

Tesis Doctoral

La entrada del virus dengue a la célula huésped

Acosta, Eliana Gisela

2011

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Acosta, Eliana Gisela. (2011). La entrada del virus dengue a la célula huésped. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Acosta, Eliana Gisela. "La entrada del virus dengue a la célula huésped". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

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 A LA CÉLULA HUÉSPED

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

Lic. Eliana Gisela Acosta

Director de Tesis: Prof. Dra. Elsa Beatriz Damonte
Director Asistente: Dra. Viviana Castilla
Consejero de Estudios: Prof. Dra. Elsa Beatriz Damonte

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

Buenos Aires, 2011

En la actualidad casi la mitad de la población mundial se encuentra en riesgo de infección con dengue, resultando la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en todo el mundo. A pesar de la creciente incidencia de este virus, al momento no existen vacunas o quimioterapia antiviral disponibles. Dado que el conocimiento del ciclo de multiplicación viral es indispensable como punto de partida para el diseño de agentes quimioterapéuticos, el presente trabajo de tesis se propuso estudiar los pasos iniciales de la infección con DENV: el mecanismo de entrada a la célula huésped. Nuestro estudio se centralizó en el análisis *in vitro* de los factores celulares involucrados en la internalización, transporte intravesicular y desnudamiento del virus y la influencia del tipo de célula (mamífero o insecto), cepa y serotipo viral sobre dichos procesos. Mediante el uso combinado de inhibidores químicos y moleculares, medidas de infectividad y técnicas de microscopía electrónica y de fluorescencia demostramos que la entrada del serotipo DENV-1 en células Vero ocurre por endocitosis dependiente de clatrina, mientras que la entrada del serotipo DENV-2 tiene lugar por un mecanismo no clásico independiente de clatrina, caveolas y *lipid-rafts*, pero dependiente de dinamina. Al extender nuestro estudio a otros sistemas celulares (C6/36 HT y A549) encontramos que la endocitosis de DENV-1 y DENV-2 ocurre por un mecanismo clásico dependiente de clatrina. Por lo tanto, estos resultados demuestran por primera vez que un mismo serotipo viral puede utilizar diferentes vías de entrada en líneas celulares de distinto origen, y que a su vez, distintos serotipos virales pueden utilizar vías de entrada alternativas en un mismo tipo celular. Asimismo, observamos que en todos los sistemas celulares analizados, la entrada de DENV ocurre con dependencia de la exposición de los viriones a pH ácido. Esto implica un tránsito de las partículas virales en compartimentos endosomales hasta el momento en que se dispara la fusión entre la membrana viral y la membrana de la vesícula transportadora. Encontramos que los viriones son primeramente transportados hacia endosomas tempranos para luego continuar hasta endosomas tardíos o endosomas de reciclaje dependiendo de características propias de cada cepa viral. Por lo tanto, los hallazgos presentados en este trabajo no sólo aportan conocimientos básicos sobre los pasos iniciales del ciclo de replicación de este importante patógeno humano, sino que además proveen una nueva perspectiva para encarar el desarrollo racional de agentes antivirales para esta enfermedad de creciente reemergencia global.

Palabras clave: virus dengue, entrada, endocitosis, pH ácido, clatrina, caveola/*lipid-raft*, citoesqueleto, transporte vesicular, endosoma, Rab GTPasa

At present, nearly half of the world population is at risk of dengue infection, resulting in the arthropod-borne viral disease of major importance worldwide. Despite the increasing incidence of this virus, there are no vaccines or antiviral chemotherapy available. Since knowledge of the viral multiplication cycle is essential as a starting point for the design of chemotherapeutic agents, this thesis aimed to examine the initial steps of DENV infection: the mechanism of virus entry into the host cell. Our study was centered in the *in vitro* analysis of the cellular factors involved in the internalization, intravesicular transport and penetration of the virus and the influence of the cell type (mammalian or insect), strain and serotype in these processes. Through the combined use of chemical and molecular inhibitors, infectivity assays and electron and fluorescence microscopy techniques we show that the entry of the serotype DENV-1 in Vero cells occurs by clathrin-mediated endocytosis, while entry of DENV-2 takes place by a nonclassical mechanism independent of clathrin, caveolae and lipid-rafts, but dependent on dynamin. By extending our study to other cell systems (C6/36 HT and A549) we found that endocytosis of DENV-1 and DENV-2 occurs by a classical clathrin-dependent mechanism. Therefore, these results demonstrate for the first time that the same serotype may use diverse pathways in cell lines of different origin, and in turn, different serotypes can use alternative entry pathways in the same cell line. We also observed that in all cell systems analyzed by us, the entry of DENV occurs with dependence of exposure of the virions to acidic pH. This implies a transport of viral particles in endosomal compartments until fusion between the viral membrane and the membrane of the carrying vesicle is triggered. We found that virions are first transported to early endosomes and then continue to late endosomes or recycling endosomes depending on characteristics of each viral strain. Therefore, the findings presented here not only provide basic knowledge about the initial steps of the replication cycle of this important human pathogen, but also provide a new perspective to address the rational development of antiviral agents against this re-emerging global disease.

Keywords: dengue virus, entry, endocytosis, acidic pH, clathrin, caveolae/lipid-raft, cytoskeleton, vesicular transport, endosome, Rab GTPase

A mi directora, la Dra. Elsa Damonte, por ofrecerme la maravillosa oportunidad de trabajar en su laboratorio, por estar siempre presente y dispuesta para guiarme en el desarrollo de mi trabajo experimental, por su compromiso en este proyecto, por transmitirme su sabiduría y por sus consejos.

A la Dra. Viviana Castilla, "Vivi", porque con sus conocimientos, su eterna paciencia y su calidez me inició en el campo de la Virología. Por estar siempre presente para escucharme, por sus palabras de apoyo, su compañía y sus consejos en momentos difíciles o de decisiones importantes.

Al Dr. Luis Scolaro, por su disposición para responder mis preguntas y por hacer del laboratorio un lugar de trabajo tan agradable.

A Florencia Linero, "Floré", por su amistad, por su compañía, por compartir tantos momentos en el laboratorio y fuera de él, y por demostrarme siempre su interés en asuntos experimentales y personales.

A Cybele y Claudia por compartir sus experiencias en el laboratorio, por su disposición para compartir protocolos de trabajo y reactivos, por sus palabras de aliento y su constante apoyo.

A los chicos, Pablo y Carlitos, por compartir tantos momentos divertidos durante nuestro doctorado.

A todos los demás integrantes del laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, con los cuales compartí seminarios, almuerzos, horas de trabajo, congresos y jornadas. Gracias por tantos agradables momentos.

A todos los investigadores de instituciones nacionales e internacionales que muy amablemente nos han facilitado aislamientos clínicos de DENV y construcciones plasmídicas para la expresión de proteínas celulares, lo que ha contribuido enormemente a la realización de este trabajo.

A mis compañeras y amigas de la carrera Fio, Sabri y Lu, por tantos momentos y horas de estudio compartidas. Su amistad y apoyo me han permitido alcanzar esta meta.

A mi familia y amigos de toda la vida, por acompañarme y apoyarme incondicionalmente en los buenos y malos momentos.

*A mis padres.
Este es el fruto de sus sacrificios*

"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un sabio en su laboratorio no es solamente un teórico; es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas"

*Marie Curie
1867-1934*

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

- **Acosta EG**, Castilla V, Damonte EB (2009) "Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells" *Cell. Microbiol.* 11: 1533-1549
- **Acosta EG**, Talarico LB, Damonte EB (2008) "Cell entry of dengue virus" *Future Virol.* 3: 471-479.
- **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: 474-484

El presente trabajo se realizó con la financiación proveniente de las siguientes instituciones:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad de Buenos Aires (UBA)
- Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)

Abreviaturas	5
--------------	---

Introducción

1. La enfermedad del dengue: una visión general	8
1. 1. Emergencia y reemergencia del dengue	9
1. 2. Situación en las Américas	9
1. 3. <i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> y dengue en Argentina	10
2. Los agentes etiológicos	13
2. 1. Clasificación	13
2. 2. Estructura del virión	14
2. 3. El ciclo de multiplicación viral	15
2. 4. La glicoproteína de envoltura viral	18
3. Los receptores celulares	20
3. 1. Los receptores celulares en el ADE	20
3. 2. Los receptores celulares en la infección primaria	21
4. La entrada de los virus	23
4. 1. Entrada de los virus envueltos: endocitosis vs. fusión directa	24
4. 2. La endocitosis como vía de entrada a la célula huésped	24
5. Red endosomal y tránsito vesicular	31
5. 1. Logística del sistema endosomal	32
5. 2. Regulación del tráfico vesicular	33
5. 3. Tráfico intracelular de las partículas virales	35
6. La entrada de los flavivirus	35
6. 1. La entrada del virus dengue	36

Objetivos

Objetivos generales y específicos	39
-----------------------------------	----

Materiales y métodos

1. Células	41
2. Virus	41
2. 1. Cepas	41
2. 2. Preparación de las suspensiones virales	42
2. 3. Ensayo de formación de placas de lisis	42
2. 4. Concentración de las suspensiones virales por ultracentrifugación	42
3. Determinación de la viabilidad celular	43
4. Técnicas de microscopía	43
4. 1. Microscopía de fluorescencia: ensayo de inmunofluorescencia indirecta	43
4. 2. Microscopía electrónica de transmisión	44
5. Cinética de entrada viral	44
5. 1. Cinética de internalización viral: ensayo de centros infecciosos	44
5. 2. Cinética de fusión viral: ensayo de susceptibilidad a cloruro de amonio	45
6. Inhibidores químicos: determinación de su efecto sobre la entrada y la multiplicación viral	46
6. 1. Mediante ensayos de inhibición del rendimiento viral	46
6. 2. Mediante ensayos de centros infecciosos	47
6. 3. Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta	47
6. 4. Mediante ensayos de reducción del número de placas	48
7. Determinación de la actividad virucida por contacto directo con inhibidores farmacológicos	48
8. Inhibidores moleculares: determinación de su efecto sobre la entrada y la multiplicación viral	48
8. 1. Construcciones plasmídicas	49
8. 2. Amplificación y purificación de las construcciones plasmídicas	49
8. 3. Transfección de cultivos celulares	50
8. 4. Infección de cultivos celulares transfectados, internalización de partículas virales y análisis de la multiplicación viral	50
9. Evaluación del efecto de inhibidores químicos y moleculares sobre procesos celulares	51
9. 1. Ensayos de internalización de ligandos marcados con fluorocromos	51
9. 2. Tinción de células vivas con naranja de acridina	52
9. 3. Tinción de microtúbulos y microfilamentos	52

Resultados

Capítulo I: La entrada de DENV a células de mamífero	54
I. La entrada de DENV-1 y DENV-2 a células Vero	54
I. 1. Cinética de internalización viral	54
I. 2. Dependencia del pH	55
I. 3. Caracterización de la vía endocítica infectiva utilizada por DENV-1 y DENV-2 para ingresar a células Vero	59
I. 3. a. Endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina	59
I. 3. b. Endocitosis mediada por caveolas/<i>lipid-rafts</i>	63
I. 3. c. Participación de la proteína dinamina	67
I. 3. d. Endocitosis mediada por macropinocitosis/fagocitosis y participación del citoesqueleto	70
I. 3. e. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-1 y DENV-2 a células Vero	74
I. 4. Análisis de la afinidad por heparán sulfato	76
I. 5. Comparación con otras cepas de DENV-1 y DENV-2	77
I. 6. Comparación con la entrada de DENV-1 y DENV-2 a otras células de mamífero	79
Capítulo II: La entrada de DENV a células de insecto	82
II. La entrada de DENV-2 a células de mosquito C6/36 HT	82
II. 1. Cinética de internalización de DENV-2	82
II. 2. Dependencia del pH	83
II. 3. Caracterización de la vía endocítica utilizada por DENV-2 para infectar células C6/36 HT	84
II. 4. Participación del citoesqueleto	89
II. 5. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-2 a células de mosquito	91
II. 6. Extensión del estudio a otro serotipo viral: DENV-1	92
Capítulo III: Tránsito intravesicular de DENV en células Vero	95
III. Transporte intracelular de DENV-1 y DENV-2	95
III. 1. Cinética de fusión de DENV-1 HW, DENV-2 NGC y DENV-2 16681 en células Vero	95

III. 2. Participación de Rab GTPasas en el tráfico intravesicular de DENV	98
III. 2. a. Transporte de DENV desde la membrana plasmática hacia endosomas tempranos: Rol de Rab5	99
III. 2. b. Transporte de DENV desde endosomas tempranos hacia endosomas tardíos: Rol de Rab7 y PI 3-K	102
III. 2. c. Transporte de DENV a través de la vía de reciclaje lenta: Rol de Rab22 y Rab11	105

Discusión

Mecanismos de internalización: DENV puede utilizar más de un modo de ingresar a la célula huésped	110
Variables que influyen sobre el mecanismo de internalización utilizado	117
Tránsito intracelular y escape del genoma al citoplasma celular: destinos diferentes según la cepa viral	119
Consideraciones finales	125

Bibliografía

Bibliografía	127
--------------	------------

ADE: *antibody-dependent enhancement*

ADN: ácido desoxiribonucleico

AP-2/180: *assembly polypeptide 2/180*

ARN: ácido ribonucleico

Asn: Asparragina

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATPasa: adenosín trifosfatasa

BSA: seroalbúmina bovina

C: proteína de cápside viral

cav-1: caveolina-1

DI, II, III: dominio I, II, III

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

DE: desvío estándar

DENV: virus dengue

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

DH: dengue hemorrágico

DN: dominante negativo

DO: densidad óptica

dyn II: dinamina II

E: glicoproteína de envoltura viral

Eps15: *epidermal growth factor receptor pathway substrate 15*

ESCRT: *endosomal sorting complex required for transport*

FcR: receptor de fragmentos Fc

FD: fiebre de dengue

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GAGs: glicosaminoglicanos

GDP: guanosín difosfato

GEEC: *GPI-enriched endosomal compartments*

GFP: *green fluorescent protein*

GPI: glicosilfosfatidilinositol

GRP78/BiP: *glucose-regulated protein 78 KDa/binding immunoglobulin protein*

GTP: guanosín trifosfato

GTPasa: guanosina trifosfatasa

h: hora

HIV-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
HPV-16: virus del papiloma humano tipo 16
Hsc70: *heat-shock cognate protein 70 KDa*
HSP70/90: *heat shock protein 70/90 KDa*
HSV-1: virus herpes simplex 1
HW: Hawaii
JUNV: virus Junín
LB: Luria-Bertani
LCMV: virus de la coriomeningitis linfocitaria
M: proteína de membrana
MEM: medio esencial mínimo
m.i.: multiplicidad de infección
min: minuto
MM: medio de mantenimiento
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
NGC: Nueva Guinea C
NS: proteína no estructural
PBS: buffer fosfato salino
p.i.: post-infección
PI(3)P: fosfatidilinositol 3-fosfato
PI(3,5)P2: fosfatidilinositol 3,5-bifosfato
Rab: *Ras-related protein in brain*
SSD: síndrome de shock por dengue
SV40: *simian virus type 40*
TBEV: virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
TLR: *toll like receptor*
TRITC: rodamina
UFP: unidad formadora de placa
VSV: virus de la estomatitis vesicular
wt: *wild type*

Introducción

1. La enfermedad del dengue: una visión general

Durante el siglo XIX el dengue era considerado una enfermedad esporádica, que causaba brotes epidémicos separados por largos intervalos de tiempo. Sin embargo, han ocurrido dramáticos cambios en ese patrón, y hoy en día el dengue se ha convertido en la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante del mundo.

