados se expresan como % de inhibición en los cultivos tratados con carragenano respecto de cultivos no tratados y representan la media de dos experimentos independientes  $\pm$  DE. Los asteriscos indican significancia estadística respecto de control no tratado (\* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 2.2.ii Efecto de los carragenanos sobre las etapas tempranas del ciclo de multiplicación de DENV-3

Debido a que los resultados indicarían una acción predominante de ambos carragenanos en tiempos tempranos del ciclo de multiplicación del virus, se evaluó la actividad antiviral de los mismos en la adsorción y la internalización de los viriones.

Para ello se realizó un ensayo de rendimiento viral con distintos tratamientos con los carragenanos durante la infección, de manera de mantener los compuestos sólo en la adsorción viral, sólo en la internalización o en ambos procesos de adsorción e internalización, tal como se detalla en la Figura R.20. Tanto el carragenano  $\lambda$  como el carragenano  $\kappa$  presentaron actividad inhibitoria significativa en ambos eventos tempranos del ciclo viral en las células Vero y A549.



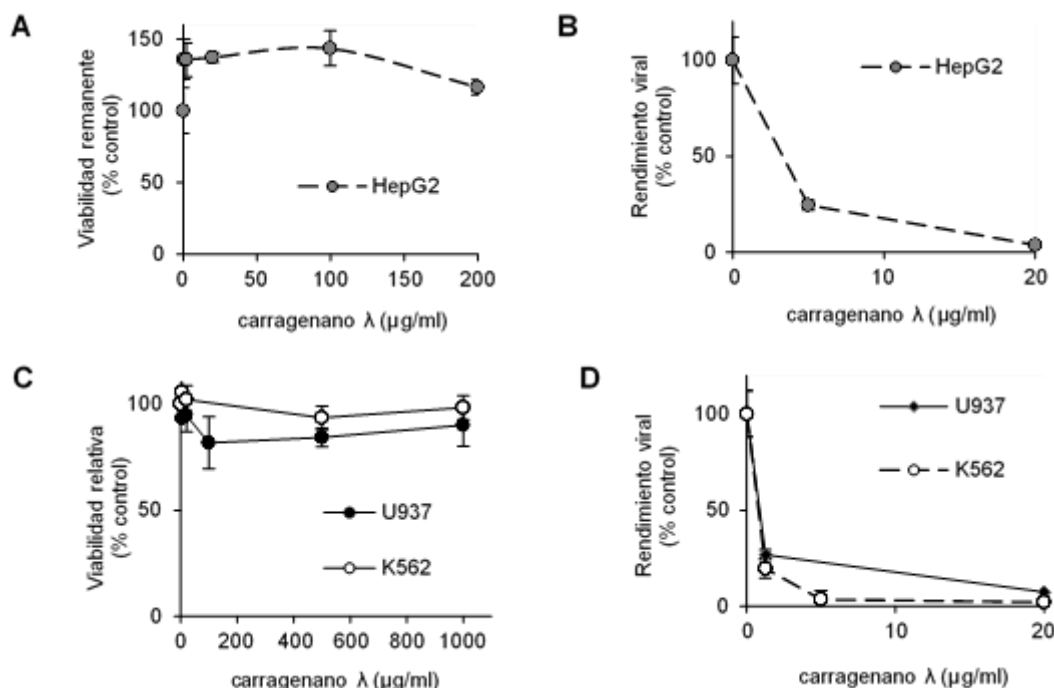
**Figura R.20: Efecto de los carragenanos sobre las etapas tempranas del ciclo de multiplicación de DENV-3.** Cultivos de células Vero y A549 se infectaron con DENV-3 (m.i. 1 UFP/célula) en distintas condiciones de tratamiento con 20  $\mu$ g/ml de carragenano. **Adsorción viral (ADS):** Se infectaron las células en presencia de compuesto y luego de 1 h de adsorción a 4 °C, se cubrieron con MM sin compuesto y se incubaron 1h a 37 °C para la internalización viral. **Internalización viral (INT):** Luego de 1 h de adsorción a 4 °C en ausencia de compuesto, se agregó MM con carragenano y se incubó durante 1 h a 37 °C. **Adsorción e internalización viral (ADS+INT):** Las células se mantuvieron en MM con carragenano durante la adsorción e internalización. En todos los casos, luego de la hora de internalización a 37 °C se realizó un lavado con buffer citrato (pH 3) para remover el virus no internalizado, se cubrió con MM y a las 48 h p.i. se titularon los sobrenadantes por UFP. Los resultados corresponden a la media de tres determinaciones independientes  $\pm$  DE. Los asteriscos representan la significancia estadística de los tratamientos respecto del control no tratado (\*p<0,05; \*\*p<0,01 y \*\*\*p<0,001).

### 2.3. *Actividad antiviral de carragenano $\lambda$ en otras líneas celulares humanas*

Tal como se mencionara en el capítulo 1 para los estudios con clorpromazina, también se estudió la actividad antiviral del carragenano  $\lambda$  en otras líneas celulares humanas, más relevantes como blanco natural de la infección, en forma comparativa con Vero y A549.

#### 2.3.1 *Actividad antiviral de carragenano $\lambda$ sobre la infección de células HepG2, U937 y K562 con DENV-3*

Para poder realizar el análisis comparativo de la actividad antiviral de carragenano  $\lambda$  fue necesario en primer lugar evaluar su citotoxicidad en los tres sistemas celulares. El efecto de la presencia de concentraciones crecientes de carragenano durante 48 - 72 h sobre la viabilidad celular se estudió por el método de MTS para las células HepG2 y por tinción con Azul de Tripán en las líneas U937 y K562. En las figuras R.21.A y C se observa la ausencia de efecto citotóxico del carragenano  $\lambda$  en todo el espectro de concentraciones ensayadas en las tres líneas celulares. Luego, se procedió a estudiar la actividad antiviral del carragenano por medio de un ensayo de rendimiento viral. En las figuras R.21.B y D se evidencia una notoria inhibición de la multiplicación viral cuando el carragenano está presente durante la infección con DENV-3 tanto en células HepG2 como en las células mieloides. A partir de estas curvas se calcularon los valores de  $CE_{50}$  que se presentan en la tabla R.2 El orden de susceptibilidad frente a la acción del carragenano  $\lambda$  sobre la infección con DENV-3 fue: K562 > U937 > HepG2, requiriendo una concentración aproximadamente 4 veces superior para producir la misma inhibición en células HepG2 respecto de las células K562 y U937. En estas dos últimas líneas celulares los valores de  $CE_{50}$  fueron del mismo orden que los obtenidos en Vero y A549.



**Figura R.21: Citotoxicidad y actividad antiviral de λ-carragenano en otras líneas celulares humanas.** **A.** Cultivos celulares se trataron con concentraciones crecientes de λ-carragenano durante 48 h y luego se evaluó la viabilidad celular por el método de MTS. **B.** Cultivos de células HepG2 se infectaron con DENV-3 (m.i. 0.1 UFP/ml) en presencia de concentraciones crecientes de λ-carragenano durante 1 h a 37 °C, luego se retiraron los inóculos virales y se incubaron durante 48 h en MM conteniendo λ-carragenano. **C.** Suspensiones de células U937 y K562 fueron tratadas con concentraciones crecientes de λ-carragenano por 72 h. y luego se evaluó la viabilidad remanente por el método de tinción con Azul de Tripán. **D.** Células U937 o K562 se infectaron con DENV-3 (m.i. 5 UFP/ml) en presencia de concentraciones crecientes de λ-carragenano durante 2 h a 37 °C. Luego se eliminaron los inóculos y las células se incubaron durante 72 h en MM con λ-carragenano. En B y D los sobrenadantes se titularon por UFP en células Vero. Los resultados se expresan como la media de dos determinaciones independientes ± DE. La actividad antiviral resultó estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) respecto del control no tratado para todas las concentraciones ensayadas.

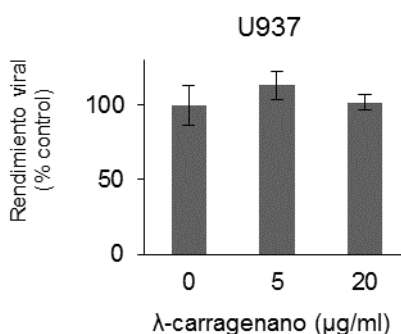
**Tabla R.2: Actividad antiviral de carragenano λ en otras líneas celulares humanas**

| Células | CE50 (μg/ml) <sup>a</sup> |
|---------|---------------------------|
| HepG2   | 3,30 ± 0,40               |
| U937    | 0,85 ± 0,15               |
| K562    | 0,78 ± 0,10               |

<sup>a</sup>Concentración efectiva 50%: concentración de compuesto requerida para reducir 50% el rendimiento viral. Los resultados se expresan como la media de tres determinaciones independientes ± DE.

### 2.3.ii Actividad antiviral de carragenano $\lambda$ sobre la infección de DENV-3 mediada por Ac

La actividad antiviral del carragenano  $\lambda$  sobre la infección mediada por el Ac 2H2 se evaluó mediante un ensayo de rendimiento viral. Células U937 se infectaron con la mezcla de DENV-3-2H2 en presencia de concentraciones crecientes de carragenano y a las 72 h p.i. se determinaron los rendimientos virales por UFP en células Vero. En la figura R. 22 se observa que no hubo inhibición en células U937, a diferencia de la potente actividad antiviral que presentó el carragenano  $\lambda$  en la infección en ausencia de Ac (Figura R.21.D).



**Figura R.22: Evaluación de la actividad antiviral del carragenano  $\lambda$  en la infección mediada por Ac.** Cultivos de células U937 se infectaron con la mezcla DENV-3-2H2 (m.i. 0,5 UFP/célula) durante 2 h a 37 °C en presencia de concentraciones crecientes de carragenano. Luego se retiraron los inóculos virales y las células se incubaron durante 72 h en MM con carragenano. Los sobrenadantes se titularon por UFP en células Vero. Los resultados se expresan como la media de dos determinaciones independientes  $\pm$  DE.

# DISCUSIÓN

**«Toda verdad es simple.» ¿No es esto una mentira doble?**

Friedrich Nietzsche (1844-1900)

“El ocaso de los ídolos”

El presente trabajo de investigación realizado con la intención de optar por el título de doctora contribuye al conocimiento de los eventos tempranos del ciclo de multiplicación de DENV. Si bien numerosas evidencias experimentales reportadas en la bibliografía señalan a la endocitosis mediada por clatrina como la vía principal utilizada por DENV para ingresar a la célula, trabajos previos de nuestro laboratorio y los resultados aquí presentados describen una perspectiva de creciente complejidad respecto del mecanismo de entrada de DENV, el cual se encuentra fuertemente influenciado por factores virales y celulares.

### *1. DENV-3 explota vías endocíticas alternativas para la internalización productiva y no-productiva en la célula hospedadora*

El estudio de la entrada de DENV-3 a distintas líneas celulares de mamífero se realizó por medio de la utilización de inhibidores químicos y moleculares y ensayos de infectividad e inmunofluorescencia indirecta. En primer lugar determinamos que la entrada de DENV-3 requiere de su incorporación en compartimentos ácidos y de la participación de la dinamina para infectar a las células Vero y A549, evidenciándose una fuerte inhibición del rendimiento, la internalización y la expresión de proteínas virales frente al aumento del pH endosomal, y a la presencia de inhibidores de la dinamina como el dynasore y el inhibidor molecular Dyn K44A (Figuras R.2, R.6 y R.7).

El tratamiento con las drogas inhibidoras de la endocitosis mediada por clatrina, clorpromazina y dansilcadaverina así como la expresión de la mutante dominante negativa de Eps15 no sólo no produjeron la inhibición de la infección viral sino que la misma se vio incrementada en las células Vero y A549 (Figura R.3y R.4). En el caso de las células Vero el tratamiento con clorpromazina duplicó y hasta triplicó la internalización productiva de DENV-3 cuantificada por centros infecciosos mientras que el número de moléculas de ARN internalizadas detectadas por RT-PCR cuantitativa permaneció constante (Figura R.5). Esta diferencia indicaría que la entrada de DENV-3 a las células Vero ocurriría tanto de forma dependiente como independiente de clatrina, sin embargo sólo la vía independiente de clatrina conduciría a una infección productiva. Cuando la endocitosis mediada por clatrina se encuentra bloqueada ocurriría un aumento de la

utilización por parte de DENV-3 de la vía independiente de clatrina derivando en una mayor eficiencia de infección. En concordancia con nuestros resultados se ha propuesto que existiría una regulación cruzada de las distintas rutas pinocíticas por lo cual, al verse bloqueada una de las vías, la célula equilibraría la tasa endocítica aumentando las restantes rutas de internalización (Damke *et al.*, 1995).

Esta posibilidad dual en la entrada de DENV-3 no sería exclusiva de las células Vero, ya que un aumento similar en la producción de virus se determinó también en el caso de las células A549 (Figura R.3). Este incremento de la infectividad frente al bloqueo de una vía endocítica ha sido previamente descrito para DENV-2 (Acosta *et al.*, 2009) y para el virus del papiloma humano tipo 16 (Spoden *et al.*, 2008), sin embargo ambos trabajos carecen de un mecanismo explicativo de este fenómeno. Estos resultados también podrían deberse a la utilización por parte de estos virus de vías de entrada productivas y no productivas.

El estudio de la participación de la vía de clatrina, mediante su bloqueo con clorpromazina, se extendió a líneas celulares con mayor relevancia para la infección natural demostrándose que el rol de la endocitosis mediada por clatrina en la entrada de DENV-3 es dependiente del tipo celular. La endocitosis dependiente de clatrina no estaría involucrada en la internalización del virus a las células de hepatoma humano HepG2 y sería la vía de entrada productiva en las células monocíticas U937 y en las células eritroleucémicas K562 (Figura R.10), por lo que se desprende que DENV-3 utiliza diferentes modos de entrada dependiendo de la célula diana. La endocitosis dependiente de clatrina también es la vía de entrada en monocitos de sangre periférica de humano, posiblemente a través de la interacción con la proteína asociada a CD-14 (Alhoot *et al.*, 2011). Tal como fue mencionado en la introducción el uso de vías alternativas en la entrada a diferentes líneas celulares también fue demostrado para DENV-2 (Mosso *et al.*, 2008, Acosta *et al.*, 2009, Ang *et al.*, 2010, Krishnan *et al.*, 2007, Pen *et al.*, 2009) y para el flavivirus JEV (Zhu *et al.*, 2012; Kalia *et al.*, 2013), pero en estos casos no se detectó la coexistencia de rutas infectivas y no infectivas.

La incorporación de las partículas virales a través de distintas vías endocíticas podría explicarse por el uso de diferentes receptores, ya que la interacción con el receptor podría determinar el mecanismo de internalización, el tránsito intracelular y el lugar de desnudamiento en la célula.



Con respecto al requerimiento de colesterol demostramos que la entrada de DENV-3 a células Vero y A549 es parcialmente dependiente de la presencia de este esteroide ya que se observó una inhibición leve de la internalización y de la expresión de glicoproteína E viral en cultivos tratados con agentes como la metil- $\beta$ -ciclodextrina y nistatina que alteran la composición de las membranas celulares. Más aún, la inhibición de la infección en células Vero transfectadas con dos mutantes dominantes negativas de cav-1 sugiere la participación de la vía de caveolas en la entrada de DENV-3 (Figuras R.8 y R.9). La endocitosis mediada por caveolas es utilizada como ruta infectiva por el flavivirus JEV (Zhu *et al.*, 2012) y por otros virus como el virus del papiloma humano tipo 31 (Smith *et al.*, 2007), el virus de la leucemia murina (Beer *et al.*, 2005), el virus de la fiebre aftosa (O'Donnell *et al.*, 2008) y el virus SV 40 (Anderson *et al.*, 1996). Dado que la inhibición producida tanto por los agentes químicos como por las proteínas mutantes negativas de cav-1 fue incompleta, la endocitosis mediada por caveolas parecería ser una vía de infección alternativa y secundaria de infección, siendo la vía principal una vía endocítica no-clásica, dependiente de pH y dinamina, tal vez incluso la misma vía que utiliza DENV-2 en células Vero (Acosta *et al.*, 2009). Ha sido descripto en estudios ultraestructurales la presencia de DENV-2 en el espacio luminal de vacuolas macropinocíticas en monocitos de sangre periférica humana y en células Vero (Hase *et al.*, 1988; Castilla *et al.*, 2015). Sería interesante estudiar por microscopía electrónica si en la infección por DENV-3 se observan también viriones asociados a proyecciones de membrana plasmática similares a pseudopodios o filopodios.

Respecto a la utilización de más de una vía de entrada productiva en un mismo tipo celular, Suksanpaisan *et al.* (2009) demostraron la utilización de múltiples vías de entrada a células HepG2 para los cuatro serotipos de DENV: la vía productiva principal es la endocitosis dependiente de clatrina mientras que la macropinocitosis sería una vía de entrada secundaria. Existen otros ejemplos como el del virus influenza para el cual tanto la endocitosis mediada por clatrina como la macropinocitosis son vías de internalización en las células HeLa, A549 y otras líneas celulares no humanas. En este caso, la predominancia de una vía sobre la otra estaría regulada por la presencia de suero sin verse afectado el número total de eventos de entrada (de Vries *et al.*, 2011). De forma similar se ha demostrado que el virus del Ébola utiliza en mayor medida el mecanismo de macropinocitosis para infectar a las células HeLa, pero una fracción menor de partículas ingresaría por endocitosis mediada por clatrina (Aleksandrowicz *et al.*, 2011).