Los agentes etiológicos son cuatro virus que definen cuatro serotipos virales: dengue 1, 2, 3 y 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), los cuales son transmitidos a los humanos a través de la picadura de los mosquitos del género *Aedes* (*International Committee on Taxonomy of Viruses Database*, 2006). En humanos, la infección con cualquiera de estos virus puede ser asintomática, provocar una enfermedad febril moderada conocida como fiebre de dengue (FD), o evolucionar a formas más severas y potencialmente fatales, tradicionalmente denominadas dengue hemorrágico (DH) y síndrome de shock por dengue (SSD). La infección con un serotipo viral confiere protección inmunológica contra ese serotipo pero no contra los otros. Varios estudios han revelado que la infección secundaria con un serotipo heterólogo es un factor de riesgo para la progresión a DH/SSD (Halstead, 1970; Thein *et al.*, 1997).



Figura 1. Países o zonas de riesgo de dengue 2010. Las zonas de riesgo de infección con dengue están delimitadas por las isotermas de Enero y Julio, definidas como el límite geográfico en el hemisferio Norte y Sur, respectivamente en donde el mosquito *Aedes aegypti* sobrevive durante todo el año. Fuente: Organización Mundial de la Salud http://gamapservr.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png

Con brotes epidémicos de considerable magnitud cada vez más frecuentes, durante los últimos 50 años la incidencia de esta virosis se ha incrementado más de 30 veces. Hoy en día el dengue se encuentra presente en más de 60 países de América, África, Asia y Oceanía (Figura 1). La Organización Mundial de la Salud estima que actualmente 2,5 billones de personas viven en zonas con dengue endémico, produciéndose cada año 50 millones de infecciones, de las cuales medio millón llegan a manifestarse en formas severas (Organización Mundial de la Salud, 2009). A pesar de la creciente incidencia de este patógeno aún no existen vacunas o quimioterapia antiviral disponibles (Damonte *et al.*, 2004).

1. 1. Emergencia y reemergencia del dengue

Los primeros informes de la gravedad de una enfermedad con características compatibles con FD se remontan a los años 1779 y 1780, cuando se produjeron grandes epidemias en diferentes países de Asia, África y América del Norte. Desde entonces y hasta alrededor de 1940, las manifestaciones de la enfermedad eran esporádicas, debido principalmente a que tanto los mosquitos como los virus eran transportados de un punto geográfico a otro a través de barcos (Gubler, 2006).

Con el advenimiento de la Segunda Guerra Mundial, la epidemiología y dinámica de transmisión del virus cambió drásticamente en el sudeste asiático. La irrupción y movimientos de las tropas expandieron la distribución geográfica de virus y vectores, lo que se incrementó aún más luego de la guerra por el rápido crecimiento de la población, la urbanización desmedida y las condiciones sanitarias deficientes (Gubler y Meltzer, 1999). Este conjunto de factores condujo al establecimiento de un estado hiperendémico de infección por dengue, con brotes anuales causados por la cocirculación de los cuatro serotipos virales (Monath, 1994). Fue así que en 1954 emergió en Filipinas una nueva forma de enfermedad, el DH. En las décadas siguientes aumentó la incidencia de DH epidémico, principalmente en Asia y el Pacífico, convirtiéndose en una de las principales causas de hospitalización y muerte en muchos países de la región (Gubler, 2006; Monath, 1994).

1. 2. Situación en las Américas

Durante el siglo XIX los brotes de dengue eran frecuentes en la zona portuaria de varios países de América Central. En el año 1947, la Organización Panamericana de la Salud junto con las autoridades sanitarias de los países de América iniciaron una campaña masiva de erradicación de *Aedes aegypti*. Posiblemente, como resultado de estos esfuerzos, para mediados del siglo XX sólo un serotipo de dengue permanecía en circulación en el continente: el serotipo dengue-2 genotipo americano (Halstead, 2006). Desafortunadamente, debido a la falta de financiamiento se discontinuó el programa de erradicación y en poco más de 10 años el mosquito logró reinfestar la mayoría de los países del Centro y Sudamérica (Monath, 1994). En estas condiciones, en la primavera de 1963 se produjo en Jamaica la importación de DENV-3 genotipo asiático, el que se expandió muy rápidamente hacia Puerto Rico, Venezuela y varias islas del Caribe (Neff *et al.*, 1967). Durante los siguientes 15 años, DENV-2 y DENV-3 continuaron circulando en la región de América Central, provocando grandes brotes epidémicos de FD.

En 1977, durante una gran epidemia ocurrida en Puerto Rico se detectó la introducción de DENV-1 genotipo asiático, y posteriormente en 1981 se produjo la entrada al continente de DENV-4 y DENV-2 genotipo asiático (Halstead, 2006). La introducción de estos nuevos virus, sumado a la actividad epidémica que venían sufriendo los habitantes de la región, condujo a la emergencia de DH tal como había ocurrido en el sudeste asiático. En América el DH se registró por primera vez en Cuba, en 1981 (Kourí *et al.*, 1986), y posteriormente se reportó en muchos otros países. Desde 1981 hasta 2005, 28 países de América han informado casos confirmados de DH, entre ellos Brasil, Colombia, Ecuador, Honduras, México y Venezuela (Gubler, 2006; Torres y Castro, 2007).

1. 3. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y dengue en Argentina

En Argentina, durante la primera mitad del siglo pasado el mosquito *Aedes aegypti* se encontraba presente en las provincias del norte y centro del país. Los primeros reportes de casos de dengue autóctono datan de 1905 y 1911, y en el año 1916 se produjo el primer brote epidémico conocido de dengue que, introducido desde Paraguay, afectó a las provincias de Corrientes y Entre Ríos provocando 15000 casos (Avilés *et al.*, 1999).

Luego de la campaña masiva de erradicación del mosquito, en el año 1965 el Concejo Directivo de la Organización Panamericana de la Salud declaró a *Aedes aegypti* erradicado de Argentina (Vezzani y Carbajo, 2008), y en consecuencia la enfermedad desapareció del país. Sin embargo, en 1986 se detectó nuevamente la reinfestación del mosquito en las provincias de Misiones y Formosa, y unos pocos años más tarde ya estaba presente en Córdoba y Buenos Aires (Vezzani y Carbajo, 2008). A fines de 1997 se registró en la provincia de Salta el primer caso de dengue desde la reintroducción del vector y unos meses después, en enero y mayo de 1998, se produjo un brote epidémico en la región chaco-salteña con varios cientos de casos de FD (Avilés *et al.*, 2000). A partir de muestras de pacientes infectados durante este brote se realizó el primer asilamiento de dengue del país, quedando demostrada la circulación de DENV-2 (Avilés *et al.*, 2000).

Entre los años 1999 y 2000 se produjo un segundo brote de FD en la región nor-noreste, causada esta vez por DENV-1 (Avilés *et al.*, 2003). A partir de entonces, desde el año 2002 al presente comenzaron a sucederse una serie de brotes anuales con casos autóctonos en la región norte del país, a excepción del año 2005 en el que sólo se registraron casos importados. El brote ocurrido en 2003, que afectó a la provincia de Salta, se caracterizó por ser la primera vez en detectarse en nuestro territorio la cocirculación de 3 serotipos: DENV-1, DENV-2 y DENV-3 (Masuh, 2008). En el año 2004, el serotipo DENV-3 produjo un brote de considerable magnitud en Salta y Chaco en el que se registraron 1516 casos (Masuh, 2008). Hacia finales de 2006 y comienzos de 2007, un brote epidémico ocurrido en Paraguay por DENV-3 se extendió hasta nuestro país produciendo más de 200 casos de FD. En febrero de ese año, se reportó el primer caso de dengue autóctono en Buenos Aires, aunque se trató sólo de un caso aislado (Natiello *et al.*, 2008). En los últimos meses de 2008 se produjo una epidemia de dengue por serotipo DENV-1 en varios departamentos de la República de Bolivia y luego en Argentina. Llamativamente, esta epidemia se extendió por nuestro país hasta provincias como Catamarca, con geografía típicamente andina, y hasta la zona metropolitana de Buenos Aires en donde se registraron varios casos autóctonos durante los meses de marzo a mayo de 2009 (Seijo, 2009; Seijo *et al.*, 2009). El hecho más significativo en términos de salud pública fue que por primera vez se produjeron en nuestro país muertes debido al dengue, siendo en algunos casos debidas simplemente a la infección primaria, lo que sugiere que la cepa de DENV-1 circulante durante esta epidemia tendría atributos que la harían particularmente virulenta (Seijo, 2009).

Estudios de mapeo de *Aedes aegypti* realizados en Argentina indican que este mosquito ha ganado territorio en las regiones oeste y sur del país expandiendo su área de ocupación con respecto a su distribución histórica. Según estudios realizados hasta el año 2008, su punto de localización más occidental se encontraría en la provincia de Mendoza (Departamento de Guaymallén) y su límite sur en la provincia de La Pampa (Santa Rosa) (Figura 2) (Vezzani y Carbajo, 2008). En cuanto a *Aedes albopictus*, en Argentina fue detectado por primera vez en 1998 en Misiones (Figura 2). Posteriores inspecciones no han detectado el mosquito en otras zonas del país, aunque en 2003 fue encontrado en Uruguay, sugiriendo que el mismo se está expandiendo hacia zonas más frías de América del Sur (Vezzani y Carbajo, 2008). Si bien se ha demostrado que *Aedes albopictus* es un vector de dengue menos eficiente que *Aedes aegypti* (Lambrechts *et al.*, 2010), el mismo ha sido responsable de varias epidemias de dengue en el pasado, siendo las últimas las ocurridas en China y Hawaii en el año 2001 (Almeida *et al.*, 2005; Effler *et al.*, 2005), por lo que su presencia representa también una amenaza.

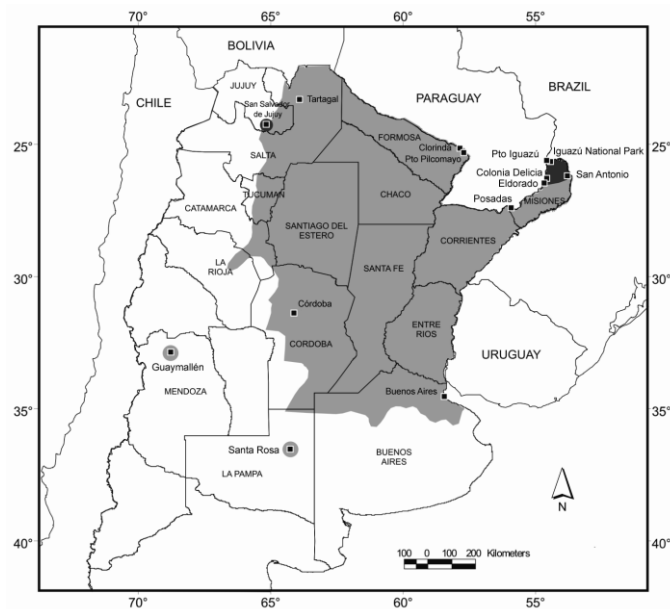


Figura 2. Distribución geográfica de mosquitos vectores del dengue en Argentina. La distribución de *Aedes aegypti* se indica en color gris claro, mientras que las zonas en donde se encuentra presente *Aedes albopictus* se marcan en gris oscuro. Tomado de Vezzani y Carbajo, 2008.

Los últimos datos del Ministerio de Salud indican que desde diciembre de 2009 hasta mayo de 2010 se registraron en el país un total de 1185 enfermos compatibles con dengue. En esta oportunidad se confirmó la circulación de los virus DENV-1, DENV-2, y DENV-4 (Morales

et al., 2010; Parte de Prensa N° 23 del Ministerio de Salud, 2010). 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 DH.

2. Los agentes etiológicos

Al igual que todos los virus, los virus del dengue son agentes pequeños e infecciosos que se caracterizan por su parasitismo intracelular obligado. Necesitan de las funciones metabólicas y genéticas de la célula huésped para replicar y generar su progenie. Presentan una composición genómica simple y una organización estructural que permite su clasificación.

2. 1. Clasificación

Los virus del dengue pertenecen a la familia *Flaviviridae*, una familia constituida por tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. Los miembros de esta familia exhiben propiedades biológicas diversas aunque comparten muchas similitudes en lo que respecta a la morfología del virión, organización genómica y estrategia de replicación del genoma viral (Lindenbach y Rice, 2001). Entre los miembros más representativos de esta familia se encuentran el flavivirus virus de la fiebre amarilla, el pestivirus virus de la diarrea viral bovina, y el hepacivirus hepatitis C.

El género *Flavivirus* está compuesto por casi 80 virus, muchos de los cuales son patógenos humanos transmitidos por artrópodos que causan fiebres hemorrágicas y encefalitis. Los miembros de este género que producen mayor preocupación sanitaria a nivel mundial son: los virus del dengue, que como se mencionó anteriormente provocan FD, DH y SSD (Gubler y Meltzer, 1999; Monath, 1994), el virus de la encefalitis japonesa (Monath, 1988) y el virus de la fiebre amarilla (Tomori, 1999). Otros flavivirus de importancia regional o endémica incluyen al virus del Nilo Occidental, el virus de Kunjin, el virus de la encefalitis de Murray Valley, el virus de la encefalitis de Saint Louis, y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) (Lindenbach y Rice, 2001).

Los flavivirus se categorizan en complejos antigénicos y subcomplejos basándose en criterios serológicos clásicos (Calisher, 1988; Calisher *et al.*, 1989) o en *clusters*, clados y especies de acuerdo a la filogenética molecular (Kuno *et al.*, 1998). Los cuatro serotipos de DENV se ubican dentro del clado IX perteneciente al *cluster* de flavivirus transmitidos por mosquitos. Debido a la alta tasa de mutación de los virus con genoma de ARN, los flavivirus existen como una población cercanamente relacionada de secuencias conocida como cuasiespecies (Steinhauer y Holland, 1987; Wang *et al.*, 2002a; Wang *et al.*, 2002b).

2. 2. Estructura del virión

Los viriones de DENV son partículas pequeñas, esféricas, de 40 a 50 nm de diámetro, compuestos por un núcleo electrodens rodeado de una bicapa lipídica. Tres proteínas virales están asociadas al virión: la proteína de envoltura (E), la proteína de cápside (C) y la proteína de membrana (M), la cual es un fragmento proteolítico derivado de su proteína precursora prM. La superficie de los viriones está conformada por 180 copias de la proteína M y 180 copias de la proteína E, cada una insertada en la envoltura viral a través de dos dominios transmembrana antiparalelos (Zhang *et al.*, 2003). La proteína E se dispone formando homodímeros orientados “cabeza con cola” que yacen paralelos a la envoltura viral, por lo que la superficie de los viriones es lisa y carente de espículas (Figura 3).

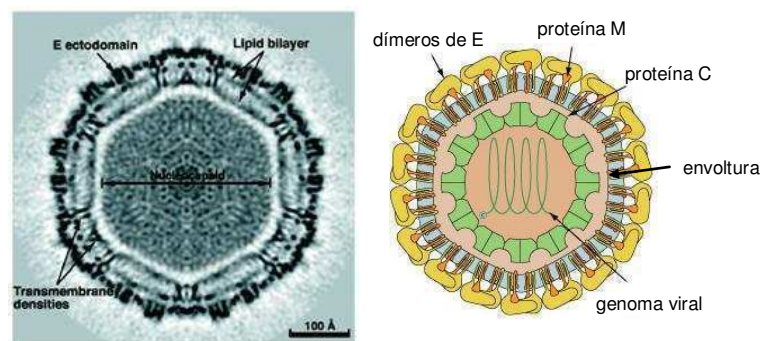


Figura 3. Estructura del virión maduro de dengue. A la izquierda se muestra un corte transversal de una partícula de DENV obtenida por la técnica de crio-electro-microscopía (tomado de Zhang *et al.*, 2003). A la derecha se muestra un esquema de la partícula viral y se señalan los principales componentes del virión.

Por debajo de la envoltura lipídica se encuentra la nucleocápside que consiste en múltiples copias de la proteína C unidas al ARN genómico de polaridad positiva (Figura 3). Los viriones presentan una simetría icosaédrica que estaría impuesta por las interacciones entre las proteínas de superficie más que por la nucleocápside, la que se presenta de manera desordenada y orientada al azar con respecto a la disposición de la envoltura (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003).

2. 3. El ciclo de multiplicación viral

Los primeros pasos del ciclo de multiplicación de DENV aún se encuentran en activa investigación, y como se mencionará más adelante algunos resultados parecen ser contradictorios. Sin embargo, muchos investigadores coinciden en que el ciclo comenzaría con la unión del virus a su receptor celular, seguido de la internalización de las partículas virales hasta un compartimento endocítico en donde ocurriría la fusión de membranas (Figura 4, puntos 1, 2 y 3).

Una vez liberado en el citoplasma celular, el genoma viral da inicio a los procesos de traducción y replicación. El genoma de DENV consiste en una molécula de ARN de simple cadena de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb, que codifica para 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales (NS) en el orden 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (Lindenbach y Rice, 2001). Por fuera del marco de lectura del ARN genómico se encuentran las regiones 5' y 3' no codificantes. Posee en su extremo 5' una estructura de *cap* tipo I ($m^7GpppAmpN_2$) y carece de cola poliadenilada en su extremo 3' (Clyde *et al.*, 2006). Este genoma se utiliza directamente como ARNm, el cual posee un único marco de lectura abierto que es traducido dando una poliproteína.

Tanto la traducción como la replicación del genoma de los virus ARN positivos ocurren asociadas a estructuras membranosas (Miller y Krijnse-Locker, 2008) y en particular en el caso de DENV estos procesos ocurren en estrecha asociación a membranas y vesículas derivadas del retículo endoplasmático (Welsch *et al.*, 2009) (Figura 4, puntos 4 y 5). Durante el proceso de traducción, las secuencias de translocación y de detenimiento de la translocación de la poliproteína determinan su topología en la membrana del retículo (Figura 4 inserto A) (Cauchi *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 2006b). Esta poliproteína es clivada co- y post-traduccionalmente por

proteasas virales y celulares dando las 10 proteínas del virus (Falgout y Markoff, 1995; Lindenbach y Rice, 2001).

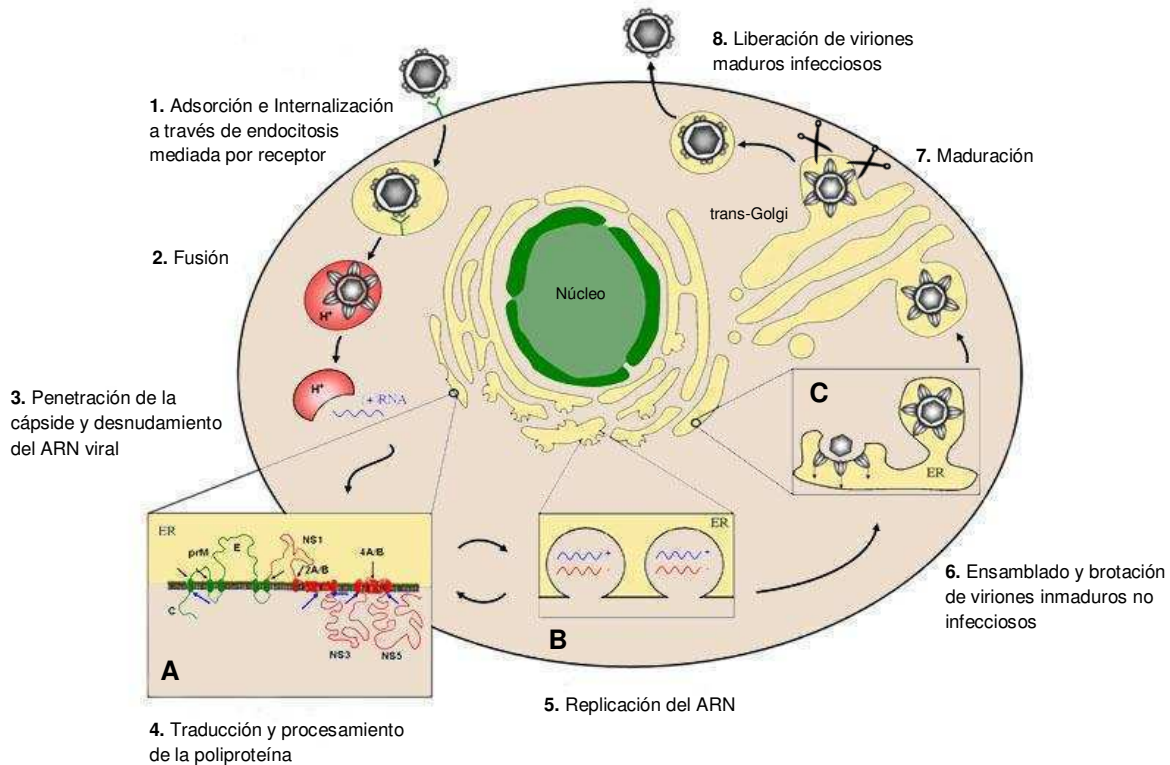


Figura 4. Ciclo de replicación de DENV.

Luego de la traducción y del correcto plegamiento de las proteínas individuales, las proteínas NS dan inicio a la replicación del genoma viral (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010) (Figura 4, paso 5). Se ha observado que la replicación del genoma de DENV depende de su habilidad para circularizarse mediante interacciones entre regiones específicas en sus extremos 5' y 3' no codificantes (Álvarez *et al.*, 2005a; Álvarez *et al.*, 2005b; You *et al.*, 2001). La replicación comienza con la síntesis de una cadena de ARN de polaridad negativa, y ésta a su vez sirve como molde para la síntesis de moléculas de ARN de polaridad positiva que constituyen el genoma viral. La síntesis de ARN es asimétrica ya que se produce un exceso de moléculas de ARN de polaridad positiva sobre las de polaridad negativa (Clyde *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que la replicación del genoma ocurriría en vesículas derivadas de membranas del retículo. Las moléculas de ARN recién sintetizadas saldrían al citoplasma a través de un poro y serían empaquetadas por la proteína

C formando las nucleocápsides virales (Welsch *et al.*, 2009) (Figura 4, inserto B). Muy recientemente se ha demostrado que la proteína C se acumula en organelas citoplasmáticas denominadas *lipid droplets*. Estas organelas podrían servir para secuestrar a la proteína C en los pasos tempranos de la replicación viral, evitando un efecto inhibitorio sobre la replicación del genoma, y a su vez podrían servir de andamio para el ensamblado de las nucleocápsides virales (Samsa *et al.*, 2009). Por su parte, las proteínas prM y E que se encuentran en el retículo endoplasmático formando heterodímeros, se asocian formando trímeros, que se cree inducen una curvatura en la membrana que guiaría la brotación del virión hacia el lumen del retículo (Kuhn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004) (Figura 4, paso 6, inserto C).

Las partículas virales no infectivas formadas en el retículo maduran a lo largo de su viaje por la vía secretoria. El pH moderadamente ácido (5.8-6) del trans-Golgi dispara la disociación de los 60 heterodímeros de prM/E, permitiendo la formación de 90 homodímeros. Esta reorganización estructural de la partícula permite a una furina celular realizar el clivaje proteolítico de prM generando la proteína M y el péptido pr (Yu *et al.*, 2008; Zybert *et al.*, 2008) (Figura 4, paso 7). Un estudio reciente sugiere que el péptido pr permanecería asociado a los viriones hasta el momento de su secreción (Yu *et al.*, 2008). Luego de la disociación de pr, los nuevos viriones maduros están en condiciones de infectar otras células (Figura 4, paso 8).

Las proteínas NS juegan distintos roles a lo largo del ciclo de replicación viral. Las más extensamente caracterizadas son NS3, su cofactor NS2B, NS5 y NS1. La proteína NS3 presenta las funciones de nucleósido trifosfatasa y NTPasa/helicasa, requeridas para la síntesis de ARN genómico (Li *et al.*, 1999), además de poseer actividad de 5' trifosfatasa utilizada en el proceso de adquisición de *cap* (Bartelma y Padmanabhan, 2002). La región N-terminal de esta proteína contiene homología de secuencias con proteasas de serina tipo tripsina, encargada del procesamiento parcial de la poliproteína, para lo que requiere del cofactor NS2B (Valle y Falgout, 1998). La proteína NS5 actúa como una ARN polimerasa dependiente de ARN (Nomaguchi *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 1996), y presenta actividad de metil-transferasa, otra enzima indispensable para la formación del *cap* (Egloff *et al.*, 2002). NS1 es una proteína glicosilada que se expresa en tres formas distintas: una forma anclada a membrana plasmática, una forma secretada, y una residente en retículo que colocaliza con los complejos de replicación (Lindenbach y Rice, 2003). Se ha demostrado que la glicosilación de esta proteína es imprescindible para la replicación viral en células de mosquito (Crabtree *et al.*, 2005). Las proteínas NS4A y NS4B son pequeñas e hidrofóbicas y se encuentran ancladas en la

membrana del retículo. Se ha demostrado que estas proteínas colocalizan con los complejos de replicación viral, por lo que cumplirían un rol en la síntesis de ARN. Por otra parte se demostró que NS4A posee la capacidad de inducir curvaturas y rearrreglos de membrana (Miller *et al.*, 2006a; Miller *et al.*, 2006b).

2. 4. La glicoproteína de envoltura viral

La glicoproteína E es la encargada de mediar la unión con los receptores celulares y de llevar a cabo la fusión de membranas durante el proceso de entrada del virus (Lindenbach y Rice, 2001). Esta proteína posee dos sitios de glicosilación, Asn 67 y Asn 153, los cuales han sido implicados en la unión a receptores celulares (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Pokidysheva *et al.*, 2006; Tassaneetrithep *et al.*, 2003), la fusión viral (Lee *et al.*, 1997) y en la replicación y morfogénesis de DENV (Bryant *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Mondotte *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que esta glicoproteína responde a la reducción del pH con un importante cambio conformacional, lo que permitiría que ocurra la fusión de membranas (Modis *et al.*, 2004). Las estructuras cristalinas del ectodominio de la glicoproteína E de DENV-2 y TBEV han sido determinadas por cristalografía de rayos X en su conformación pre y postfusión (Modis *et al.*, 2003; 2004; Zhang *et al.*, 2004). En su forma prefusión estas proteínas se encuentran formando un dímero, en el que cada monómero tiene tres dominios de barril- β . El dominio central (DI), contiene el extremo amino-terminal de la proteína, y se encuentra flanqueado por un lado por un dominio de dimerización alargado (DII), el cual posee el péptido de fusión en su extremo distal (Figura 5 A). Al otro lado de DI se encuentra el dominio III (DIII), que consiste en un dominio tipo inmunoglobulina que se cree contiene los sitios de interacción con los receptores celulares (Modis *et al.*, 2003; 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2005). En esta conformación el péptido de fusión de un monómero queda oculto entre los dominios DI y DIII del otro monómero que compone el dímero, por lo que a pH neutro el péptido de fusión queda inaccesible para la interacción con membranas (Figura 5 A) (Modis *et al.*, 2003; 2004; Zhang *et al.*, 2004).

Estudios de cristalografía de rayos X de la proteína en su estado postfusión mostraron que la misma presenta un arreglo trimétrico, en el que las glicoproteínas E se posicionan una paralela a la otra exponiendo el péptido de fusión en la punta del trímero (Figura 5 B). A partir

de estas estructuras se ha podido inferir el mecanismo por el cual ocurriría la fusión de membranas durante el proceso de entrada del virus (Figura 5 C). La glicoproteína E se uniría a su receptor en la superficie celular (Figura 5 C punto a) y la partícula viral sería internalizada. Una vez dentro del endosoma, la exposición al pH ácido endosomal produciría la disociación de los dímeros de E, exponiendo el péptido de fusión (Figura 5 C punto b). Los dominios de E se reorientarían gracias a la flexibilidad de las uniones entre DI - DII y DI - DIII (Stiasny y Heinz, 2006) lo que permitiría la formación irreversible de trímeros y la inserción del péptido de fusión en la membrana endosomal (Figura 5 C punto c). Luego, el dominio DIII se plegaría sobre sí mismo, acercando en el proceso la membrana viral hacia el péptido de fusión y la membrana endosomal (Figura 5 C punto d). A medida que DIII se acerca a DII ocurriría la hemifusión de membranas (Figura 5 C punto e) y finalmente la formación del poro de fusión (Figura 5 C punto f) (Modis *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

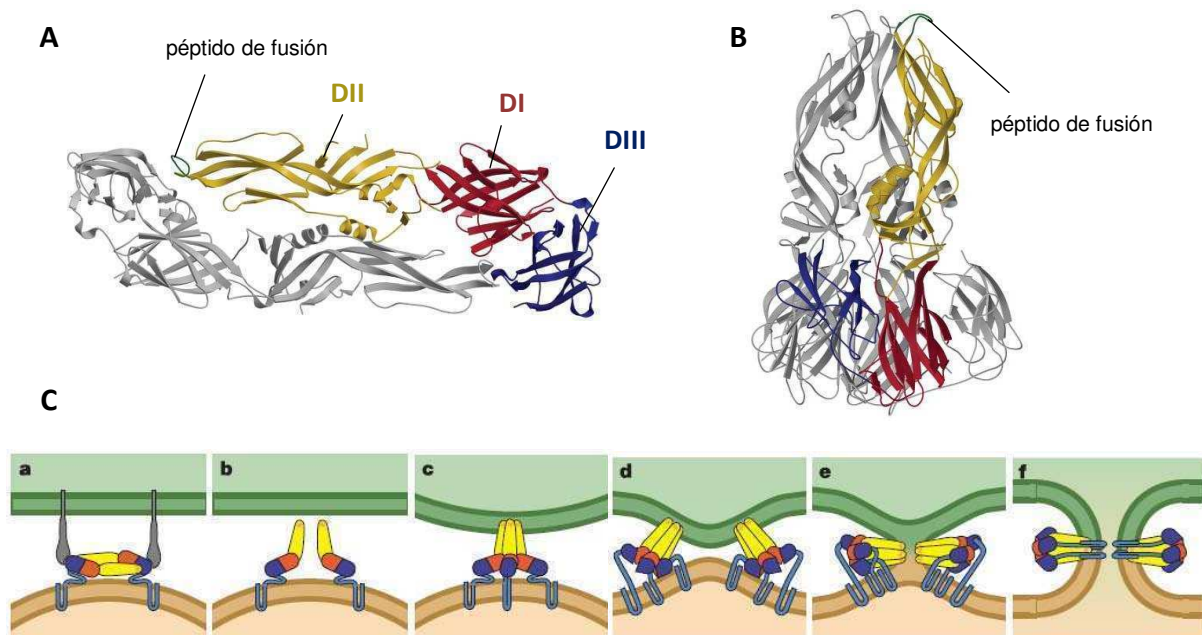


Figura 5. Estructura y proceso de fusión propuesto para la proteína E de DENV. **A.** Ectodominio de la proteína E en su estado dimérico prefusión. En uno de los monómeros se indican los dominios DI, DII y DIII en color rojo, amarillo y azul, respectivamente. El péptido de fusión se indica en color verde. **B.** Ectodominio de la proteína E en su estado trimérico postfusión. **C.** Esquema del mecanismo propuesto para la fusión de membranas mediada por la proteína E. La membrana viral se representa en color marrón y la membrana celular en color verde. **a.** La proteína E se une a su receptor en la superficie celular (representado de color gris) y el virión es internalizado en un endosoma. **b.** El bajo pH del endosoma provoca rearrreglos en los monómeros de E y la exposición del péptido de fusión. **c.** El péptido de fusión se inserta en la membrana endosomal, promoviendo la formación de trímeros de E. **d.** El dominio III rota haciendo que la porción C-terminal de E se pliegue hacia el péptido de fusión, doblando en el proceso a las membranas opuestas. **e.** La formación de contactos adicionales entre el tallo y el dominio II de E provocan la hemifusión de membranas. **f.** Finalmente se genera un poro de fusión lipídico. Los esquemas A y B fueron tomados de Mukhopadhyay *et al.*, 2005, y el esquema C fue tomado de Modis *et al.*, 2004.