En relación a la entrada mediada por Ac utilizamos como modelo de infección las células U937, que poseen los receptores FcγRIA, FcγRIIA y IIB (Cameron *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2008), sin embargo en el aumento de la infección por DENV-3 opsonizado demostramos la participación única del FcγRI, ya que sólo la preincubación con las IgG humanas sin agregar bloqueó casi por completo el aumento de la infección mediada por el Ac 2H2. Este resultado podría ser debido a la gran afinidad del receptor por las inmunoglobulinas del tipo IgG2a, ya que es el único FcR que puede unir ligandos monoméricos, a diferencia de los FcRII que se unen a complejos inmunes (Ravetch & Kinet, 1991). En cambio, DENV-4 utiliza en la infección mediada por Ac el receptor FcγRIIA (Puerta-Guardo *et al.*, 2010). Se podría estudiar si dicha isoforma del receptor puede mediar una infección aumentada de DENV-3 en el sistema celular K562, ya que las mismas sólo expresan FcγRIIA en la superficie celular (Littau *et al.*, 1990). Se comprobó además que, luego de la interacción con FcγRI, los complejos inmunes DENV-3-2H2 ingresarían a las células U937 por un mecanismo independiente de clatrina, dado que en presencia de clorpromazina se observó un notable incremento de la infectividad respecto a los cultivos sin droga (Figura R.11). Este sorpresivo aumento de la infección frente al bloqueo de la endocitosis mediada por clatrina podría estar indicando que también en la entrada de complejos inmunes existe la posibilidad de vías de infección productivas y no productivas reguladas por la participación de clatrina. Por otro lado, se ha reportado la internalización de los complejos ligando opsonizado-FcγRI por fagocitosis (Rodrigo *et al.*, 2006), por lo que nuestro resultado podría estar indicando que la infección aumentada y productiva por DENV-3-2H2 se establece por fagocitosis, lo cual se podría determinar mediante el estudio de la influencia de actina en los eventos tempranos de la infección utilizando agentes que afecten la dinámica de los microfilamentos, como la colchicina, el nocodazol y la faloidina (May & Machesky, 2001; Clement *et al.*, 2006) y por la evaluación del efecto de la inhibición de PI3K por wortmanina, ya que la actividad de dicha quinasa está involucrada en el cierre del fagosoma (May & Machesky, 2001).

El fenómeno de ADE también se ha reportado para otros virus, entre ellos el virus de Marburg (Nakayama *et al.*, 2001), Ébola (Takada *et al.*, 2007), Influenza (Tamura *et al.*, 1991), SARS (Yip *et al.*, 2014) y HIV (Matsuda *et al.*, 1989). Particularmente en el caso de HIV se determinó que para que ocurra el efecto aumentador de la infectividad no sólo es requerida la interacción de los complejos inmunes con el FcR sino que también es necesaria la interacción con el receptor viral CD4. Probablemente el mecanismo

subyacente de ADE para DENV presente el mismo requerimiento, ya que Chotiwan *et al* (2014) determinaron que para poder desnudarse, la glicoproteína E requeriría de la interacción con su receptor primario y no sería suficiente la sola interacción del complejo virus-Ac con el FcγRIIA.

Luego de la internalización, los viriones prosiguen el tránsito intracelular a través de EE ricos en Rab5 y luego LE enriquecidos en Rab7. En los LE ubicados en el espacio perinuclear de la célula es donde ocurriría el desnudamiento viral aproximadamente a los 12 min post internalización (Figuras R.12 y R.13), lo que posicionaría estratégicamente al genoma viral para la traducción a proteínas en primer lugar y la posterior replicación en las membranas derivadas del retículo endoplásmico (Welsch *et al.*, 2009). Estos resultados son consistentes con la amplia bibliografía presentada en la introducción que considera a DENV como un virus de penetración tardía (Lozach *et al.*, 2011). Sin embargo, con DENV pareciera ser que siempre existe “la excepción que confirma la regla”, ya que se reportó en células HeLa la penetración temprana por parte de DENV-2 (NGC) y WNV, con requerimiento de Rab5, pero no de Rab7 (Krishnan *et al.*, 2007). En conclusión, DENV exhibiría una gran variabilidad en cuanto a la ruta de tránsito intracelular a utilizar dependiendo del serotipo/cepa de DENV y de la célula hospedadora (van der Schaar *et al.*, 2008; Acosta *et al.*, 2012), tal como se muestra en la figura I.8.

Finalmente, en esta primera parte del trabajo de tesis se evaluó la participación del citoesqueleto celular en los eventos tempranos del ciclo de multiplicación viral mediante compuestos farmacológicos que perturban su dinámica, ya sea por inducir la despolimerización de las fibras o por estabilizarlas permanentemente, lo cual nos permite analizar el requerimiento de la presencia de los haces o la necesidad de que los mismos presenten inalterada su dinámica.

El estudio de la participación de los microfilamentos de actina en distintas vías endocíticas celulares ha arrojado resultados variables y controversiales, por lo que parecería depender del tipo celular analizado. En células Vero vimos que el tratamiento con citocalasina D no previene el ingreso de transferrina a pesar de desestructurar eficientemente los microfilamentos de actina, por lo que la entrada mediada por clatrina en esta línea celular parece no requerir de la integridad del citoesqueleto de actina para su normal funcionamiento (Figura R.14.C). Respecto de la entrada de DENV-3 a células Vero y A549, la desestructuración de los microfilamentos de actina por parte de los

agentes despolimerizantes citocalasina D y latrunculina A así como su estabilización por faloidina no afectaron la internalización viral ni la producción de virus infeccioso (Figura R.14). La ausencia de participación de actina en la entrada de DENV-3 en células Vero confirma además que el virus no utiliza como vía productiva la macropinocitosis celular, tal como se reportó para la infección de esta línea celular con DENV-2 (Acosta *et al.*, 2009). Por el contrario, se demostró la participación de actina en la entrada de DENV-1 a células de mosquito C6/36 HT (Acosta *et al.*, 2008) y de DENV-2 a células Huh7 y HepG2 (Ang *et al.*, 2010) y a células ECV304 (Wang *et al.*, 2010), incluso en esta línea celular se observó por microscopía confocal que DENV-2 induce rearreglos en el citoesqueleto de actina durante la primer hora post infección (Yang *et al.*, 2013). Estas diferencias podrían deberse a un requerimiento diferencial de la integridad de la ruta macropinocítica o a determinantes celulares sobre la participación de actina en las vías endocíticas propias de cada línea celular.

Luego se evaluó el efecto de compuestos químicos que alteran la dinámica de los microtúbulos sobre el rendimiento y la internalización de DENV-3 a células Vero y A549 debido a que los movimientos de largo alcance de los endosomas son regulados por las proteínas Rab a través de los microtúbulos (Wandinger-Ness & Zerial, 2014). La infección de células A549 con DENV-3 estuvo disminuida en condiciones de despolimerización de los microtúbulos con colchicina o nocodazol, en tanto que la infección de células Vero no fue afectada por ambas drogas (Figura R.13). El tratamiento con nocodazol ha demostrado el requerimiento funcional de los microtúbulos para la infección de muchos virus de penetración tardía, siendo que la perturbación de la red de microtúbulos parece afectar sólo los últimos pasos de maduración de los LE (Lozach *et al.*, 2011). El resultado observado en células Vero podría estar indicando que el desnudamiento del virus ocurriría en vesículas de transporte (ECV por su sigla en inglés: *endosomal vesicle carrier*) ricas en Rab 7. Las ECV comunican los EE con los LE de manera dependiente de Arf1 (Vonderheit & Helenius, 2005), se ubican en la zona perinuclear y poseen un pH similar a los LE, además la desestructuración de los microtúbulos por nocodazol bloquea el transporte de ECV a LE (Baravelle *et al.*, 2005). En apoyo a esta hipótesis, vimos que el tiempo medio de fusión de las partículas de DENV-3 en células Vero es cercano a los 12 min post internalización (Figura R.12), menor al reportado para la fusión de DENV-2 en LE (dependientes de Rab7) o en RE (dependientes de Rab 22) que ronda entre los 14 – 17 min post infección (van der Schaar *et al.*, 2009; Zaitseva *et al.*, 2010; Acosta *et al.*, 2012).

Sin embargo, aun siendo diferencial el efecto de la despolimerización de los microtúbulos en el tránsito intracelular de DENV-3 en células Vero y A549, la dinámica del citoesqueleto juega un rol importante en la infección en ambos casos, evidenciado por la disminución del rendimiento y de la internalización virales frente a la estabilización de los microtúbulos por paclitaxel. Esto estaría indicando que algún evento temprano de la infección en común requiere de la despolimerización de los extremos positivos (dinámicos) de los microtúbulos en la periferia de la célula.

En conjunto, el estudio del mecanismo de entrada utilizado por DENV-3 en ausencia o presencia de anticuerpos a distintas líneas celulares susceptibles y la comparación con los resultados obtenidos con los serotipos DENV-1 y DENV-2 aportó resultados que demuestran la complejidad de las etapas tempranas de la infección por DENV.