3. Los receptores celulares

Los cuatro serotipos de dengue poseen la capacidad de infectar *in vitro* una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo células derivadas de larva de mosquito, células de neuroblastoma de ratón, células de riñón de mono, y líneas celulares humanas diversas como monocitos, macrófagos, células endoteliales, células de carcinoma de cérvix, células de carcinoma de pulmón, hepatocitos y células neuronales (Noisakran *et al.*, 2010). Por otra parte, estudios realizados a partir de muestras de sangre periférica de pacientes infectados, explantos de piel, o en autopsias de enfermos fallecidos han sugerido que *in vivo* el virus podría replicar en monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de bazo, hígado, células endoteliales de pulmón, y plaquetas (Balsitis *et al.*, 2009; Jessie *et al.*, 2004; Noisakran *et al.*, 2009; Wang, *et al.*, 2002c; Wu *et al.*, 2000). Este amplio tropismo sugiere que el virus podría utilizar un receptor ubicuo, o utilizar receptores diversos según el tipo celular a infectar (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

Se han descrito dos mecanismos principales de entrada de DENV a la célula huésped. Uno de ellos, el denominado ADE (por sus siglas en inglés *antibody-dependent enhancement*), involucra la internalización de complejos virus-anticuerpo. El otro mecanismo es el que media la internalización del virus durante la infección primaria, e involucra la unión directa de la glicoproteína E a los receptores de la superficie celular.

3. 1. Los receptores celulares en el ADE

Estudios epidemiológicos han demostrado que la infección secundaria con un serotipo heterólogo aumenta significativamente el riesgo de desarrollar las formas severas de la enfermedad. A partir de estas observaciones se ha propuesto la ampliamente aceptada teoría del ADE (Halstead, 1970; Thein *et al.*, 1997). Esta teoría postula que durante una infección secundaria con un nuevo serotipo de DENV los anticuerpos heterólogos generados por infecciones previas se unirían a las partículas virales en concentraciones subneutralizantes, lo que guiaría la entrada de los complejos virus-anticuerpos a ciertos tipos celulares. Esto ocurriría por medio de la unión de los fragmentos Fc de los anticuerpos a sus receptores (FcR) presentes en la superficie de células dendríticas, macrófagos y monocitos (Halstead y O'Rourke, 1977; Littaua *et al.*, 1990). Si bien aún no se conocen los detalles de este tipo de

entrada, se ha observado que la internalización de los inmunocomplejos no sólo conduce a un aumento en el número de células infectadas, sino también a un aumento en la cantidad de partículas producidas por célula infectada (Chareonsirisuthikul *et al.*, 2007).

3. 2. Los receptores celulares en la infección primaria

Durante los últimos años se han hecho esfuerzos significativos a fin de identificar el/los receptores celulares involucrados en la infección primaria de DENV. Esto ha llevado a la publicación de un gran número de trabajos en los que se postulan una amplia variedad de receptores putativos. En la Tabla I se muestran los distintos tipos de receptores descritos hasta el momento, entre los que se encuentran proteínas, lectinas y glicosaminoglicanos (GAGs).

En células de mosquito se han identificado a las proteínas prohibitina, Hsc70 y una proteína tipo tubulina como receptores de DENV-2, mientras que se ha reportado a una proteína de afinidad por laminina como receptor de DENV-3 y -4 (Chee y AbuBakar, 2004; Kuadkitkan *et al.*, 2010; Paingankar *et al.*, 2010; Sagoonwatanyoo, 2006). Entre las proteínas propuestas como receptores en células de mamífero se encuentran el receptor de alta afinidad por laminina (Thepparit y Smith, 2004), las proteínas de shock térmico HSP90 y HSP70 (del inglés *heat shock protein*) (Reyes-del Valle *et al.*, 2005), GRP78/BiP (Jindadamrongwech *et al.*, 2004), y una serie de polipéptidos parcialmente caracterizados (Tabla I). Asimismo, se ha informado que la unión de los cuatro serotipos de DENV a células dendríticas se produce a través de DC-SIGN. Esta proteína de membrana contiene un dominio extracelular de lectina tipo C que une carbohidratos con alto contenido de manosas, como los presentes en la superficie del virión de DENV (Lozach *et al.*, 2005; Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Tassaneetrithep *et al.*, 2003).

Además de los informes de proteínas como probables receptores para DENV, se ha demostrado la participación del heparán sulfato en la unión de DENV-2 a diversas células de mamífero (Chen *et al.*, 1997; Germi *et al.*, 2002; Hilgard y Stockert, 2000; Hung *et al.*, 1999) (Tabla I). El heparán sulfato es un GAG muy abundantemente presente en los proteoglicanos de la superficie celular y en la matriz extracelular de varios tipos celulares. Está constituido por cadenas de carbohidratos polianiónicos formados por unidades repetitivas de disacáridos,

conteniendo ácido urónico o ácido L-idurónico y un derivado de glucosamina variablemente O-sulfatado (Esko y Selleck, 2002). Se ha observado que la interacción de DENV con GAGs requiere de una forma altamente sulfatada de heparán sulfato (Chen *et al.*, 1997).

Tabla I. Receptores putativos reportados para DENV

Serotipo viral	Tipo celular	Características del receptor	Referencia
Proteínas			
DENV-1	hepatoma humano (HepG2)	proteínas	Marianneau <i>et al.</i> , 1996
	riñón de mono (Vero), hepatoma humano (HepG2)	receptor de laminina	Thepparit y Smith, 2004
DENV-2	larva de mosquito (C6/36)	proteínas (67, 80 kDa)	Muñoz <i>et al.</i> , 1998
	larva de mosquito (C6/36)	proteína tipo tubulina (48 kDa)	Chee y AbuBakar, 2004
	larva de mosquito (C6/36, CCL-125, A7) y <i>A. aegypti</i> adultos	prohíbitora, Hsc70	Kuadkitkan <i>et al.</i> , 2010;
	hepatoma humano (HepG2)	GRP78/BiP	Paingankar <i>et al.</i> , 2010
	endoteliales humanas (ECV304)	proteínas (28, 34 and 43 kDa)	Jindadamrongwech <i>et al.</i> , 2004
	medula ósea humana (K562)	proteína (100 kDa)	Wei <i>et al.</i> , 2003
	neuroblastoma humano y de ratón (SK-N-SH, N1E-115)	proteína (65 kDa)	Rothwell <i>et al.</i> , 1996
	monocitos humanos (U937), neuroblastoma (SK-SY-5Y)	HSP90, HSP70	Ramos Castañeda <i>et al.</i> , 1997
	monocitos humanos	proteína (molécula asociada a CD14)	Reyes-del Valle <i>et al.</i> , 2005
	macrófagos humanos	proteínas (27,45, 67, 87 kDa)	Chen <i>et al.</i> , 1999
DENV-4	larva de mosquito (C6/36)	glicoproteínas (40, 45 kDa)	Moreno-Altamirano <i>et al.</i> , 2002
	riñón de mono (Vero)	proteína (74 kDa, coreceptor de HS)	Salas-Benito y del Angel, 1997; Salas-Benito <i>et al.</i> , 2007
DENV-2, 3	mielomonocitos humanos (HL60), linfocitos B (BM13674)	proteínas (40, 70 kDa)	Martinez-Barragan y del Angel, 2001
	linfocitos B y T (Raji, Molt4, LK63)	proteínas	Bielefeldt-Ohmann, 1998
DENV-1, 4	glándulas salivales de <i>A. polynesiensis</i>	proteínas (48, 50, 54, 56, y 77 kDa)	Bielefeldt-Ohmann <i>et al.</i> , 2001
DENV-3, 4	larva de mosquito (C6/36)	receptor de laminina	Cao-Lormeau, 2009
DENV-1 a 4	macrófagos humanos	receptor de manosa	Sakoonwatanyoo, 2006
	células dendríticas humanas	ICAM3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)	Miller <i>et al.</i> , 2008
	glándulas salivales de <i>A. aegypti</i>	proteínas (37, 54, 58 y 77 kDa)	Navarro-Sanchez <i>et al.</i> , 2003, Tassaneetrithep <i>et al.</i> , 2003
	larva de mosquito (C6/36), intestino medio de <i>A. aegypti</i>	proteínas (67 y 80 kDa)	Cao-Lormeau, 2009
			Mercado-Curiel <i>et al.</i> , 2006, 2008
GAGs			
DENV-2	riñón de mono (Vero), ovario de hámster (CHO)	heparán sulfato	Chen <i>et al.</i> , 1997;
	riñón de hámster (BHK)	heparán sulfato	Germi <i>et al.</i> , 2002
	hepatocitos humanos (HuH-7)	heparán sulfato	Hung <i>et al.</i> , 1999
			Hilgard y Stockert, 2000

GAGs: glicosaminoglicanos

El conjunto de estos datos han llevado a postular la hipótesis que la interacción de DENV con el/los receptores celulares consistiría en un proceso secuencial, en el que la glicoproteína de envoltura viral interactuaría con al menos dos moléculas de la superficie de la célula. Primero, el virus se uniría a un receptor muy abundante y de baja afinidad, como DC-SIGN o heparán sulfato, que serviría para concentrar el virus en la superficie de la célula. Luego, ocurriría una segunda interacción específica y de alta afinidad con un receptor de naturaleza proteica que serviría para guiar la internalización del virus (Martínez-Barragán y del Angel, 2001).

4. La entrada de los virus

Como parásitos intracelulares obligados, todos los virus deben contar con modos de entrar a la célula huésped para iniciar su replicación. El proceso de entrada consiste en una serie de eventos secuenciales coordinados que se inician con la unión del virus a su receptor en la superficie celular y culminan con el desnudamiento del genoma viral en el citoplasma de la célula. Por lo tanto, un paso crítico durante la entrada de cualquier virus es el evento denominado penetración, que consiste en la transferencia del genoma del virus hacia el citoplasma a través de una membrana celular. Como se menciona más adelante, la membrana a ser penetrada puede ser la membrana plasmática o bien una membrana interna derivada de un proceso endocítico.

Mientras que los virus desnudos penetran por medio de la formación de un poro o directamente a través de la ruptura de la membrana, los virus envueltos penetran mediante un fenómeno denominado “fusión de membranas” que sucede gracias a la activación de las proteínas de envoltura viral que exponen su péptido de fusión. En el caso de los virus envueltos, la fusión puede ocurrir directamente con la membrana plasmática o alternativamente, la unión del virus a su receptor puede disparar una endocitosis por lo que la fusión entre la membrana viral y la membrana de la vesícula transportadora se produce internamente.

De cualquier manera, ya sea que se trate de un virus envuelto o un virus desnudo, éstos han evolucionado a fin de aprovechar al máximo la maquinaria celular en beneficio propio. Por lo tanto para entrar a la célula, un virus utiliza un repertorio de procesos celulares complejos en el que están involucradas cientos de proteínas. A continuación se hace una descripción de los

conocimientos actuales sobre biología celular de la entrada de virus, focalizando la atención en las diferentes estrategias endocíticas.

4. 1. Entrada de los virus envueltos: endocitosis vs. fusión directa

Se ha sabido por mucho tiempo que ciertos virus poseen proteínas de fusión que se activan al unirse a sus receptores y co-receptores en la membrana plasmática, permitiéndole a los virus que las portan penetrar directamente en la superficie de la célula (Rosenthal *et al.*, 1989; Stein *et al.*, 1987). Sin embargo, si se observa todo el espectro de virus encontramos que la mayoría requiere ser endocitado para penetrar a la célula y generar una infección productiva. Esto no resulta sorprendente si consideramos los muchos beneficios que la endocitosis ofrece como vía de entrada, desde la evasión del sistema de vigilancia inmunológica, hasta la conducción de las partículas virales en vesículas transportadoras hasta un sitio óptimo de replicación. Además, la mayoría de los virus que utilizan la endocitosis como vía de internalización poseen proteínas de envoltura que se activan exponiendo su péptido de fusión sólo cuando se enfrentan al pH ácido del endosoma, lo que les permite sensar el entorno y escapar al citoplasma en lugares específicos (Marsh y Helenius, 2006; Sieczkarski y Whittaker, 2002a). De hecho, la endocitosis ofrece tantas ventajas que se ha observado que algunos de los virus que pueden penetrar por fusión directa, como herpes simplex 1 (HSV-1) y el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), utilizan la endocitosis como vía de entrada en ciertos sistemas celulares (Akhtar y Shukla, 2009; Uchil y Mothes, 2009).

4. 2. La endocitosis como vía de entrada a la célula huésped

La endocitosis es un proceso que abarca diversos mecanismos utilizados por las células para internalizar moléculas procedentes del exterior dentro de vesículas derivadas de la membrana plasmática. Por lo tanto, cualquier proceso endocítico requerirá en primer lugar un mecanismo de selección en la superficie celular, luego la membrana plasmática debe ser inducida a doblarse y separarse, y finalmente se requerirán mecanismos que anclen la vesícula recién formada a su siguiente destino e induzcan la fusión con esta nueva membrana blanco.

En las células se han identificado una gran variedad de mecanismos endocíticos, los cuales difieren entre sí en las moléculas que transportan, en la maquinaria proteica que facilita

el proceso y en el tamaño de la vesícula que se forma. Dada su complejidad y su fina regulación, son muchos los factores celulares involucrados en cada uno de estos procesos y al momento sólo se conoce una parte de ellos (Mercer *et al.*, 2010).

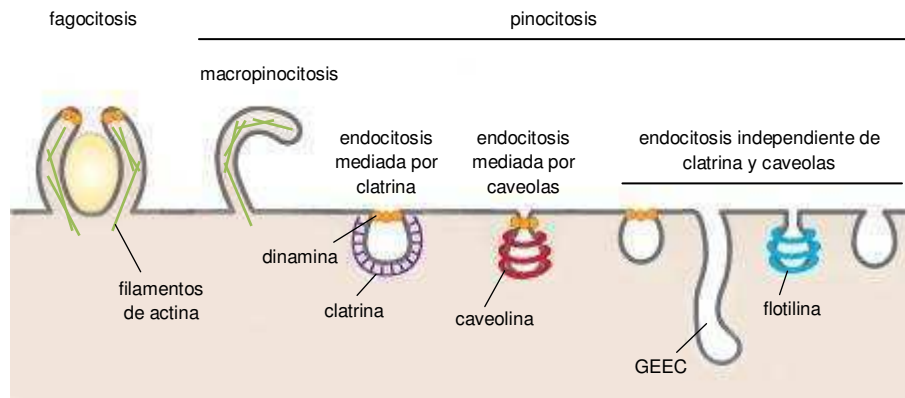


Figura 6. Mecanismos endocíticos. GEEC: GPI-enriched endosomal compartments.

En la figura 6 se esquematizan las distintas rutas endocíticas descritas hasta el presente. De manera global los mecanismos endocíticos se dividen en dos grandes categorías: fagocitosis y pinocitosis. La fagocitosis es el proceso por el cual la célula incorpora partículas de gran tamaño, una capacidad que en general se encuentra restringida a células especializadas. Por otra parte la pinocitosis, definida como la internalización de fluidos y solutos, ocurre en todos los sistemas celulares. La fagocitosis, junto con tres vías pinocíticas: macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina y endocitosis mediada por caveolas, son considerados mecanismos endocíticos “clásicos” ya que se encuentran muy bien caracterizados. Sin embargo, existen además una serie de mecanismos pinocíticos “no clásicos” los cuales han emergido recientemente. Estos nuevos mecanismos se encuentran pobremente descritos en la literatura y tradicionalmente se los ha definido en términos negativos, agrupándolos bajo la denominación “independientes de clatrina y caveolas”.

A continuación se hace una breve descripción de los mecanismos endocíticos esquematizados en la figura 6, haciendo referencia a los virus que toman ventaja de cada uno de ellos como vía de internalización a la célula:

- **Fagocitosis:** La fagocitosis consiste en la ingestión de partículas de más de $0,5 \mu\text{m}$ de diámetro (Ghigo, 2010). En células eucariotas es un proceso activo, altamente regulado, que involucra receptores específicos de la membrana celular y cascadas

de señalización mediadas por GTPasas de la familia Rho. Estas GTPasas disparan el reordenamiento y ensamblado de fibras de actina induciendo la formación de proyecciones de la membrana plasmática que envuelven y se ajustan a la molécula a ser fagocitada. Finalmente estas proyecciones de membrana se cierran incorporando la molécula dentro de un fagosoma en un proceso que involucra a la GTPasa dinamina. Como se mencionó anteriormente, se considera que la fagocitosis es un mecanismo endocítico restringido a células eucariotas especializadas como monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, que se encargan de la eliminación de remanentes de células muertas del organismo o patógenos tales como bacterias o levaduras. Sin embargo, se ha demostrado que HSV-1 así como el baculovirus de *Autographa californica* pueden inducir su internalización en células no fagocíticas por un mecanismo que tiene todas las características de la fagocitosis (Clement *et al.*, 2006; Laakkonen *et al.*, 2009).

- **Macropinocitosis:** La macropinocitosis es un proceso utilizado por las células para incorporar grandes volúmenes de fluido y solutos. Al igual que la fagocitosis, la macropinocitosis se caracteriza por la formación de proyecciones de membrana generadas por dramáticos rearrreglos del citoesqueleto de actina dirigidos por GTPasas de la familia Rho. Sin embargo, a diferencia de la fagocitosis, estas proyecciones no adquieren la forma de la partícula que endocitan, sino que colapsan sobre la membrana plasmática y se cierran para dar vesículas de tamaño y forma diversos. Con un diámetro de hasta 10 μm , estas vesículas se caracterizan por ser más grandes que cualquier otra derivada de los demás procesos pinocíticos (Kerr y Teasdale, 2009). Entre los virus que utilizan la macropinocitosis como vía de entrada a la célula se encuentran el virus Nipah en células CHO (Pernet *et al.*, 2009), herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi en células endoteliales humanas (Raghu *et al.*, 2009), adenovirus 3 y vaccinia en células HeLa (Amstutz *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008; Mercer y Helenius, 2008), HIV-1 en macrófagos humanos (Maréchal *et al.*, 2001), y muy recientemente el virus Ebola en células Vero y HEK293 (Saeed *et al.*, 2010). Se ha propuesto que en el caso de vaccinia y herpes estos virus han evolucionado a fin de utilizar la macropinocitosis como vía de entrada dado su gran tamaño. En cambio, para otros virus, la razón parece ser simplemente la de aumentar su rango de huésped o de tejido a infectar (Ghigo, 2010; Mercer *et al.*, 2010).

- **Endocitosis mediada por clatrina:** la endocitosis mediada por clatrina es un proceso rápido y eficiente que ocurre de manera continua, constitutiva o inducida, en todas las células de mamífero. El primer paso consiste en la concentración y agrupamiento de receptores transmembrana en invaginaciones recubiertas de la membrana plasmática de aproximadamente 100-110 nm de diámetro. Esta cubierta se ensambla en la cara citoplasmática de la membrana gracias a la participación de numerosas proteínas adaptadoras y accesorias, como AP-2 (*assembly polypeptide 2*), AP-180, Epsina, amfifisina y Eps15 (*epidermal growth factor receptor pathway substrate 15*) entre otras, que promueven el reclutamiento de la proteína clatrina hacia la zona de la membrana plasmática (Benmerah y Lamaze, 2007; Conner y Schmid, 2003). Una vez reclutada, la clatrina se polimeriza formando un enrejado curvo que junto con la ayuda de varias proteínas accesorias permite la formación de un cuello en el que se ensamblan polímeros helicoidales de dinamina, proteína que media el proceso de fisión de la vesícula encapsulada (Praefcke y McMahon, 2004). Posteriormente la clatrina es liberada de la vesícula por medio de la acción de las proteínas Auxilina y Hsc70 lo que permite la reutilización de esta proteína (Doherty y McMahon, 2009).

De todos los mecanismos endocíticos descritos hasta el momento, la endocitosis mediada por clatrina es la más ampliamente utilizada por los virus. Estudios pioneros de microscopía electrónica revelaron que ciertos virus, como adenovirus 2 y 5 y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) se encontraban presentes en regiones engrosadas de la membrana plasmática o en vesículas electrodensas (Dahlberg, 1974; Dales, 1973). Posteriormente, estas membranas electrodensas fueron identificadas como zonas de membrana plasmática o vesículas recubiertas de clatrina. Algunos de los numerosos virus que utilizan la vía de clatrina para ingresar a células de mamífero son: los alfavirus Semliki Forest y Sindbis (Helenius *et al.*, 1980; Matlin *et al.*, 1982; DeTulleo y Kirchhausen, 1998), el reovirus virus de la lengua azul (Forzan *et al.*, 2007); y el retrovirus virus de la leucosis aviar (Diaz-Griffero *et al.*, 2005). Incluso se ha demostrado la utilización de la vía de clatrina para la infección de células de insecto, como por ejemplo el densovirus *Junonia coenia* en células derivadas de larvas de *Lymantria dispar* (Vendeville *et al.*, 2009), el virus del arroz enano en células de su insecto vector *Nephotettix cincticeps*

(Wei *et al.*, 2007) y el baculovirus de *Autographa californica* en células de *Spodoptera frugiperda* (Long *et al.*, 2006).

- **Endocitosis mediada por caveolas:** Las caveolas son pequeñas invaginaciones de aproximadamente 60-80 nm de diámetro que se distinguieron por primera vez mediante observaciones por microscopía electrónica en células endoteliales. Estas estructuras están conformadas principalmente por la proteína caveolina concentrada en regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol, esfingolípidos (como esfingomiélin, ceramida y gangliósidos), glicosfingolípidos y ácidos grasos saturados; una composición de membrana que se asemeja a la descrita para los “*lipid-rafts*” (Stan, 2005). En células de mamífero se han identificado tres tipos de caveolina. La proteína caveolina-3 parece ser exclusiva de tejido muscular, mientras que las caveolinas-1 y -2 se encuentran ampliamente distribuidas, siendo las neuronas y los leucocitos los únicos tipos celulares que aparentemente carecerían de caveolinas (Doherty y McMahon, 2009). *In vitro*, la endocitosis mediada por caveolas ha demostrado ser dependiente de la activación de cascadas de señalización mediadas por quinasas de tirosina, Rho GTPasas y dinamina (Henley *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 1998; Pelkmans *et al.*, 2002; Pietiäinen *et al.*, 2004).

Los casos mejor estudiados de virus que utilizan las caveolas como vía de entrada son los del virus SV40 (*simian virus type 40*), polyomavirus murino y los patógenos humanos virus BK y virus JC, todos pertenecientes a la familia *Polyomaviridae* (Anderson *et al.*, 1996; Eash *et al.*, 2004; Pelkmans *et al.*, 2001). También se ha sugerido la participación de las caveolas en la internalización del picornavirus echovirus 1 (Pietiäinen *et al.*, 2004), el retrovirus virus de la leucemia murina (Beer *et al.*, 2005) y el hepadnavirus hepatitis B (Macovei *et al.*, 2010).

- **Endocitosis independiente de clatrina y caveolas:** Además de los bien establecidos mecanismos endocíticos descritos anteriormente, un creciente cuerpo de evidencia experimental indica que existen mecanismos endocíticos adicionales. Estos mecanismos tienen en común la falta de cubiertas detectables por microscopía electrónica y la falta de dependencia de las proteínas clatrina y caveolina. Sin embargo, claras diferencias estructurales y funcionales sugieren que esta definición cruda abarca a más de un tipo de mecanismo endocítico. Basándose en la evidencia experimental varios autores han subdividido estos mecanismos de

manera operacional, según su requerimiento de colesterol, y ciertas proteínas celulares como quinasas, pequeñas proteínas G o dinamina.

Clasificación de los mecanismos no clásicos

Hoy es aceptado que los lípidos, así como la interacción lípido-proteína juegan un rol crucial en la compartimentalización funcional de la membrana plasmática en microdominios. El término *lipid-raft* ha sido utilizado para definir microdominios de membrana altamente ordenados derivados de la interacción entre esteroides y esfingolípidos (Parton y Richards, 2003). Estas regiones de la membrana tienen un tamaño de 40-50 nm de diámetro, son resistentes a la extracción con detergentes no iónicos y se encuentran enriquecidas en proteínas con ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI). (Nichols y Lippincott-Schwartz, 2001). La primera evidencia de la utilización de *lipid-rafts* para la internalización productiva de partículas virales surgió a partir de los estudios de entrada del virus SV40 en células carentes de caveolinas. Se ha demostrado que esta ruta endocítica mediada por *lipid-rafts* posee todas las características morfológicas y funcionales de las caveolas, pero ocurre independientemente de las proteínas caveolina y dinamina. Ambos mecanismos (caveolina-dependiente e independiente) responden de la misma manera ante agentes que inhiben quinasas de tirosina, agentes despolimerizantes del citoesqueleto de actina y drogas que extraen el colesterol de la membrana plasmática (Damm *et al.*, 2005). Estos resultados indicarían que el mecanismo subyacente a ambas vías de internalización es fundamentalmente similar. De hecho, Kirkham y Parton (2005) han planteado la hipótesis de que la endocitosis mediada por *lipid-rafts* se trataría de un mecanismo de internalización básico en el que la asociación de las proteínas caveolina y dinamina aporta un grado extra de complejidad y regulación. Otros virus para los que posteriormente se ha propuesto una internalización dependiente de *lipid-rafts* e independiente de dinamina es HIV-1 en células JAR y 293T (Vidricaire y Tremblay, 2007) y el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) en células Vero (Quirin *et al.*, 2008; Rojek *et al.*, 2008)

Como se mencionó anteriormente, esta ruta de internalización independiente de clatrina y caveolas inicialmente descrita para SV40 parece no ser única, ya que existe evidencia de vías de internalización en que se combina de manera diferente la participación de *lipid-rafts* y dinamina. Por ejemplo, se ha demostrado para

rotavirus (cepa RRV), así como para el virus murino norovirus-1 la utilización de una vía de internalización independiente de clatrina y caveolas pero dependiente de dinamina y *lipid-rafts* en células endoteliales y macrófagos, respectivamente (Gerondopoulos *et al.*, 2010; Sánchez-San Martín *et al.*, 2004). Por otra parte, el virus coxsackie A9 es internalizado en células A549 por una vía independiente de clatrina, caveolas y *lipid-rafts* pero dependiente de dinamina (Heikkilä *et al.*, 2010), al igual que el virus de la peritonitis infecciosa felina en células monocíticas (Van Hamme *et al.*, 2008). Aún más enigmático, reportes recientes sugieren que el virus del papiloma humano tipo 16 (HPV-16) y el virus porcino circovirus-2 pueden ser internalizados por una vía independiente de clatrina, caveolas, dinamina y *lipid-rafts* (Misinzio *et al.*, 2009; Spoden *et al.*, 2008).

Aunque en muchos de los casos mencionados anteriormente la caracterización de la vía endocítica es incompleta, algunos de estos mecanismos no clásicos utilizados por los virus aún no han sido descritos en el campo de la biología celular y por lo tanto no se conocen ligandos fisiológicos que hagan uso de ellos. En contraparte, existen mecanismos endocíticos descritos por los biólogos celulares para los cuales todavía no se ha identificado virus que los utilicen. Estos incluyen el mecanismo llamado GEEC (*GPI-enriched endosomal compartments*), una vía de internalización independiente de dinamina pero dependiente de *lipid-rafts* en el que ciertas proteínas con ancla de GPI son internalizadas en estructuras tubulares (Sabharanjak *et al.*, 2002) y la vía dependiente de flotilina/*reggie-2* (Figura 6), una proteína con una topología muy similar a la de las caveolinas. Se ha propuesto que esta proteína define una nueva vía endocítica para proteínas con anclas de GPI (Glebov *et al.*, 2006), aunque la real contribución de este mecanismo como vía de internalización aún es motivo de fuerte debate (Langhorst *et al.*, 2008).

Actualmente muchos autores sostienen que el criterio de clasificación de las vías no clásicas basado en la dependencia de *lipid-rafts* no es muy sólido, ya que puede variar según el método utilizado para realizar la remoción del colesterol de la membrana plasmática. Esta remoción debe hacerse con mucho cuidado para evitar una alteración general de múltiples funciones celulares, lo que no siempre es tenido en cuenta. Recientemente Mayor y Pagano (2007), propusieron una nueva clasificación para los mecanismos independientes de clatrina y caveolas que permitiría independizarse de los *lipid-rafts*. Basándose en el infaltable requerimiento

de una maquinaria que permita la fisión de la vesícula naciente, en esta nueva clasificación la división primaria de los mecanismos no clásicos viene dada por el requerimiento de la proteína dinamina. Por un lado se encuentran los mecanismos que utilizan esta maquinaria para escindir sus vesículas de la membrana plasmática (dinamina-dependientes) y por otro aquéllos que utilizan otro tipo de maquinaria de fisión (dinamina-independientes). En segundo lugar, otra característica que ha sido tomada es el requerimiento de pequeñas GTPasas que parecen ser específicas de ciertos mecanismos pero no de otros, entre ellas CDC42, RhoA y ARF6. Lamentablemente, algunos autores sostienen que la puesta en práctica de esta clasificación se ve obstaculizada por reportes con resultados contradictorios que sugieren que la participación de estas GTPasas en tan sólo un tipo de endocitosis no sería específica, o que los resultados estarían sujetos al método utilizado para inhibir la acción de estas enzimas (Hansen y Nichols, 2009). Además, aún no está claro si dichas GTPasas son esenciales para que ocurra el proceso de internalización en sí o para el transporte posterior de la vesícula primaria ya formada.

5. Red endosomal y tránsito vesicular

Una vez formadas, las vesículas endocíticas primarias pasan a formar parte de una intrincada red endosomal responsable del transporte, reciclaje, degradación, y almacenamiento de las moléculas incorporadas en su interior.

Esta red dinámica está conformada por distintas organelas endocíticas que pueden fusionarse unas con otras de manera homotípica o heterotípica, y sufrir modificaciones moleculares a lo largo del tiempo. Las principales organelas de este sistema membranoso son: endosomas tempranos, endosomas tardíos (también denominados cuerpos multivesiculares), lisosomas y endosomas de reciclaje (Figura 7). En general los endosomas tempranos se encuentran dispersos por todo el citoplasma celular, mientras que los endosomas tardíos, lisosomas y endosomas de reciclaje se ubican en la zona perinuclear.