## 2. *La actividad antiviral de los carragenanos frente a la infección por DENV-3*

En una segunda parte del trabajo de tesis se evaluó la actividad antiviral *in vitro* de compuestos polisulfatados que mimetizan al HS, molécula que ha sido propuesta como receptor primario y concentrador de los viriones por interacción directa con la glicoproteína E viral, como fue más extensamente comentado en la introducción. Ha sido documentado que los polisacáridos sulfatados presentan una interesante actividad anti-DENV pero de manera dependiente del serotipo viral y de la célula hospedadora (Talarico *et al.*, 2005), por lo que extendimos los estudios mecanísticos de dicha actividad antiviral frente a DENV-3 a distintas líneas celulares de mamífero. Los carragenanos  $\iota$  y  $\lambda$  presentaron actividad antiviral muy selectiva frente a la infección con DENV-3 en células de mamífero, con valores de  $CE_{50}$  del orden de 0,5–3,3  $\mu\text{g/ml}$  y sin presentar citotoxicidad a concentraciones mayores a 1 mg/ml (Tablas R.1, R.2 y Figuras R.16 y R.21). Además comprobamos que ambos carragenanos presentan una leve actividad virucida a la concentración máxima ensayada (Figura R.18), pero por ser la inhibición observada sólo del 30 % se deduce que la potente actividad inhibitoria que se detecta en las células infectadas no se debe a un efecto virucida de los carragenanos, sino a interferencia con una etapa del ciclo de multiplicación viral. Por otro lado, ambos PS no manifestaron

diferencias significativas en su efectividad como compuesto antiviral en células Vero y A549 (Figura R.17), ni en su mecanismo de acción (Figuras R.19 y R.20) por lo que los estudios posteriores se realizaron sólo con el carragenano  $\lambda$ .

Los carragenanos mostraron actividad antiviral primordialmente en los tiempos tempranos de la infección, siendo la inhibición de la multiplicación del virus del 90 – 100 % cuando los compuestos se agregaron junto con el virus o 1 h p.i. Particularmente, cuando evaluamos el efecto de los carragenanos sobre la adsorción e internalización viral se observó que ambas etapas resultaron fuertemente inhibidas por los compuestos (Figura R.20). La interferencia en la adsorción viral está de acuerdo con el modo de acción descrito para los polisulfatos contra varios virus envueltos como virus herpes simplex (HSV), citomegalovirus humano (HCMV), virus Sindbis (SINV), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la estomatitis vesicular (VSV), JUNV y virus Tacaribe (TCRV) (Baba *et al.*, 1988; Damonte *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 1996; Pujol *et al.*, 2006). Este efecto sobre la adsorción probablemente se debe a la competencia con el virus por los residuos HS presentes en los proteoglicanos celulares con los que interactuarían los virus para unirse a la célula (Tal-Singer *et al.*, 1995).

Por otro lado, posiblemente el efecto inhibitorio de los carragenanos en la internalización de DENV-3 se deba a un bloqueo en el desnudamiento de los viriones, ya que ha sido demostrado que el carragenano  $\lambda$  bloquea la penetración de DENV-2 en células Vero (Talarico & Damonte, 2007). Se ha documentado que los PS también exhiben actividad antiviral dual frente a la adsorción y penetración del virus respiratorio sincicial (Hosoya *et al.*, 1991; Ikeda *et al.*, 1994), o afectando solamente la fusión viral en el caso del virus de la rubeola (Mastromarino *et al.*, 1997), HIV (Lüscher-Mattli, 2000) y sobre el virus influenza A por interacción con el epítipo de fusión (Lüscher-Mattli & Glück, 1990; Lüscher-Mattli *et al.*, 1993; Hosoya *et al.*, 1991), a diferencia del efecto sobre HSV, el cual es únicamente sobre la adsorción viral, sin presentar actividad antiviral posterior a esa etapa (Duarte *et al.*, 2001; Mazumder *et al.*, 2002). Esta variabilidad en el blanco de acción antiviral en los eventos tempranos de la infección de distintos virus envueltos por parte de los PS hace interesante la idea de extender el estudio sobre el mecanismo de la actividad antiviral de los carragenanos post adsorción sobre DENV-3 aunque sean fuertes los indicios que indican la posibilidad del bloqueo de la penetración.

Un factor a tener en cuenta sobre los presentes estudios es el hecho de que se realizaron con la cepa de referencia H87, la cual está adaptada al crecimiento en cultivos de células. Se ha demostrado que la adaptación de los flavivirus al crecimiento *in vitro* conduce a la selección de variantes virales que se unen a HS con alta afinidad (Lee & Lobigs, 2000; Mandl *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004). Por lo tanto, sería interesante evaluar la actividad antiviral de los carragenanos sobre aislamientos clínicos de DENV-3 para conocer la susceptibilidad a estos compuestos de variantes del virus con pocos pasajes en cultivos celulares que no tendrían aumentada su reactividad con HS.

Cuando el estudio de la actividad antiviral se extendió a la infección mediada por Ac en el modelo celular U937 se observó que el carragenano  $\lambda$  no producía inhibición del rendimiento viral (Figura R. 22), aunque sí había presentado una selectiva y potente actividad antiviral en la infección de células U937 en ausencia de Ac (Figura R.21). Asimismo, también demostramos que el mecanismo de entrada de los viriones en esa línea celular es por endocitosis mediada por clatrina (Figura R.10) y el de los complejos inmunes es por una vía independiente de clatrina (Figuras R.11). Como se ha postulado que los PS interactúan con HS, que actuaría como receptor primario de DENV, la diferencia en el comportamiento del carragenano  $\lambda$  podría estar asociada a una interacción diferencial de DENV-3 para la entrada en células U937 en ausencia y presencia de Ac. La entrada de DENV-3 a células U937 estaría determinada por la abundancia de HS en la membrana y matriz celulares, en tanto que el ingreso de los complejos inmunes dependería primordialmente del receptor Fc $\gamma$ RIA y no sería tan importante la participación de los residuos HS. Esta interacción diferencial con los receptores celulares derivaría en la utilización de vías dependientes o independientes de clatrina, hipótesis que puede analizarse determinando si la eliminación de los HS de la superficie celular es capaz de producir un cambio en la vía de internalización utilizada por el virus. Al respecto, cabe acotar que se ha demostrado que el pasaje seriado de DENV-2 en células Vero seleccionó variantes resistentes a heparina y carragenanos y susceptibles a clorpromazina, es decir con una ruta de entrada clatrina-dependiente (Acosta *et al.*, 2014). Por el contrario, DENV-2 proveniente de células C6/36 ingresa a células Vero por un mecanismo endocítico no-clásico independiente de clatrina, al igual que DENV-3, y es altamente susceptible a heparina y carragenanos. Por lo tanto, en distintos sistemas celulares y bajo distintas condiciones experimentales parecería haber una relación entre

el mecanismo de entrada, la interacción virus-receptor y la susceptibilidad antiviral a agentes inhibidores de la entrada viral.

Aunque la ausencia de actividad antiviral *in vitro* del carragenano  $\lambda$  en la infección mediada por Ac parezca desalentadora, la posibilidad de producir a bajo costo grandes cantidades y la baja citotoxicidad exhibida por estos compuestos hacen que los PS sigan siendo candidatos interesantes para continuar su evaluación *in vivo* para su posible utilización en los casos de fiebre de dengue por infección primaria. Incluso para ser concluyentes en la ausencia de actividad antiviral de los carragenanos en la infección mediada por Ac es necesario evaluar el efecto sobre otros serotipos de DENV y en otros sistemas celulares por la versatilidad que presenta el virus en la infección. También puede depender la respuesta del tipo de Ac y FcR involucrados en la entrada de los complejos inmunes. Además, recientemente se ha demostrado actividad antiviral del PS denominado curdlan sulfato frente a DENV, con susceptibilidad dependiente del serotipo, tanto en presencia y ausencia de Ac; los autores postularon que el curdlan sulfato se une directamente a la glicoproteína E inhibiendo la adsorción e incluso previniendo la fusión viral (Ichiyama *et al.*, 2013). Cabe acotar que curdlan sulfato es un potente inhibidor de la entrada de HIV, HCMV, VSV y HSV y ya ha sido probado en ensayos clínicos frente a HIV y malaria.

La estrategia de bloquear la infección en etapas tempranas también ha sido explorada evaluando la actividad antiviral de otra clase de compuestos sobre ADE *in vitro*. Por ejemplo, SA-17 es un derivado del antibiótico doxorubicina que inhibe etapas tempranas de la infección por DENV-2 (Kaptein *et al.*, 2010) y presentó también actividad en la infección mediada por ADE por unión directa con los viriones, inhibiendo la adsorción y fusión virales en presencia y ausencia de Ac e independientemente del estado de maduración de las partículas virales (Ayala-Núñez *et al.*, 2013). Otro acercamiento interesante es el desarrollo de péptidos que interactúan con la glicoproteína E y que pueden prevenir la adsorción y la fusión en un modelo *in vitro* de ADE en células K562 (Nicholson *et al.*, 2010).

En conclusión, los carragenanos son compuestos con una potente y selectiva actividad antiviral en la infección en ausencia de Ac por DENV-3 en una amplia variedad de células de mamífero. La ausencia de actividad de los mismos en la infección mediada



por Ac plantea el desafío de continuar su estudio en la infección mediada por ADE en otras condiciones experimentales.

### *3. Consideraciones finales*

El estado actual de creciente incidencia de DENV en la población humana, la ausencia de vacunas probadamente efectivas para la prevención de la infección y la carencia de agentes antivirales para el tratamiento de las afecciones que el virus provoca, hacen urgente y necesario ahondar los estudios sobre la biología del virus y el desarrollo de compuestos quimioterapéuticos. El trabajo desarrollado en nuestro laboratorio es un aporte en esta línea de trabajo.