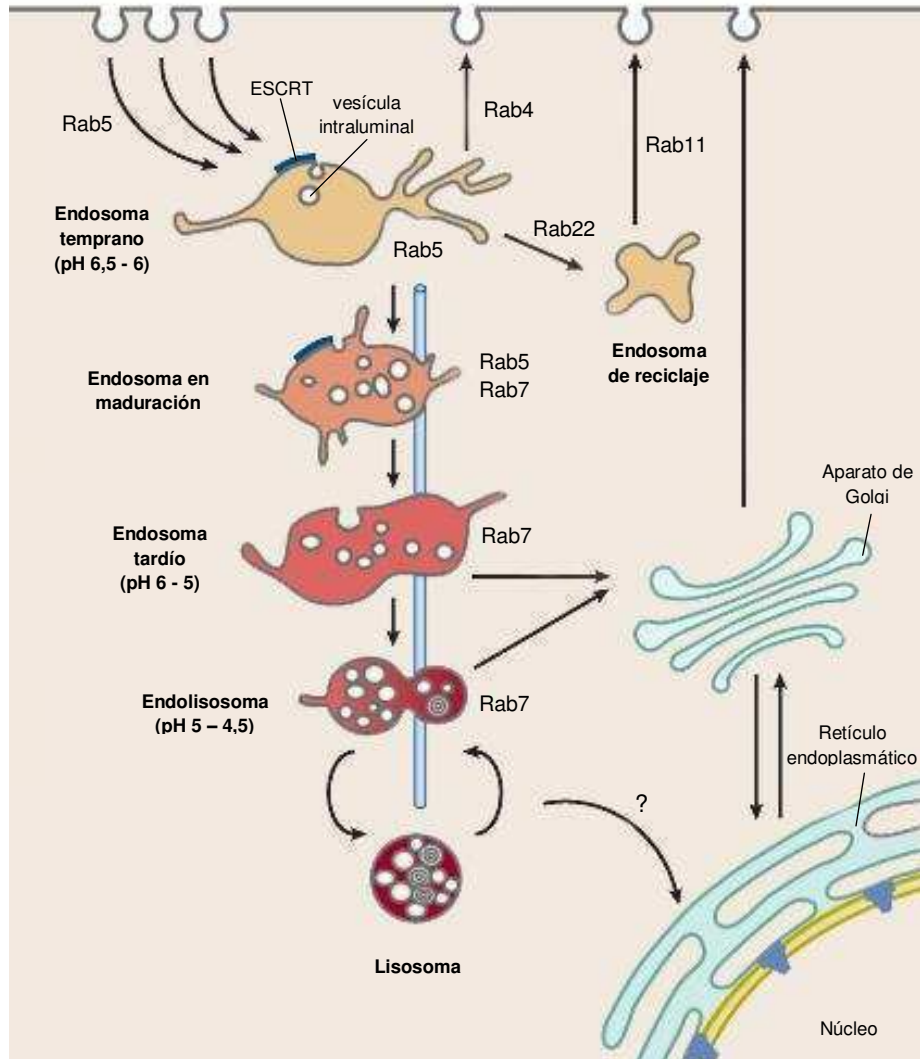


Figura 7. Red endosomal y tránsito vesicular. ESCRT: endosomal sorting complex required for transport. Rab: Ras-related protein in brain.

5. 1. Logística del sistema endosomal

Los endosomas tempranos son definidos como el primer compartimento endocítico en recibir las moléculas provenientes desde la membrana plasmática. Su principal función es la de clasificar y separar las moléculas internalizadas hacia alguno de los siguientes destinos: endosomas tardíos, endosomas de reciclaje o de vuelta hacia la membrana plasmática. Esta organela aparece como un compartimento pleomórfico complejo y elaborado en la mayoría de los tipos celulares. Está compuesta por regiones de finas extensiones tubulares (de 60-90 nm de diámetro) y grandes cuerpos vacuolares (de 200-1000 nm de diámetro) (Gruenberg, 2001)

(Figura 7). Los receptores y moléculas destinados para reciclaje se concentran en los elementos tubulares desde donde pueden ser transportados directamente hacia la membrana plasmática en una “vía de reciclaje rápida”, o bien a endosomas de reciclaje en una ruta denominada “vía de reciclaje lenta”. Por otra parte, las proteínas de membrana destinadas a degradación y que han sido monoubiquitinadas en el lado citosólico son incorporadas con ayuda del complejo ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) dentro de vesículas que brotan desde la membrana del cuerpo vacuolar hacia el lumen del endosoma (Jovic *et al.*, 2010) (Figura 7).

El proceso de conversión del endosoma temprano hacia un endosoma tardío es particularmente complejo e involucra la formación de un endosoma intermedio o en maduración que posee proteínas marcadoras de endosomas tempranos y tardíos simultáneamente (Figura 7). Este endosoma, compuesto por el cuerpo vacuolar del endosoma temprano y las vesículas intraluminales, sufre una caída gradual en el pH interno, desde un valor de acidez moderado (pH 6,5-6) hacia valores más ácidos (cerca de 5), debido principalmente a la acumulación de ATPasas vacuolares (Lafourcade *et al.*, 2008). Durante este proceso de maduración ocurre un incremento en el número de vesículas intraluminales, lo que finalmente le otorga su apariencia multivesicular al endosoma tardío (Piper y Katzmann, 2007). También ocurre un cambio en la predominancia de fosfoinosítidos, de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P), el cual es muy abundante en los endosomas tempranos, a fosfatidilinositol 3,5-bifosfato (PI(3,5)P₂) (Gillooly *et al.*, 2000).

Finalmente, cambios en la interacción con componentes del citoesqueleto conllevan a la migración del endosoma hacia la zona perinuclear. Allí los endosomas tardíos maduros se fusionan con los lisosomas generando endolisosomas, en donde ocurre la degradación proteolítica de todos los elementos que se encuentran dentro del lumen del endosoma, incluidas las vesículas intraluminales (Bright *et al.*, 2005; Luzio *et al.*, 2009) (Figura 7).

5. 2. Regulación del tráfico vesicular

Un grupo de moléculas cuyo rol ha demostrado ser crítico en la regulación del transporte de vesículas son las proteínas Rab (*Ras-related proteins in brain*). Las Rab pertenecen a la familia de pequeñas GTPasas, y como tales ciclan entre un modo activo unido a GTP y un modo inactivo unido a GDP. En su modo activo se localizan en membranas

intracelulares desde donde reclutan e interactúan con una gran variedad de proteínas efectoras que les permiten cumplir roles múltiples en los eventos de transporte, tales como anclaje de vesículas, fusión, escisión y movilidad (Grosshans *et al.*, 2006).

En células de mamífero se han identificado más de 60 proteínas Rab involucradas en la regulación del tránsito endosomal (Jordens *et al.*, 2005; Martinez y Goud, 1998). Las principales Rab localizadas en endosomas tempranos son Rab5 y Rab4, que cumplen con funciones específicas diferentes, aunque también se encuentran otras Rab, como Rab10 (Babbey *et al.*, 2006), Rab14 (Proikas-Cezanne *et al.*, 2006), Rab21 (Simpson *et al.*, 2004) y Rab22 (Kauppi *et al.*, 2002) cuya función ha sido menos caracterizada y recién comienza a entenderse.

Rab5 es el miembro de la familia Rab más ampliamente estudiado. Regula la formación y el tráfico de las vesículas endocíticas primarias provenientes de la membrana plasmática hacia los endosomas tempranos (Bucci *et al.*, 1992) (Figura 7), la generación de PI(3)P (Christoforidis *et al.*, 1999), la fusión entre vesículas primarias y endosomas tempranos (Gorvel *et al.*, 1991), y cumple un rol en la movilidad de los mismos sobre componentes del citoesqueleto (Nielsen *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente, una vez en los endosomas tempranos las moléculas destinadas a reciclaje pueden seguir la “vía de reciclaje rápida” o la “vía de reciclaje lenta”. Rab4 participa en la vía rápida, regulando la salida directa desde las zonas tubulares del endosoma temprano hacia la membrana plasmática (Sheff *et al.*, 1999) (Figura 7). Reportes recientes demuestran que Rab22 sería la molécula encargada de regular el tráfico desde el endosoma temprano hacia los endosomas de reciclaje en la vía de reciclaje lenta (Magadan *et al.*, 2006), mientras que Rab11, el cual es muy abundante en los endosomas de reciclaje, regula el último paso de transporte desde los endosomas perinucleares hacia la membrana plasmática (Ullrich *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2005) (Figura 7).

El pasaje secuencial de endosomas tempranos a endosomas tardíos requiere de la acción coordinada de Rab5 y Rab7, en un proceso en el cual la pérdida gradual de Rab5 está acompañada con la concomitante adquisición de Rab7 (Rink *et al.*, 2005). Además de regular el pasaje de endosomas tempranos a tardíos (Feng *et al.*, 1995; Press *et al.*, 1998), Rab7 se localiza principalmente en los endosomas tardíos y lisosomas en donde se cree que cumple un rol fundamental promoviendo la fusión entre los mismos (Vanlandingham y Ceresa, 2009).

5. 3. Tráfico intracelular de las partículas virales

Una vez internalizados dentro de vesículas endocíticas primarias, la ruta intracelular tomada por los virus es la misma que aquella utilizada por ligandos fisiológicos y componentes de la membrana plasmática tales como factores de crecimiento, hormonas y lípidos. Los virus han evolucionado para hacer uso de esta red endosomal de manera tal de escapar de las organelas endocíticas antes de ser degradados por las enzimas lisosomales.

Algunos virus envueltos pueden escapar a nivel de los endosomas tempranos, como por ejemplo VSV o Semliki Forest, en donde el pH moderadamente ácido induce la exposición de su péptido de fusión y la consecuente penetración de la nucleocápside al citoplasma celular (Johannsdottir *et al.*, 2009; Marsh *et al.*, 1983). Otros virus, como influenza o Uukuniemi, tienen un umbral de pH de fusión más alto, lo que significa que deben ser expuestos a los niveles de pH encontrados en endosomas tardíos/endolisosmas para que se dispare la penetración viral (Lozach *et al.*, 2010; Sieczkarski y Whittaker, 2003).

Mientras que para algunos virus la simple exposición a pH ácido es suficiente para disparar el cambio conformacional de sus proteínas de envoltura, se ha observado para otros virus, como Ebola y el virus del síndrome respiratorio agudo, que se requiere además de la actividad de proteasas lisosomales como catepsina B o catepsina L encontradas en los endosomas tardíos/endolisosomas (Chandran *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006).

6. La entrada de los flavivirus

Los primeros trabajos dedicados al estudio de la entrada de virus pertenecientes a la familia *Flaviviridae* revelaron mediante la utilización de la técnica de microscopía electrónica que dos miembros de la familia, el virus de la fiebre amarilla y el virus Kunjin, eran incorporados en células Vero dentro de vesículas endocíticas (Ishak *et al.*, 1988; Ng y Lau, 1988). Estos estudios no sólo demostraron que las partículas viales eran internalizadas por medio de un mecanismo endocítico, sino que además la cubierta electrodensa de las mismas aportó el primer indicio de que podrían tratarse de vesículas recubiertas de clatrina.

Sin embargo, no fue sino hasta muchos años después que el uso de inhibidores farmacológicos específicos permitió demostrar el requerimiento funcional de la vía de clatrina para la internalización de otro flavivirus, el virus de la encefalitis japonesa, en la línea celular

Vero (Nawa *et al.*, 2003). Más recientemente, el uso de inhibidores químicos combinado con inhibidores moleculares más específicos demostraron de manera concluyente que la entrada de los virus del Nilo occidental, hepatitis C y el virus de la diarrea viral bovina era también dependiente de la vía de clatrina en líneas celulares tan diversas como Vero, C6/36 HT, MDBK una línea celular derivada de riñón bovino, y en varias líneas de hepatocitos humanos (Blanchard *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2006; Chu y Ng, 2004; Codran *et al.*, 2006; Grummer *et al.*, 2004; Lecot *et al.*, 2005; Meertens *et al.*, 2006).

Los estudios de entrada del virus del Nilo Occidental revelaron además que el virus seguiría una ruta intracelular a través de endosomas tempranos y tardíos en células Vero y C6/36 HT (Chu *et al.*, 2006; Chu y Ng, 2004).

6. 1. La entrada del virus dengue

A pesar de la concordancia en la dependencia de la vía de clatrina para la internalización productiva de varios miembros de la familia *Flaviviridae*, la evidencia experimental es menos clara en lo que respecta a la entrada del virus dengue.

Estudios pioneros de microscopía electrónica sugirieron que las partículas de DENV-2 (cepa NGC) penetrarían por fusión directa con la membrana plasmática en células de mosquito C6/36 HT, monocitos humanos de sangre periférica y células de hámster BHK (Hase *et al.*, 1989; Lim y Ng, 1999). Sin embargo, al mismo tiempo otros trabajos demostraron la formación de sincicios inducida por la exposición a pH ácido en cultivos de células de mosquito infectados con DENV-2 (Randolph y Stollar, 1990; Summers *et al.*, 1989), y la inhibición de la multiplicación viral por la adición de compuestos lisosomotrópicos (Guirakhoo *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997). Estos últimos resultados son indicativos del requerimiento de una entrada por una vía endocítica, y coinciden con los estudios estructurales de la glicoproteína de envoltura de DENV mencionados anteriormente.

En lo que respecta al modo de internalización que podrían seguir las partículas virales, algunos reportes recientes sugieren una fuerte dependencia en la presencia del colesterol de la membrana plasmática para la internalización de DENV-2 en monocitos humanos y células de neuroblastoma de ratón, sugiriendo una participación de *lipid-rafts* (Lee *et al.*, 2008; Reyes-Del Valle *et al.*, 2005). Sin embargo, por otra parte Krishnan *et al.* (2007), demostraron que la entrada de DENV-2 (NGC) en células HeLa ocurría por medio de un mecanismo dependiente

de clatrina. Este último trabajo reveló además que la infección con DENV-2 es inhibida en células que expresan una versión dominante negativa del Rab5 pero no de Rab7, lo que indicaría que DENV-2 NGC no requeriría ser transportado hasta los endosomas tardíos para penetrar en este sistema celular.

Por lo tanto, ante estos antecedentes de estudios preliminares y contradictorios, el presente trabajo de tesis se propuso estudiar la vía de entrada infectiva utilizada por los virus DENV-1 y DENV-2 en células de mosquito y mamífero, analizando los factores celulares que participan en el proceso de internalización y transporte de las partículas virales, así como también los factores virales que podrían influir sobre dichos procesos.

Objetivos

Dado el marco teórico y experimental planteado sobre el estado del conocimiento actual de los pasos iniciales del ciclo de multiplicación de DENV el objetivo general de este trabajo de tesis se centraliza en el estudio del mecanismo de entrada de este patógeno a la célula huésped.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Identificar la vía endocítica utilizada por DENV para su entrada infectiva en células Vero, analizando la influencia del serotipo o cepa viral sobre dicho proceso. Esta línea celular es habitualmente utilizada para la propagación y titulación del virus y como modelo para el estudio de la multiplicación viral y la evaluación de compuestos antivirales.
- Extender el estudio a líneas celulares humanas y de mosquito, más representativas de la infección natural.
- Establecer en el modelo de células Vero la ruta intracelular recorrida por las partículas virales e identificar la organela en la que el fenómeno de fusión viral tiene lugar.

Materiales y métodos

1. Células

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

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

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 suero fetal bovino inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Para el MM la concentración de suero se redujo a 2 %.

Para todas las líneas celulares, cuando los cultivos se incubaron en estufa con 4 % de CO₂, los medios se suplementaron con HEPES 20 µM (Sigma-Aldrich) y se llevaron a pH 7,2 con bicarbonato de sodio 7,5 %.

2. Virus

2. 1. Cepas

Se utilizaron tres cepas de DENV-1: la cepa de referencia Hawaii (HW) (Goncalvez *et al.*, 2002) fue provista por la Dra. D. Enría (INEVH, Pergamino, Argentina) y los aislamientos clínicos ARG9920 y ARG0044 (Barrero y Mistchenko, 2004), fueron provistos por la Dra. A. Mistchenko (Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina). Se emplearon cuatro cepas de DENV-2: la cepa de referencia Nueva Guinea C (NGC) (Gruenberg *et al.*, 1988) fue provista por la Dra. A. Mistchenko, la cepa de referencia 16681 (Kinney *et al.*, 1997) fue provista por la Dra. A. Gamarnik (Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina) y los aislamientos clínicos 67655 y 67702 se obtuvieron del INEVH. Se utilizó además el virus Junín (JUNV) cepa XJ Clon3.

2. 2. Preparación de las suspensiones virales

Las suspensiones de DENV se prepararon en células C6/36 HT, crecidas en botellas de plástico T25, utilizando una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 UFP/célula. El inóculo viral se dejó adsorber 1 h a 33 °C, luego se retiró y se cubrieron las células con MM. Los sobrenadantes se cosecharon al tercero, cuarto y quinto día post-infección (p.i.), se alicuotaron y almacenaron a -70 °C hasta su uso. Los títulos de los stocks virales oscilaron entre 10^5 y 10^7 UFP/ml según el día de cosecha p.i.

2. 3. Ensayo de formación de placas de lisis

Para la cuantificación de los stocks virales se infectaron monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, con 100 μ l de diluciones seriadas al décimo de las suspensiones virales en MM. Cada dilución se ensayó por duplicado. Luego de 1 h de incubación a 37 °C se retiraron los inóculos y se cubrieron las monocapas celulares con medio de plaqueo. El medio de plaqueo consistió en MEM doblemente concentrado suplementado con 4 % de suero fetal bovino y 100 μ g/ml de gentamicina, mezclado con igual volumen de metilcelulosa 2 % (Sigma-Aldrich). Luego de 6 ó 7 días de incubación a 37 °C, según el serotipo viral, los cultivos se fijaron con formol 10 % y se tiñeron con cristal violeta 1 %. Para DENV-1 la fijación de los cultivos se realizó al 7^{mo} día p.i., mientras que en el caso de DENV-2 la fijación se llevo a cabo el 6^{to} día p.i.

2. 4. Concentración de las suspensiones virales por ultracentrifugación

Para la obtención de stocks de alto título viral se procedió a concentrar suspensiones de DENV-1 (HW) ó DENV-2 (NGC). Para ello, se infectaron monocapas de células C6/36 HT, crecidas en botellas de plástico T150, a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 h de adsorción a 33 °C, se descartó el inóculo viral y se adicionó MM. Los sobrenadantes se cosecharon al tercero y quinto día p.i. y se juntaron para conformar una única muestra. A continuación se procedió a clarificar el sobrenadante mediante una centrifugación a 3000 x g durante 15 min. a 4 °C. El sobrenadante clarificado fue luego concentrado por ultracentrifugación (rotor Beckman SW28), a 90000 x g durante 2 h a 4 °C. El sedimento se resuspendió por suave sonicación, con el agregado de 100 μ l de buffer TES (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM).

3. Determinación de la viabilidad celular

El efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) (Sigma-Aldrich) (Denizot y Lang, 1986). Este compuesto es clivado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa para dar un compuesto de color azul (cristales de formazán), siendo la cantidad de cristales producidos proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Monocapas confluentes de células Vero, C6/36 HT ó A549, crecidas en microplacas de 96 cavidades, se trataron con 200 μ l 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 μ l de MM conteniendo MTT 0,5 mg/ml. Los cultivos se incubaron 2 h a 33°C o 37 °C, dependiendo del tipo celular, luego se descartaron los sobrenadantes y se disolvieron los cristales de formazán en 200 μ l de etanol. La densidad óptica (DO) de cada cavidad se determinó a una longitud de onda de 595 nm utilizando un lector de microplacas. Se calculó el porcentaje de células viables 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.

4. Técnicas de microscopía

4. 1. Microscopía de fluorescencia: ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Monocapas celulares, crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades, fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 y luego de transcurrido el tiempo de infección requerido para cada ensayo 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 de 5 min cada uno en agitación con PBS y se incubaron las monocapas con anticuerpos primarios. Se utilizó una dilución 1:300 de un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la proteína de envoltura de los cuatro serotipos virales (Abcam) o una dilución 1:2 de sobrenadante de hibridoma (clon 6F3) productor de un anticuerpo monoclonal reactivo contra la proteína de cápside de DENV-2 y DENV-4 (Bulich y Aaskov, 1992; Sabgiambut *et al.*, 2008), gentilmente cedido por John Aaskov (Universidad de Queensland, Australia). Los anticuerpos primarios se incubaron

durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda y luego se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con PBS. Los complejos antígeno-anticuerpo se revelaron por medio de una segunda incubación durante 30 min a 37 °C con un suero policlonal desarrollado en cabra reactivo contra las inmunoglobulinas de ratón y conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) o rodamina (TRITC) (Sigma-Aldrich). Se realizaron a continuación tres lavados de 5 min cada uno con PBS y un lavado con agua bidestilada. 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 fotomicrografías 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) o un microscopio confocal Olympus Fluoview y se analizaron con el software Image-Pro Plus.

4. 2. Microscopía electrónica de transmisión

Se infectaron monocapas de células Vero o C6/36 HT, crecidas en microplacas de 6 cavidades, con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 60 UFP/célula. Luego de 1 h de incubación a 4 °C se transfirieron los cultivos a 33 °C o 37 °C durante 25 min. A continuación se lavaron las células tres veces con PBS frío y se fijaron con buffer fosfato conteniendo 1,5 % de glutaraldehído (Fluka) durante 5 h a 4 °C. Las células fijadas se lavaron con solución de sacarosa 0,32 M en buffer fosfato 0,1 M durante toda la noche a 4 °C y luego se desprendieron de la microplaca con una espátula. Luego de una centrifugación a baja velocidad las células se incubaron con tetróxido de osmio 1,5 % durante 2 h a 4 °C y luego se lavaron por centrifugación con agua destilada. A continuación se incubaron con acetato de uranilo 2 % durante toda la noche y se deshidrataron con una serie de gradientes de etanol seguido de óxido de propileno. Las células se embebieron en una mezcla de Resina Epon 812 (TAAB) y se polimerizaron durante 2 días a 70 °C. Se obtuvieron secciones ultrafinas con un cuchillo de diamante que se tiñeron nuevamente con acetato de uranilo 2 % y se observaron en un microscopio electrónico C10 Zeiss. Las micrografías electrónicas se obtuvieron utilizando una película Kodak 4489.

5. Cinética de entrada viral

5. 1. Cinética de internalización viral: ensayo de centros infecciosos

Se infectaron monocapas de células Vero o C6/36 HT, crecidas en microplacas de 24 cavidades, con DENV-1 (HW) o DENV-2 (NGC) 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 PMSF 2 mM 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, se resuspendieron las células en MM, se realizaron diluciones seriadas al décimo y se sembraron sobre nuevas monocapas de células Vero. Luego de 2 h de adsorción a 37 °C se cubrieron las monocapas celulares con medio de plaqueo y se incubaron en estufa durante 6 o 7 días, dependiendo del serotipo viral. Transcurrido este tiempo, se fijaron los cultivos con formol y se revelaron las placas por tinción con cristal violeta. En este ensayo cada placa formada corresponde a una célula o centro infeccioso en el que una partícula viral logró ser internalizada de manera 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, fueron infectadas a 4 °C con 100-150 UFP/cavidad de DENV-1 (HW), DENV-2 (NGC o 16681) o JUNV, por duplicado. 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. Las células se incubaron en presencia del cloruro de amonio a 37 °C durante 3 h y luego se trataron las monocapas durante 1 min con

buffer citrato (ácido cítrico 40 mM, KCl 10 mM, NaCl 135 mM, pH 3) a fin de inactivar cualquier partícula viral que hubiera quedado en el medio extracelular. Luego de realizar tres lavados con PBS se cubrieron las monocapas celulares con medio de plaqueo. Al cabo de 6 o 7 días p.i. se fijaron las células con formol, se tiñeron con cristal violeta y se realizó el recuento de placas. 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. Inhibidores químicos: determinación de su efecto sobre la entrada y la multiplicación viral

6. 1. Mediante ensayos de inhibición del rendimiento viral

Monocapas de células Vero, C6/36 HT o A549, crecidas en microplacas de 24 cavidades, se trataron con concentraciones crecientes de varios inhibidores específicos de diferentes vías endocíticas. Los tiempos de tratamiento y rango de concentraciones adecuados para cada inhibidor se ajustaron según los datos de viabilidad celular a fin de evitar efectos tóxicos. De acuerdo a estos datos, las condiciones de tratamiento para cada inhibidor fueron las siguientes: para nistatina (6,3 – 100 μ M en medio de cultivo sin suero) las células fueron pretratadas durante 5 h a 33 °C o 37 °C; para clorpromazina (10 – 50 μ M), colchicina (12,5 – 200 μ M), nocodazol (2,5 – 30 μ M) y citochalasina D (2,5 – 40 μ M) las células fueron pretratadas durante 2 h a 33 °C o 37 °C; para cloruro de amonio (10 – 50 mM), concanamicina A (0,62 – 10 nM), metil- β -ciclodextrina (0,62 – 5 mM en medio de cultivo sin suero) y dinasore (20 – 150 μ M) las células fueron pretratadas durante 1 h a 33 °C o 37 °C; para dansilcadaverina (100 – 500 μ M), latrunculina A (0,62 – 8 μ M) y jasplakinolide (0,15 – 1 μ M) el pretratamiento fue de 30 min a 33 °C o 37 °C. Luego de la incubación con los compuestos las células fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula en presencia de las drogas, a excepción de nistatina y metil- β -ciclodextrina, las cuales fueron eliminadas de los cultivos previamente 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 33 °C o 37 °C, se lavaron las monocapas celulares 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 formación de placas de lisis en células Vero. 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. Todos los inhibidores farmacológicos se adquirieron en Sigma-Aldrich.

6. 2. Mediante ensayos de centros infecciosos

Monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, fueron pretratadas con los inhibidores farmacológicos en las mismas condiciones que en los ensayos de inhibición del rendimiento viral, y luego fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 1 UFP/célula en presencia o ausencia de las drogas. Luego de 1 h de adsorción a 37 °C se retiraron los inóculos virales, se realizaron 3 lavados con PBS, se trataron las monocapas celulares con proteinasa K 0,1 mg/ml y se procesaron como en el punto 5. 1. Los resultados se expresaron como el porcentaje de partículas virales internalizadas en los cultivos tratados con respecto a un cultivo control sin tratar con las drogas.

6. 3. Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta

Monocapas de células Vero o C6/36 HT, crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades, fueron pretratadas con las máximas concentraciones de las drogas evaluadas en los ensayos de inhibición del rendimiento viral y durante los mismos tiempos de tratamiento. Luego fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 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 se cubrieron las células con MM (cultivos tratados “durante” la entrada). En paralelo se infectó otra serie de cultivos y se trataron con las drogas luego de retirar los inóculos virales. En este caso la droga se mantuvo durante el mismo tiempo que se prolongó el tratamiento de los cultivos pretratados (cultivos tratados “después” de la entrada). Al cabo de 24 h de incubación a 37 °C se fijaron las células con metanol y se procesaron para revelar la proteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta. Las muestras se visualizaron con una amplificación de 400 aumentos.

A fin de determinar el efecto de inhibidores químicos sobre la internalización de partículas virales, células Vero crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades, fueron pretratadas con las máximas concentraciones de las drogas, y luego fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 10 UFP/célula en presencia o ausencia de las drogas.

Luego de 10, 30 o 60 min de incubación a 37 °C, según los requerimientos del ensayo, los cultivos fueron fijados con metanol. Las partículas virales internalizadas se revelaron utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína de envoltura o cápside viral, seguido de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas a fluorocromos. Las muestras se visualizaron con una amplificación de 1000 aumentos.

6. 4. Mediante ensayos de reducción del número de placas

Se infectaron monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, con aproximadamente 100-150 UFP/cavidad de DENV-1 o DENV-2 en presencia de distintas concentraciones de heparina, por duplicado. Luego de 1 h de incubación a 37 °C, se descartaron los inóculos y las células se cubrieron con medio de plaqueo. Luego de 6 días las células se fijaron con formol y se tiñeron con cristal violeta. Se realizó el recuento de placas y se determinó el porcentaje de inhibición de la multiplicación viral con respecto a un control sin tratar con el compuesto.

7. Determinación de la actividad virucida por contacto directo con inhibidores farmacológicos

Suspensiones de DENV-1 (HW) o DENV-2 (NGC) conteniendo 10^6 UFP/ml se incubaron con volúmenes iguales de medio de cultivo en presencia de distintas concentraciones de nistatina, metil- β -ciclodextrina o amiloride durante 1 h en baño térmico a 37 °C. Como control se incubó en las mismas condiciones una suspensión viral con igual volumen de medio sin droga. Luego se realizaron diluciones seriadas al décimo de las distintas mezclas y se cuantificó la infectividad viral remanente por el método de formación de placas en células Vero. Para cada concentración de droga se calculó el porcentaje de infectividad remanente con respecto al control sin droga. En el caso de nistatina y metil- β -ciclodextrina el ensayo se realizó en medio de cultivo sin suero.

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: las construcciones de Eps15, EH29 (mutante dominante negativa) y DIIIΔ2 (control) fueron cedidas por la Dra. C. Shayo (IBYME, Argentina); las construcciones de caveolina-1, *cav-1 wild type* (wt) (control), *cav-1-DN* (mutante dominante negativa) y *cav-1-Y14F* (mutante dominante negativa) fueron provistas por el Dr. J. M. Bergelson (Universidad de Pensilvania, EEUU); las construcciones de dinamina II, *dyn II wt* (control) y *dyn II K44A* (mutante dominante negativa) fueron cedidas por el Dr. M. A. McNiven (Clínica Mayo, EEUU); las construcciones de Rab5 y Rab7, *Rab5 wt* (control), *Rab5 S34N* (mutante dominante negativa), *Rab7 wt* (control) y *Rab7 N125I* (mutante dominante negativa) fueron provistas por la Dra. M. I. Colombo (Universidad Nacional de Cuyo, Argentina); las construcciones de Rab11, *Rab11 wt* y *Rab11 S35N* (mutante dominante negativa) fueron provistas por el Dr. G. Whittaker (Universidad de Cornell, EEUU); y las construcciones de Rab22h, *Rab22 wt* y *Rab22 Q64L* (mutante) fueron cedidas por el Dr. P. Stahl (Universidad de Washington, EEUU). A excepción de Rab11, 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*). Las secuencias de Rab11 se encuentran clonadas dentro del plásmido pGreen Lantern (Invitrogen), por lo que en este caso se expresan fusionadas a *green lantern*, una GFP modificada. Como control se utilizó el plásmido pEGFP-C1, el cual expresa la proteína GFP.

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 agregaron 1-2 μ l de las construcciones plasmídicas 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 fueron incubadas 2 h a 37 °C con agitación, luego de lo cual se sembraron en LB-agar conteniendo ampicilina (100 μ g/ml) o kanamicina (50 μ g/ml) según corresponda. 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 fluorómetro Qubit (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante.