En la última década hemos demostrado que el comportamiento de DENV frente a los compuestos antivirales dirigidos contra los eventos tempranos de la infección es altamente dependiente de factores virales y celulares. DENV ha mostrado una susceptibilidad diferencial frente a PS dependiente del serotipo viral y dicha variabilidad ha sido asociada a diferencias en la entrada viral, sin embargo la mayoría de los trabajos publicados fueron realizados con DENV-2. Este escenario, sumado al requerimiento de que los agentes protectores sean efectivos contra los cuatro serotipos para evitar el desarrollo de las afecciones graves por DENV debido al fenómeno de ADE, plantea la necesidad de determinar los aspectos conservados entre los distintos serotipos para desarrollo de los compuestos quimioterapéuticos. Particularmente, en el presente trabajo de tesis contribuimos al conocimiento del mecanismo de entrada de DENV-3 en ausencia y presencia de Ac a una variedad de líneas celulares de mamífero y sus posibles implicancias en la actividad antiviral de los carragenanos.

Dada la gran versatilidad exhibida por DENV queda mucho trabajo por delante, sin embargo el aporte realizado representa un avance en el conocimiento de las etapas tempranas del ciclo de multiplicación del virus y de su relación con los agentes antivirales, necesario para poder desarrollar estrategias de prevención y tratamiento de esta enfermedad que presenta una creciente reemergencia a nivel mundial.

# BIBLIOGRAFÍA |

- Acha PN (2003) Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera edición Volumen II Clamidiosis, rickettsiosis y virosis. *Organización Panamericana de la Salud*. Publicación Científica y Técnica N° 580.
- Acosta EG & Bartenschlager R (2016) Paradoxical role of antibodies in dengue virus infections: considerations for prophylactic vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 15(4):467-82.
- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB (2008) Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 89(2), 474–484.
- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB (2009) Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol.* 11(10):1533-49.
- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB (2011) Infectious dengue-1 virus entry into mosquito C6/36 cells. *Virus Res.* 160(1–2), 163–179.
- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB (2012) Differential requirements in endocytic trafficking for penetration of dengue virus. *PLoS One*. 7(9):e44835.
- Acosta EG, Kumar A, Bartenschlager R (2014a) Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology. *Adv Virus Res.* 88:1-109.
- Acosta EG, Piccini LE, Talarico LB, Castilla V, Damonte EB (2014b) Changes in antiviral susceptibility to entry inhibitors and endocytic uptake of dengue-2 virus serially passaged in Vero or C6/36 cells. *Virus Res.* 184:39-43.
- Aleksandrowicz P, Marzi A, Biedenkopf N, Beimforde N, Becker S, Hoenen T, Feldmann H, Schnittler HJ (2011) Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *J. Infect. Dis.* 204 Suppl 3:S957-67.
- Alen MM, De Burghgraeve T, Kaptein SJ, Balzarini J, Neyts J, Schols D (2011) Broad antiviral activity of carbohydrate-binding agents against the four serotypes of dengue virus in monocyte-derived dendritic cells. *PLoS ONE* 6(6), e21658.

- Alhoot MA, Rathinam AK, Wang SM, Manikam R, Sekaran SD (2013) Inhibition of dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides. *Int. J. Med. Sci.* 10(6), 719–729.
- Alhoot MA, Wang SM, Sekaran SD (2011) Inhibition of dengue virus entry and multiplication into monocytes using RNA interference. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(11), e1410.
- Alhoot MA, Wang SM, Sekaran, SD (2012) RNA interference mediated inhibition of dengue virus multiplication and entry in HepG2 cells. *PLoS One.* 7(3), e34060.
- Altmeyer R (2004) Virus attachment and entry offer numerous targets for antiviral therapy. *Curr Pharm Design.* 10, 3701-3712.
- Anderson, H.A., Chen, Y., & Norkin, L.C. (1996) Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Biol. Cell* 7, 1825-1834
- Ang F, Wong AP, Ng MM, Chu JJ (2010) Small interference RNA profiling reveals the essential role of human membrane trafficking genes in mediating the infectious entry of dengue virus. *Virology* 50, 7-24.
- Avilés G, Rangeón G, Vorndam V, Briones A, Baroni P, Enria D, Sabattini MS (1999) Dengue reemergence in Argentina. *Emerg Infect Dis.* 5: 575-578.
- Baba M, Snoeck R, Pauwels R, de Clercq E (1988) Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiencyvirus. *Antimicrob Agents Chemother.* 32(11):1742-5.
- Bangphoomi N, Takenaka-Uema A, Sugi T, Kato K, Akashi H, Horimoto T (2014) Akabane Virus Utilizes Alternative Endocytic Pathways to Entry into Mammalian Cell lines. *J Vet Med Sci.* 76(11): 1471–1478.
- Baravalle G, Schober D, Huber M, Bayer N, Murphy RF, Fuchs R (2005) Transferrin recycling and dextran transport to lysosomes is differentially affected by bafilomycin, nocodazole, and low temperature. *Cell Tissue Res.* 320(1):99-113.

- Beer C, Andersen DS, Rojek A, Pedersen L (2005) Caveola dependent endocytic entry of amphotropic murine leukemia virus. *J Virol.* 79(16):10776-87.
- Benmerah A, Bayrou M, Cerf-Bensussan N, Dautry-Varsat A (1999) Inhibition of clathrin coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J. Cell Sci.* 112: 1303-1311.
- Benmerah, A.; Lamaze, C.; Bègue, B.; Schmid, S.L.; Dautry-Varsat, A. Cerf-Bensussan, N. (1998) AP-2/Eps 15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 140: 1055-1062.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 496(7446):504-7.
- Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y (2006) Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis *J Virol* 80, N° 14, 6964–6972.
- Bolard J (1986) How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta.* 864(3-4):257-304.
- Borges MC, Castro LA, Fonseca BA (2013) Chloroquine use improves dengue-related symptoms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108(5), 596–599.
- Cameron AJ, McDonald KJ, Harnett MM, Allen JM (2002) Differentiation of the human monocyte cell line, U937, with dibutyryl cyclicAMP induces the expression of the inhibitory Fc receptor, FcγRIIb. *Immunol Lett.* 83(3):171-9.
- Candurra NA, Scolaro LA, Mersich SE, Damonte EB, Coto CE (1990) A comparison of Junin virus strains: growth characteristics, cytopathogenicity and viral polypeptides. *Res Virol.* 141(5):505-15.
- Cardosa MJ, Wang SM, Sum MS, Tio PH (2002) Antibodies against prM protein distinguish between previous infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *BMC Microbiol.* 2:9.

- Carro AC & Damonte EB (2013) Requirement of cholesterol in the viral envelope for dengue virus infection. *Virus Research*. 174: 78–87.
- Castilla V, Mersich SE, Candurra NA, Damonte EB (1994) The entry of Junin virus into Vero cells. *Arch Virol*. 136(3-4):363-74.
- Castilla V, Piccini LE, Damonte EB (2015) Dengue virus entry and trafficking: perspectives as antiviral target for prevention and therapy. *Future Virol*. 10(5), 625-645.
- Caviston JP & Holzbaur EL (2006) Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol*. 16(10):530-7.
- Chanput W, Peters V, Wichers H (2015) Chapter 14: THP-1 and U937 Cells. K. Verhoeckx *et al.* (eds.) *The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health*. pp 147-159.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med*. 3(8), 866–871.
- Chen YC, Wang SY, King CC (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(4), 2650–2657.
- Chotiwan N, Roehrig JT, Schlesinger JJ, Blair CD, Huang CY (2014) Molecular determinants of dengue virus 2 envelope protein important for virus entry in FcγRIIA-mediated antibody-dependent enhancement of infection. *Viol J*. 456-457:238-46.
- Chu JJH & Ng ML (2004) Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* 78, 10543–10555.
- Clement C, Tiwari V, Scanlan PM, Valyi-Nagy T, Yue BY, Shukla D (2006) A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol*. 174(7):1009-21.
- Cooper JA (1987) Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J. Cell Biol*. Vol105, 1473-1478.

- Cossart P & Helenius A (2014) Endocytosis of Viruses and Bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 08/2014; 6(8).
- Costin JM, Jenwitheesuk E, Lok SM, Hunsperger E, Conrads KA, Fontaine KA, Rees CR, Rossmann MG, Isern S, Samudrala R, Michael SF (2010) Structural optimization and de novo design of dengue virus entry inhibitory peptides. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(6), e721.
- Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Henin D, Deubel V (1999) Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum. Pathol.* 30: 1106-1110.
- Coyne CB & Bergelson JM (2006) Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124: 119-131.
- Crill WD & Roehrig JT (2001) Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol.* 75(16), 7769–7773.
- Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MA, Da Poian AT (2014) Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev.* 39(2):155-70.
- da Costa SR, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF (2003) Actin microfilaments et al.-the many components, effectors and regulators of epithelial cell endocytosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 55(11):1359-83.
- Damke H, Baba T, van der Blik AM, Schmid SL (1995) Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol.* 131(1):69-80.
- Damonte E, Neyts J, Pujol CA, Snoeck R, Andrei G, Ikeda S, Witvrouw M, Reyman D, Haines H, Matulewicz MC, Cerezo A, Coto CE, De Clercq E (1994) Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Biochem Pharmacol.* 47(12):2187-92.

- Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS (2004b) Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr Med Chem*. 11, 2399-2419.
- Damonte EB, Pujol CA, Coto CE (2004a) Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Adv Virus Res*. 63:239-85.
- Dautry-Varsat A (1986) Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie*. 68: 375-381.
- Davidson AD (2009) Chapter 2. New insights into flavivirus nonstructural protein 5. *Adv Virus Res*. 74, 41–101.
- De Burghgraeve T, Kaptein SJ, Ayala-Nunez NV, Mondotte JA, Pastorino B, Printsevskaya SS, de Lamballerie X, Jacobs M, Preobrazhenskaya M, Gamarnik AV, Smit JM, Neyts J. (2012) An analogue of the antibiotic teicoplanin prevents flavivirus entry in vitro. *PLoS ONE*. 7(5), e37244.
- de Vries E, Tscherne DM, Wienholts MJ, Cobos-Jiménez V, Scholte F, García-Sastre A. (2011) Dissection of the Influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog* Vol 7, Issue 3, pp.1-19.
- Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ (2006) The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*. 368(9530):170-3.
- Dinneen JL, Ceresa BP (2004) Expression of dominant negative rab5 in HeLa cells regulates endocytic trafficking distal from the plasma membrane. *Exp Cell Res*. 294(2):509-22.
- Dowd KA, Pierson TC (2011) Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. *Virology* 15;411(2):306-15
- Duarte ME, Nosedá DG, Nosedá MD, Tulio S, Pujol CA, Damonte EB (2001) Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplexvirus replication in vitro. *Phytomedicine*. 8(1):53-8.



- Eash S & Atwood WJ (2005) Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol.* pp. 11734-11741.
- Engqvist-Goldstein AE & Drubin DG (2003) Actin Assembly and Endocytosis: From Yeast to Mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:287-332.
- Estes JE, Selden LA, Gershman LC (1981) Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin. *Biochemistry* 20(4):708-12.
- Ewers H & Helenius A (2011) Lipid-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(8):a004721.
- Fernandez-Borja M, Wubbolts R, Calafat J, Janssen H, Divecha N, Dusseljee S, Neefjes J (1999) Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr Biol.* 9: 55-58.
- Filomatori CV, Iglesias NG, Villordo SM, Alvarez DE, Gamarnik AV (2011) RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase. *J. Biol. Chem.* 286(9), 6929–6939.
- Foo KY & Chee HY (2015) Interaction between Flavivirus and Cytoskeleton during Virus Replication. *Biomed Res Int.* 2015:427814.
- Fu MM & Holzbaur EL (2014) Integrated regulation of motor-driven organelle transport by scaffolding proteins. *Trends Cell Biol.* 24(10):564-74.
- Fujimoto LM, Roth R, Heuser JE, Schmid SL. (2000) Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic*, 1(2):161-71.
- Gómez-Dantés H & Willoquet JR (2009) Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. *Cad Saude Publica.* 25 Suppl 1:S19-31.
- Grove J & Marsh M (2011) The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol.* 195(7): 1071–1082.

- Gruenberg J, Griffiths G, Howell KE (1989) Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol.* 108(4):1301-16.
- Gubler DJ (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 480–496.
- Gubler DJ (2006) Dengue/dengue haemorrhagic fever: History and current status. *Novartis Foundation Symposium.* 277, 3–16, discussion 16–22, 71–13, 251–253.
- Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB (2013) Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibodydependent enhancement of infection. *Arch Virol.*158:1445-59
- Hadinegoro SR, Arredondo-Garcia JL, Capeding MR *et al.* (2015)Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med.* 373(13), 1195-1206.
- Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH (1987) Conserved elements in the untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol.* 198(1), 33–41.
- Halstead SB (2014) Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol Spectrum.* 2(6) AID-0022-2014
- Halstead SB, Cohen SN (2015) Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. *Microbiol Mol Biol Rev*, vol 79, N° 3, pp 281-191.
- Harris E, Holden KL, Edgil D, Polacek C, Clyde K (2006) Molecular biology of flaviviruses. New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases. *Novartis Foundation* CA 94720–7360
- Hase T, Summers PL, Eckels KH (1989) Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch Virol.* 104(1–2), 129–143.
- Hashimoto K, Kodama E, Mori S, Watanabe J, Baba M, Okutani K, Matsuda M, Shigeta, S (1996) Antiviral activity of a sulphated polysaccharide extracted from the marine

- Pseudomonas* and marine plant Dinoflagellata against human immunodeficiency viruses and other enveloped viruses. *Antivir. Chem. Chemother.* 7: 189-196.
- Hawkes RA (1964) Enhancement of the infectivity of arboviruses by specific antisera produced in domestic fowls. *Aust J Exp Biol Med Sci* 42:465-482.
- Hayashi K, Hayashi T, Kojima I (1996) A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 12(15):1463-71.
- Horwitz SB (1994) Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Ann Oncol.* 5 Suppl 6:S3-6.
- Hosoya M, Balzarini J, Shigeta S, De Clercq E (1991) Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins. *Antimicrob Agents Chemother.* 35(12):2515-20.
- Hu HP, Hsieh SC, King CC, Wang WK (2007) Characterization of retrovirus based reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengue viruses. *Virology*. 368(2), 376–387.
- Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR (2004) Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol.* 149(5), 915–927.
- Johannsdottir HK, Mancini R, Kartenbeck J, Amato L, Helenius A (2009) Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry. *J Virol.* 83: 440-453.
- Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(6):404-14.
- Kalia M & Jameel S (2011) Virus entry paradigms. *Amino Acids.* 41(5):1147-57.
- Kalia M, Khasa R, Sharma M, Nain M, Vrati S (2013) Japanese encephalitis virus infects neuronal cells through a clathrin-independent endocytic mechanism. *J Virol.* 87: 148–162.

- Kaptein SJ, De Burghgraeve T, Froeyen M, Pastorino B, Alen MM, Mondotte JA, Herdewijn P, Jacobs M, de Lamballerie X, Schols D, Gamarnik AV, Sztaricskai F, Neyts J. (2010) A derivate of the antibiotic doxorubicin is a selective inhibitor of dengue and yellow fever virus replication in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(12), 5269–5280.
- Kaufmann B & Rossmann MG (2010) Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect.* 13(1):1-9.
- Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapavati N, Gubler DJ (1997) Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology.* 230(2):300-8.
- Kontny U, Kurane I, Ennis FA (1988) Gamma interferon augments Fc gamma receptor mediated dengue virus infection of human monocytic cells. *J Virol* 62:3928–3933
- Kornilova ES (2014) Receptor-mediated endocytosis and cytoskeleton. *Biochemistry (Mosc)* 79(9):865-78.
- Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WW, Rose RC, Schlesinger JJ, Jin X (2008) Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol.* 80(1):134-46.
- Krishnan MN, Sukumaran B, Pal U, Agaisse H, Murray JL, Hodge TW, Fikrig E (2007) Rab 5 is required for the cellular entry of dengue virus and West Nile viruses. *J. Virol.* 81(9), 4881–4885.
- Kroschewski H, Lim SP, Butcher RE, Yap TL, Lescar J, Wright PJ, Vasudevan SG, Davidson AD (2008) Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain. *J. Biol. Chem.* 283(28), 19410–19421.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH (2002) Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation and fusion. *Cell.* 108(5), 717–725.

- Lajoie P & Nabi IR (2007) Regulation of raft-dependent endocytosis. *J. Cell. Mol. Med.* 11:644–53.
- Lamaze C, Fujimoto LM, Yin HL, Schmid SL (1997) The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J Biol Chem.* 15;272(33):20332-5.
- Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW (1994) Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol.* 75: 65-75.
- Lee CJ, Lin HR, Liao CL, Lin YL (2008) Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J Virol.* 82(13), 6470–6480.
- Lee E, Hall RA, Lobigs M (2004) Common E protein determinants for attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis and West Nile viruses. *J. Virol.* 78: 8271-8280.
- Lee E, Lobigs M (2000) Substitutions at the putative receptor-binding site of an encephalitic flavivirus alter virulence and host cell tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry. *J. Virol.* 74: 8867-8875.
- Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA (2008) Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol.* 82(10), 4731–4741.
- Levitzki A, Willingham M, Pastan I (1980) Evidence for participation in transglutaminase in receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2707-2710.
- Lim JP & Gleeson PA (2011) Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol.* 89(8):836-43.
- Lim SP, Wang QY, Noble CG, Chen YL, Dong H, Zou B, Yokokawa F, Nilar S, Smith P, Beer D, Lescar J, Shi PY. (2013) Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral Res.* 100(2):500-19.
- Lim, HY & Ng ML (1999) A different mode of entry by dengue-2 neutralisation escape mutant virus. *Arch Virol.* 144(5), 989–995.

- Lin LT, Chen TY, Lin SC, Chung CY, Lin TC, Wang GH, Anderson R, Lin CC, Richardson CD (2013) Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. *BMC Microbiol.* 13, 187.
- Lindenbach BD & Rice CM (2001) Flaviridae: the viruses and their replication. En: Knipe DM, Howley PM (Eds.), *Fundamental Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 589-639.
- Lindenbach BD & Rice CM (2003) Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 59: 23-61.
- Littaua R, Kurane I, Ennis FA (1990) Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol.* 144(8):3183-86.
- Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A (2005) Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J. Biol. Chem.* 280(25), 23698–23708.
- Lozach PY, Huotari J, Helenius A. (2011) Late-penetrating viruses. *Curr Opin Virol.* 1(1), 35–43.
- Lüscher-Mattli M & Glück R (1990) Dextran sulfate inhibits the fusion of influenza virus with model membranes, and suppresses influenza virus replication *in vivo*. *Antiviral Res.* 14: 39-50.
- Lüscher-Mattli M (2000) Polyanions - a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases? *Antivir. Chem. Chemother.* 11: 249-259.
- Lüscher-Mattli M, Glück R, Kempf C, Zanoni-Grassi M (1993). A comparative study of the effect of dextran sulfate on the fusion and the *in vitro* replication of influenza A and B, Semliki Forest, vesicular stomatitis, rabies, Sendai and mumps virus. *Arch. Virol.* 130: 317-326.
- Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell.* 10(6):839-50.

- Mackenzie JM, Jones MK, Young PR (1996) Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*. 220(1), 232–240.
- Malet H, Egloff MP, Selisko B, Butcher RE, Wright PJ, Roberts M, Gruez A, Sulzenbacher G, Vonrhein C, Bricogne G, Mackenzie JM, Khromykh AA, Davidson AD, Canard B (2007) Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J. Biol. Chem.* 282(14), 10678–10689.
- Mandl CW, Kroschewski H, Allison SL, Kofler R, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX (2001) Adaptation of Tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation *in vivo*. *J. Virol.* 75: 5627-5637.
- Marsh M & Helenius A (2006) Virus entry: open sesame. *Cell* 124: 729-740.
- Martinez MG, Forlenza MB, Candurra NA (2009) Involvement of cellular proteins in Junin arenavirus entry. *Biotechnol J.* 4(6):866-70.
- Mastromarinoa P, Petruzzielloa R, Macchiaa S, Rietia S, Nicolettib R, Orsia N (1997) Antiviral activity of natural and semisynthetic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, 339–345.
- Masuh E (2008) Re-emergence of dengue in Argentina: Historical development and future challenges. *Dengue Bulletin* 32, 44-54.
- May RC & Machesky LM (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci* 114: 1061-1077.
- Mazumder S, Ghosal PK, Pujol CA, Carlucci MJ, Damonte EB, Ray B (2002) Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Int J Biol Macromol.* 31(1-3):87-95.
- Meertens L, Carnec X, Lecoïn MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A (2012) The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host & Microbe.* 12(4), 544–557.

- Mercer J & Helenius A (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*. 320(5875), 531–535.
- Mercer J, Schelhaas M, Helenius A (2010) Virus Entry by Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 79:803–33
- Mikita CP & Padlan EA (2016) Can we find a possible structural explanation for antibody-dependent enhancement of dengue virus infection resulting in hemorrhagic fever? *Med Hypotheses*. 88:49-52.
- Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S (2008) The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog.* 4(2), e17.
- Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R (2007) The nonstructural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J. Biol. Chem.* 282(12), 8873–8882.
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia N° 309. ISSN 2422-698X.
- Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Enfermedades infecciosas: DENGUE. Diagnóstico de dengue. Guía para el equipo de salud. 4ta ed., año: 2015.
- Mizzen L, Hilton A, Cheley S, Anderson R (1985) Attenuation of murine coronavirus infection by ammonium chloride. *Virology* 142: 378-388.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 427(6972), 313–319.
- Morales MA, Lejona S, Acebal S, Uboldi A, Anchar E, Chumpitaz A, Tomisani A, García J, Fabbri C, Luppo V, Levis S, Enría DA (2010) Detection of indigenous dengue virus serotype 4 (DENV-4) in Rosario, Argentina, 2010. *III International Clinical Virology Symposium and Advances in Vaccines*, Buenos Aires, Argentina.
- Mori S, Takeuchi T, Kanda T (2008) Antibody-dependent enhancement of adeno-associated virus infection of human monocytic cell lines. *Virology*. 375(1):141-47.



- Morton WM, Ayscough KR, McLaughlin PJ (2000) Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol.* 2(6):376-8.
- Mosso C, Galván-Mendoza IJ, Ludert JE, del Angel RM (2008) Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* 378(1), 193–199.
- Mukhopadhyay, S.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 3: 13-22.
- Muroi M, Shiragami N, Nagao K, Yamasaki M, Takatsuki A. (1993) Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of V-ATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the Golgi apparatus. *Cell Struct Funct.* 18:139–149.
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Desprès 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(7), 723–728.
- Nawa M, Takasaki T, Yamada K, Kurane I, Akatsuka T (2003) Interference in Japanese encephalitis virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine. *J Gen Virol.* (Pt):1737-41.
- Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA, Zerial M (1999) Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol.* 1(6):376-82.
- Noble CG, Chen Y-L, Dong H, Gu F, Lim SP, Schul W, Wang Q-Y, Shi P-Y (2010) Strategies for development of dengue virus inhibitors. *Antiviral Res.* 85: 450-462.
- O'Donnell V, Larocco M, Baxt B (2008) Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters via caveola-mediated endocytosis. *J Virol.* 82(18):9075-85.
- Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fusion from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol.* 141: 101-114.

- Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J (1989) Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem.* 186(1-2):17-22.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS) - Organización Mundial de la Salud (OMS) (marzo 2014) Hoja informativa de las enfermedades transmitidas por vectores Dengue
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* 3, 473e483.
- Peng T, Wang JL, Chen W, Zhang JL, Gao N, Chen ZT, Xu XF, Fan DY, An J (2009) Entry of dengue virus serotype 2 into ECV304 cells depends on clathrin-dependent endocytosis, but not on caveolae-dependent endocytosis. *Can. J. Microbiol.* 55(2), 139–145.
- Perera R & Kuhn RJ (2008) Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 11(4), 369–377.
- Pitisuttithum P & Bouckennooghe A (2016) The first licensed dengue vaccine: an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection. *Expert Rev Vaccines*. ISSN: 1476-0584
- Pong WL, Huang ZS, Teoh PG, Wang CC, Wu HN (2011) RNA binding property and RNA chaperone activity of dengue virus core protein and other viral RNA-interacting proteins. *FEBS Letters.* 585(16), 2575–2581.
- Preta G, Cronin JG, Sheldon IM (2015) Dynasore - not just a dynamin inhibitor. *Cell Commun Signal.* pp.13-24.
- Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 150(5):F111-6.
- Qualmanna B, Kesselsa MM, Kelly RB (2000) Molecular Links between Endocytosis and the Actin Cytoskeleton. *J Cell Biol.* 4; 150(5): 111–116.
- Quintos FN, Lim LE, Juliano L, Reyes A, Lacson P (1954) Hemorrhagic fever observed among children in the Philippines. *Philipp J Pediatr* 3:1–19.

- Randolph VB & Stollar V (1990) Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J Gen Virol.* 71(Pt. 8), 1845–1850.
- Ravetch JV & Kinet JP (1991) Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 9:457-92.
- Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM (2005) Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 79(8), 4557–4567.
- Roberts RL, Barbieri MA, Ullrich J, Stahl PD (2000) Dynamics of rab5 activation in endocytosis and phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 68(5):627-32.
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell.* 10(4):961-74.
- Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei HY, Wilschut J, Smit JM. (2010<sup>a</sup>). Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS Pathog.* 6(1):e1000718.
- Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM (2010<sup>b</sup>) Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.* 67(16):2773-86.
- Rodman JS & Wansinger-Ness A (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *J. Cell Sci.* 113(2), 183-192.
- Rodrigo WW, Jin X, Blackley SD, Rose RC, Schlesinger JJ (2006) Differential enhancement of dengue virus immune complex infectivity mediated by signaling-competent and signaling-incompetent human FcγRI (CD64) or FcγRIIA (CD32). *J Virol* 80:10128-10138
- Root KT, Plucinsky SM, Glover KJ (2015) Recent progress in the topology, structure, and oligomerization of caveolin: a building block of caveolae. *Curr Top Membr.* 75:305-36.
- Rosen L, Drouet MT, Deubel V (1999) Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61: 720-724.

- Rothman AL (2004) Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J. Clin. Inv.* 113 (7), 946-951.
- Samsa MM, Mondotte, JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV (2009) Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* 5(10), e1000632.
- San Martin, J. L., Brathwaite, O., Zambrano, B., Solorzano, J. O., Bouckennooghe, A., Dayan, G. H., et al. (2010). The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* 82(1), 128–135.
- Sauvonnet N, Dujeancourt A, Dautry-Varsat A (2005) Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of (gamma)c cytokine receptor. *J Cell Sci* 118:155-163.
- Schelhaas M (2010) Come in and take your coat off – how host cells provide endocytosis for virus entry- *Cell Microbiol.* Vol.12, Issue 10, pp 1378–88,
- Schmid MA & Harris E (2014) Monocyte recruitment to the dermis and differentiation to dendritic cells increases the targets for dengue virus replication. *PLoS Pathog.* 10(12):e1004541.
- Seijo A, Romer Y, Espinosa M, Monroig J, Giamperetti S, Ameri D, Antonelli LG (2009) Brote de dengue autóctono en el Área Metropolitana de Buenos Aires: Experiencia del Hospital de Enfermedades Infecciosas *F. J. Muñiz. Medicina (B Aires)* 69: 593-600.
- Seijo, A. (2009) Dengue 2009: cronología de una epidemia. *Arch Argent Pediatr.* 107: 387-389.
- Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, Kim T, O'Brien KM, Nelson CA, Johnson S, Fremont DH, Diamond MS (2010) The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog.* 6, e1000823.

- Shrivastava N, Sripada S, Kaur J, Shah PS, Cecilia D (2011) Insights into the internalization and retrograde trafficking of dengue virus in BHK-21 cells. *PLoS ONE* 6(10), e25229.
- Sieczkarski SB & Whittaker GR (2002) Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 76: 10455-10464.
- Silva L, Coutinho A, Fedorov A, Prieto M (2006a) Nystatin-induced lipid vesicles permeabilization is strongly dependent on sterol structure. *Biochim Biophys Acta.* 1758(4):452-9.
- Silva L, Coutinho A, Fedorov A, Prieto M (2006b) Competitive Binding of Cholesterol and Ergosterol to the Polyene Antibiotic Nystatin. A Fluorescence Study. *Biophys J.* 90(10):3625-31.
- Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J (2011) Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses.* 3(2): 160–171.
- Smith JL, Campos SK, Ozbun MA (2007) Human papillomavirus type 31 uses a caveolin-1 and dynamin 2-mediated entry for infection of human keratinocytes. *J Virol.* 81(18):9922-31.
- Spoden G, Freitag K, Hausmann M, Boller K, Sapp M, Lambert C, Florin L (2008) Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16-Involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS ONE.* 2008; 3: e3313.
- Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P (2011) The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus *Pegivirus* within the family *Flaviviridae*. *J Gen Virol.* 92(Pt 2): 233–246.
- Stein MP, Dong J, Wandinger-Ness A (2003) Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(11), 1421-1437.
- Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lütcke A, Gruenberg J, Zerial M (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13: 1287-1296.

- Stiasny K, Fritz R, Pangerl K, Heinz FX (2011) Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids*. 41(5):1159-63.
- Suksanpaisan L, Susantad T, Smith DR (2009) Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *J Biomed Sci*. 4;16:17.
- Sun Y & Tien P (2013) From endocytosis to membrane fusion: emerging roles of dynamin in virus entry. *Crit Rev Microbiol*. 39(2):166-79.
- T. Hase, P. L. Summers, K. H. Eckels (1989) Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch Virol*. Vol 104, Issue 1, pp 129-143.
- Talarico LB & Damonte EB (2007) Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. *Virology*. 363(2):473-85.
- Talarico LB, Duarte ME, Zibetti RG, Nosedá MD, Damonte EB (2007) An algal-derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection. *Planta Med*. 73(14), 1464-1468.
- Talarico LB, Nosedá MD, Ducatti DRB, Duarte MER, Damonte EB (2011) Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. *J. Gen. Virol*. 92(6), 1332-1342.
- Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RG, Faría PC, Nosedá MD, Duarte ME, Damonte EB (2005) The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Res* 66(2-3), 103-110.
- Tal-Singer R, Peng C, Ponce De Leon M, Abrams WR, Banfield BW, Tufaro F, Cohen GH, Eisenberg RJ (1995) Interaction of herpes simplex virus glycoprotein gC with mammalian cell surface molecules. *J Virol*. 69(7):4471-83.
- Tapia-Conyer R, Betancourt-Cravioto M, Méndez-Galván J. (2012) Dengue: an escalating public health problem in Latin America. *Pediatr Int Child Health*. 32(1):14-7.
- Tassaneetrithep, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA (2003) DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells *J. Exp. Med*. 197(7), 823–829.

- Thorley JA, McKeating JA, Rappoport JZ (2010) Mechanisms of viral entry: sneaking in the front door. *Protoplasma*. 244(1-4):15-24.
- Tricou V, Minh NN, Van TP, Lee SJ, Farrar J, Wills B, Tran HT, Simmons CP (2010) A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(8), e785.
- Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG (2006) Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J. Gen. Virol.* 87(Pt. 9), 2605–2614.
- Umashankar M, Sánchez-San Martín C, Liao M, Reilly B, Guo A, Taylor G, Kielian M (2008) Differential cholesterol binding by class II fusion proteins determines membrane fusion properties. *J. Virol.* 82(18), 9245–9253.
- van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. (2007). Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol.* 81(21), 12019–12028.
- van der Schaar HM, Wilschut JC, Smit JM (2009) Role of antibodies in controlling dengue virus infection. *Immunobiology* 214(7):613-29
- van der Schaar, HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM (2008). Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* 4(12), e1000244.
- Velumani S, Toh YX, Balasingam S, Archuleta S, Leo YS, Gan VC, Thein TL, Wilder-Smith A, Fink K (2016) Low antibody titers 5 years after vaccination with the CYD-TDV dengue vaccine in both pre-immune and naïve vaccinees. *Hum Vaccin Immunother.* 12(5):1265-73.
- Vezzani D & Carbajo AE (2008) *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103: 66-74.

- Villordo SM, Alvarez DE, Gamarnik AV (2010) A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication. *RNA*.16(12), 2325–2335.
- Vonderheit A & Helenius A (2005) Rab7 Associates with Early Endosomes to Mediate Sorting and Transport of Semliki Forest Virus to Late Endosomes. *PLoS Biol.* 3(7): e233.
- Wandinger-Ness A & Zerial M (2014) Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 23;6(11):a022616.
- Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG (1993) Miss-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123: 1107-1117.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host & Microbe.* 5(4), 365–375.
- Woo JM, Shinohara C, Sakai K, Hasumi K, Endo A (1992) Isolation, characterization and biological activities of concanamycins as inhibitors of lysosomal acidification. *J. Antibiot.* 45: 1108-1116.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS (2000) Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 6(7):816-20.
- Xie X, Gayen S, Kang C, Yuan Z, Shi PY (2013) Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *J Virol.* 87(8), 4609–4622.
- Yang J, Zou L, Hu Z, Chen W, Zhang J, Zhu J, Fang X, Yuan W, Hu X, Hu F, Rao X. (2013) Identification and characterization of a 43 kDa actin protein involved in the DENV-2 binding and infection of ECV304 cells. *Microbes Infect.* 15(4):310-8.



- Yang JM, Chen YF, Tu YY, Yen KR, Yang YL (2007) Combinatorial computational approaches to identify tetracycline derivatives as Flavivirus inhibitors. *PLoS ONE* 2(5), e428.
- Yap TL, Xu T, Chen YL, Malet H, Egloff MP, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J (2007) Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J Virol.* 81(9), 4753–4765.
- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J (2008) Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.* 319(5871), 1834–1837.
- Zaitseva E, Yang ST, Melikov K, Pourmal S, Chernomordik LV (2010) Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathog.* 6(10), e1001131.
- Zhang JL, Wang J L, Gao N, Chen ZT, Tian YP, An J (2007) Up-regulated expression of beta3 integrin induced by dengue virus serotype 2 infection associated with virus entry into human dermal microvascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical. Comm. Res.* 356(3), 763–768.
- Zhang L, Mohan PM, Padmanabhan R (1992) Processing and localization of dengue virus type 2 polyprotein precursor NS3-NS4A-NS4B-NS5. *J Virol.* 66(12), 7549–7554.
- Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ (2003) Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol.* 10(11), 907–912.
- Zhang X, Sheng J, Plevka P, Kuhn RJ, Diamond MS, Rossmann MG (2013) Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(17), 6795–6799.
- Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG (2003) Structures of immature flavivirus particles. *EMBO Journal,* 22(11), 2604–2613.

- Zhang Y, Kostyuchenko VA, Rossmann MG (2007) Structural analysis of viral nucleocapsids by subtraction of partial projections. *J. Struct. Biol.* 157(2), 356–364.
- Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG (2004) Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*. 12: 1607-1618.
- Zhang, X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, Schein S, Zhou ZH (2013) Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol.* 20(1), 105–110.
- Zhu YZ, Xu QQ, Wu DG, Ren H, Zhao P, Lao WG, Wang Y, Tao QY, Qian XJ, Wei YH, Cao MM, Qi ZT (2012) Japanese encephalitis virus enters rat neuroblastoma cells via a pH-dependent, dynamin and caveola-mediated endocytosis pathway. *J Virol.* 13407–13422.
- Zieve GW, Turnbull D, Mullins JM, McIntosh JR (1980) Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor Nocodazole: Nocodazole accumulated mitotic cells. *Exp Cell Res.* 126(2):397-40.