8. 3. Transfección de cultivos celulares

Se crecieron monocapas de células Vero o C6/36 HT sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades. Luego de 24 h las células se transfectaron utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor. Se diluyeron 4 µg de cada construcción en 50 µl de Opti-MEM (Gibco) y se combinaron con 2,5 µl de lipofectamina diluidos en 50 µl de Opti-MEM. Luego de 40 min de incubación a temperatura ambiente se sembraron los complejos ADN-liposomas sobre los cultivos celulares y se incubaron por aproximadamente 6 hs 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, internalización de partículas virales y análisis de la multiplicación viral

A fin de visualizar las partículas virales internalizadas cultivos de células Vero o C6/36 HT transfectados durante 24 h fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 10 UFP/célula. Luego de 1 h de incubación a 37 °C o 33 °C se realizaron tres lavados con PBS y se fijaron las células con metanol durante 10 min a -20 °C.

Para determinar el efecto de la expresión de proteínas dominantes negativas sobre la multiplicación viral, cultivos de células Vero transfectados durante 24 h, fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 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.

Tanto para la visualización de las partículas virales internalizadas como para revelar el antígeno viral producido, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón reactivo contra la proteína de envoltura del virus, seguido de un antisuero de cabra conjugado a TRITC reactivo contra las inmunoglobulinas de ratón. Las muestras se visualizaron bajo un microscopio Olympus BX51 con una amplificación de 400 o 1000 aumentos. La visualización de las partículas virales en células C6/36 HT se realizó en un microscopio confocal Olympus Fluoview con una amplificación de 600 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 GFP. Los resultados se expresaron como el promedio de tres determinaciones \pm desvío estándar.

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

9. 1. 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, C6/36 HT o A549, crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades, se trataron o no (control) con los inhibidores clorpromazina (50 μ M), dansilcadaverina (200 μ M o 500 μ M) o dinasore (150 μ M) o se transfectaron con las construcciones de Eps15 o Rab5. Luego del pretratamiento con las drogas o de 24 h de transfección, se incubaron los cultivos con transferrina humana conjugada a TRITC 15 μ g/ml (Molecular Probes) durante 1 h a 37 °C. A continuación se lavaron los cultivos 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 μ M o 200 μ M) o metil- β -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 μ g/ml (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37 °C. Finalmente los cultivos fueron lavados con PBS y fijados con metanol como se describió anteriormente. Las muestras se montaron sobre

una gota de glicerina tamponada conteniendo 2,5 % DABCO y se visualizaron bajo un microscopio Olympus BX51 con una amplificación de 1000 aumentos.

9. 2. Tinción de células vivas con naranja de acridina

Para corroborar el efecto de los compuestos cloruro de amonio y concanamicina A sobre el pH de las vesículas ácidas intracelulares se realizaron tinciones de las células con el colorante naranja de acridina.

Monocapas de células Vero, C6/36 HT o A549 crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades 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 µg/ml en MM sin suero) durante 15 min a 37 °C en presencia de los compuestos. Paralelamente, se trabajó con monocapas 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. 3. Tinción de microtúbulos y microfilamentos

Monocapas de células Vero o C6/36 HT, crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 cavidades, fueron tratadas 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 fueron lavados con PBS y fijados 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 se permeabilizaron las células por tratamiento con PBS conteniendo 0.2 % de tritón X-100 (células Vero) o conteniendo 2 % de tritón X-100 (células C6/36 HT).

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 mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal de ratón reactivo contra α -tubulina (Sigma-Aldrich), seguido de una incubación con un antisuero de cabra conjugado a TRITC reactivo contra inmunoglobulinas de ratón.

Resultados

Capítulo I: La entrada de DENV a células de mamífero

Capítulo II: La entrada de DENV a células de insecto

Capítulo III: Tránsito intravesicular de DENV

CAPITULO I: La entrada de DENV a células de mamífero

I. La entrada de DENV-1 y DENV-2 a células Vero

I. 1. Cinética de internalización viral

En primer lugar, a fin de establecer los tiempos óptimos de trabajo para evaluar el efecto de inhibidores químicos sobre la entrada de DENV-1 (cepa HW) o DENV-2 (cepa NGC) en cultivos de células Vero, se estudió la cinética de internalización viral. Cultivos de células Vero fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 a 4 °C para permitir la adsorción del virus a la célula y luego fueron transferidos a 37 °C para dar inicio a la internalización de las partículas de manera sincronizada. A diferentes tiempos luego del cambio de temperatura una serie de cultivos fue tratada con proteinasa K, a fin de inactivar el virus adsorbido mientras que las partículas internalizadas permanecieron protegidas en el interior de la célula. Luego de inactivar la enzima, suspensiones de estas células fueron sembradas sobre nuevas monocapas de células Vero para cuantificar las partículas virales infectivas internalizadas por un ensayo de formación de placas. Otra serie de cultivos fue tratada a cada tiempo con PBS en vez de proteinasa K y luego se cuantificó el virus asociado total (adsorbido + internalizado) por medio de un ensayo de centros infecciosos similar al de los cultivos tratados con proteinasa K. El porcentaje de partículas infectivas internalizadas a cada tiempo luego del cambio de temperatura se calculó como la relación entre el número de UFP en los cultivos tratados con proteinasa K (partículas internalizadas) y el número de UFP en el cultivo tratado con PBS (partículas asociadas totales). El tratamiento enzimático con proteinasa K eliminó más del 93 % de las partículas virales adsorbidas antes de dar inicio a la internalización viral (tiempo 0) (Figura 8 A). Ambos serotipos virales presentaron perfiles cinéticos similares, incrementándose muy rápidamente el número de partículas infectivas internalizadas con el tiempo de incubación a 37 °C, alcanzando valores de porcentaje de internalización del 88-94 % para DENV-2 y del 90 % para DENV-1 luego de 60-90 min de iniciada la entrada del virus (Figura 8 A).

Dado que el estrés sufrido por las células al ser incubadas a 4 °C, sumado al estrés generado por el tratamiento con inhibidores químicos (ver secciones siguientes) traía consecuencias importantes sobre la viabilidad celular, se decidió analizar si el hecho de eliminar el paso de incubación en frío tenía un efecto muy marcado sobre la cinética o la tasa de internalización viral. Por lo tanto, cultivos de células Vero fueron infectados con DENV-2 y luego fueron incubados directamente a 37 °C. A diferentes tiempos se adicionó proteinasa K y se cuantificó el número de partículas infectivas internalizadas por centros infecciosos como se

describió anteriormente. En la figura 8 B se representan las curvas obtenidas en condiciones de sincronización de la internalización viral (con incubación a 4 °C) y en condiciones de no sincronización (sin incubar a 4 °C). Se detectó una pequeña diferencia en la cantidad de virus infectivo incorporado durante los primeros 30 min. de internalización, como una posible consecuencia del menor número inicial de partículas virales adsorbidas en los cultivos en los que no se realizó la incubación a 4 °C (Figura 8 B, línea discontinua). Sin embargo, esta diferencia se equiparó a partir de los 30 min. de internalización (Figura 8 B). Por lo tanto, para los ensayos subsiguientes se evaluó el efecto de inhibidores químicos sobre la internalización de partículas virales durante la primera hora de infección, periodo de tiempo en el que aproximadamente un 90 % del virus es internalizado, y realizando la infección directamente a 37 °C en ausencia de sincronización ya que en estas condiciones se reduce el daño celular sin verse comprometida la cinética o la tasa de incorporación de DENV.

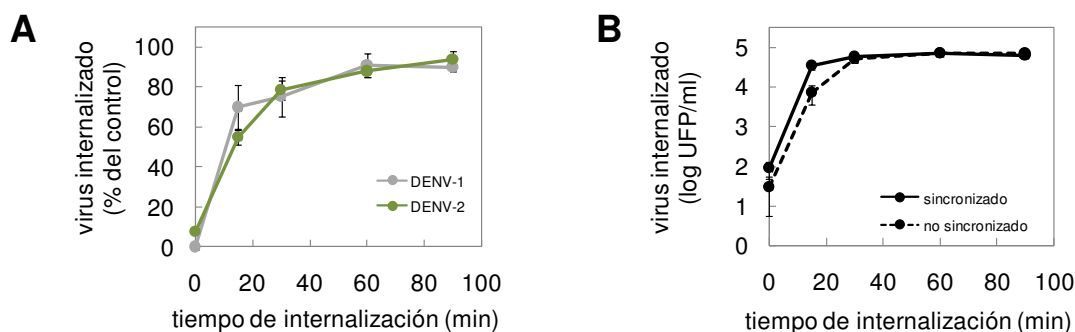


Figura 8. Cinética y tasa de internalización de DENV1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Células Vero fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 a 4 °C y luego fueron transferidas a 37 °C. A diferentes tiempos luego del cambio de temperatura se inactivó el virus extracelular con proteinasa K. Los resultados se expresan como el porcentaje de virus internalizado con respecto a un control en el que se sustituyó la proteinasa K con PBS. **B.** Células Vero fueron infectadas con DENV-2 a 37 °C (infección no sincronizada) o a 4 °C 1 h y luego a 37 °C (infección sincronizada). A diferentes tiempos de incubación a 37 °C se inactivó el virus extracelular con proteinasa K. Los resultados se expresan como el número de UFP internalizadas.

I. 2. Dependencia del pH

Estudios estructurales han demostrado en los últimos años la necesidad de cambios conformacionales en la proteína E inducidos por pH ácido para disparar la fusión de membranas celulares y virales que permiten la entrada de DENV (Modis *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Por lo

tanto, el primer paso de nuestra investigación consistió en evaluar la dependencia del pH para la entrada funcional de DENV-1 y DENV-2 en cultivos de células Vero. Para ello se decidió estudiar el efecto sobre la infección viral de dos compuestos químicos que elevan el pH de las vesículas ácidas intracelulares: el cloruro de amonio, una base lisosomotrópica débil (Castilla *et al.*, 1994; Mizzen *et al.*, 1985) y la concanamicina A, un potente inhibidor de la ATPasa vacuolar (Woo *et al.*, 1992; Muori *et al.*, 1993).

En primer lugar se analizó el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular utilizando el método colorimétrico del MTT (Figura 9 A) y luego se verificó mediante tinciones con naranja de acridina que en las concentraciones elegidas, debido a su falta de toxicidad, los mismos estuvieran ejerciendo su acción sobre el pH endosomal. La naranja de acridina es un colorante catiónico sensible al pH que se acumula en el interior de las vesículas ácidas intracelulares y emite una fluorescencia naranja (Palmgren, 1991). En los cultivos controles se observó el patrón clásico de

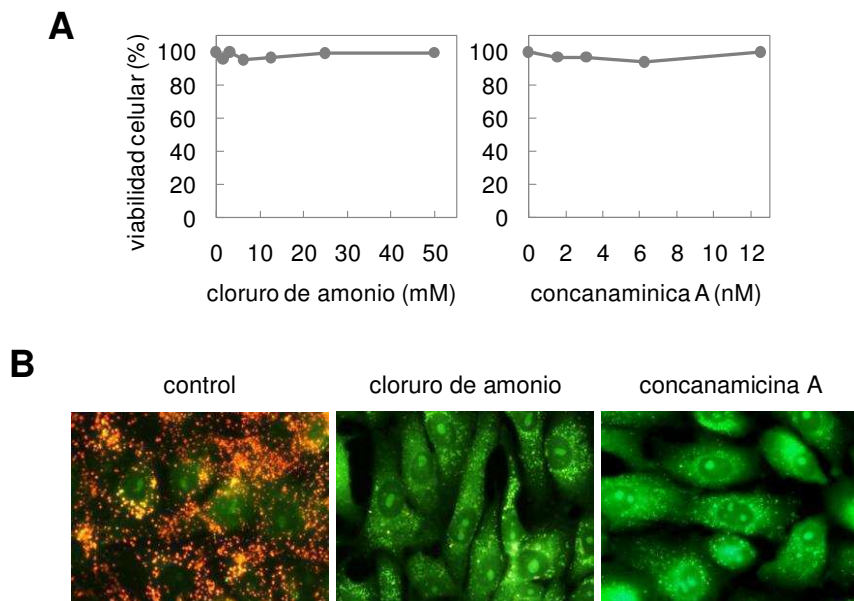


Figura 9. Efecto de cloruro de amonio y concanamicina A sobre la viabilidad celular y el pH de las vesículas ácidas intracelulares **A.** Cultivos de células Vero fueron tratados con concentraciones crecientes de las drogas durante 2 h a 37 °C y luego fueron incubados con una solución de MTT. Al cabo de 2 h de incubación se cuantificó la cantidad de cristales de formazán producidos y se calculó la viabilidad celular con respecto a un cultivo sin tratar con los compuestos. **B.** Cultivos de células Vero fueron tratados con cloruro de amonio (50 mM) o concanamicina A (10 nM) durante 1 h a 37 °C y luego fueron incubados con naranja de acridina en presencia de los compuestos. Luego de 15 min. las células se montaron sobre una gota de PBS y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia.

fluorescencia naranja citoplasmática por tinción de los compartimentos ácidos, mientras que en los cultivos tratados con los compuestos la ausencia de fluorescencia naranja fue total, indicando una eficiente elevación en el pH de las vesículas intracelulares (Figura 9 B).

Una vez comprobada la actividad aumentadora del pH de los compuestos, se procedió a estudiar su efecto sobre la multiplicación viral. Mediante ensayos de centros infecciosos se comprobó que el pH ácido intracelular se requiere efectivamente para la entrada del virus a la célula ya que la presencia de los compuestos redujo la cantidad de partículas virales infectivas internalizadas cuando se encontraron presentes durante la primera hora de infección con ambos serotipos (Figura 10 A). Asimismo, el tratamiento de cultivos de células Vero con cloruro de amonio y concanamicina A antes y durante la primera hora de infección produjo una marcada reducción en la producción de DENV-1 y DENV-2 a las 48 h p.i., alcanzándose valores de inhibición en el rendimiento viral de aproximadamente 80-90% frente al cloruro de amonio y valores cercanos al 100 % frente a concanamicina A (Figura 10 B). Por otra parte, ensayos de inmunofluorescencia indirecta de cultivos celulares infectados con DENV-1 y DENV-2 durante 48 h permitieron verificar que el cloruro de amonio ejerce su efecto inhibitorio sobre la multiplicación viral únicamente cuando es adicionado junto con el virus y no cuando los cultivos son tratados luego de 1 h p.i., confirmando que la inhibición observada es debida al efecto de los compuestos sobre los pasos iniciales de la infección y no a un efecto secundario sobre un paso posterior del ciclo de multiplicación del virus (Figura 10 C).

Dado que el aumento en el pH endosomal inducido por los compuestos evitaría la fusión de membranas y la liberación de la cápside viral al citoplasma celular, cabe esperar que en presencia de estas drogas las partículas virales permanezcan retenidas en los compartimentos endosomales. A fin de corroborar esta hipótesis cultivos de células Vero fueron infectados con DENV-2 en presencia o ausencia de cloruro de amonio 50 mM y a los 10 o 60 min p.i. las células fueron fijadas y procesadas para revelar el patrón de fluorescencia de la proteína de cápside. Observamos que luego de 10 min de internalización tanto en los cultivos control como en los cultivos tratados con cloruro de amonio la proteína de cápside presentó un patrón de fluorescencia puntillado, demostrando que las partículas virales fueron incorporadas en compartimentos endosomales (Figura 10 D). Luego de 60 min de internalización este patrón de fluorescencia puntillado desapareció por completo del cultivo control indicando que a este tiempo p.i. ya tuvo lugar el desnudamiento del virus. Por el contrario en el cultivo tratado, luego de 60 min de infección en la continua presencia de cloruro de amonio aún puede observarse el patrón de fluorescencia puntillado, demostrando que cuando la acidificación de las vesículas endosomales es inhibida las

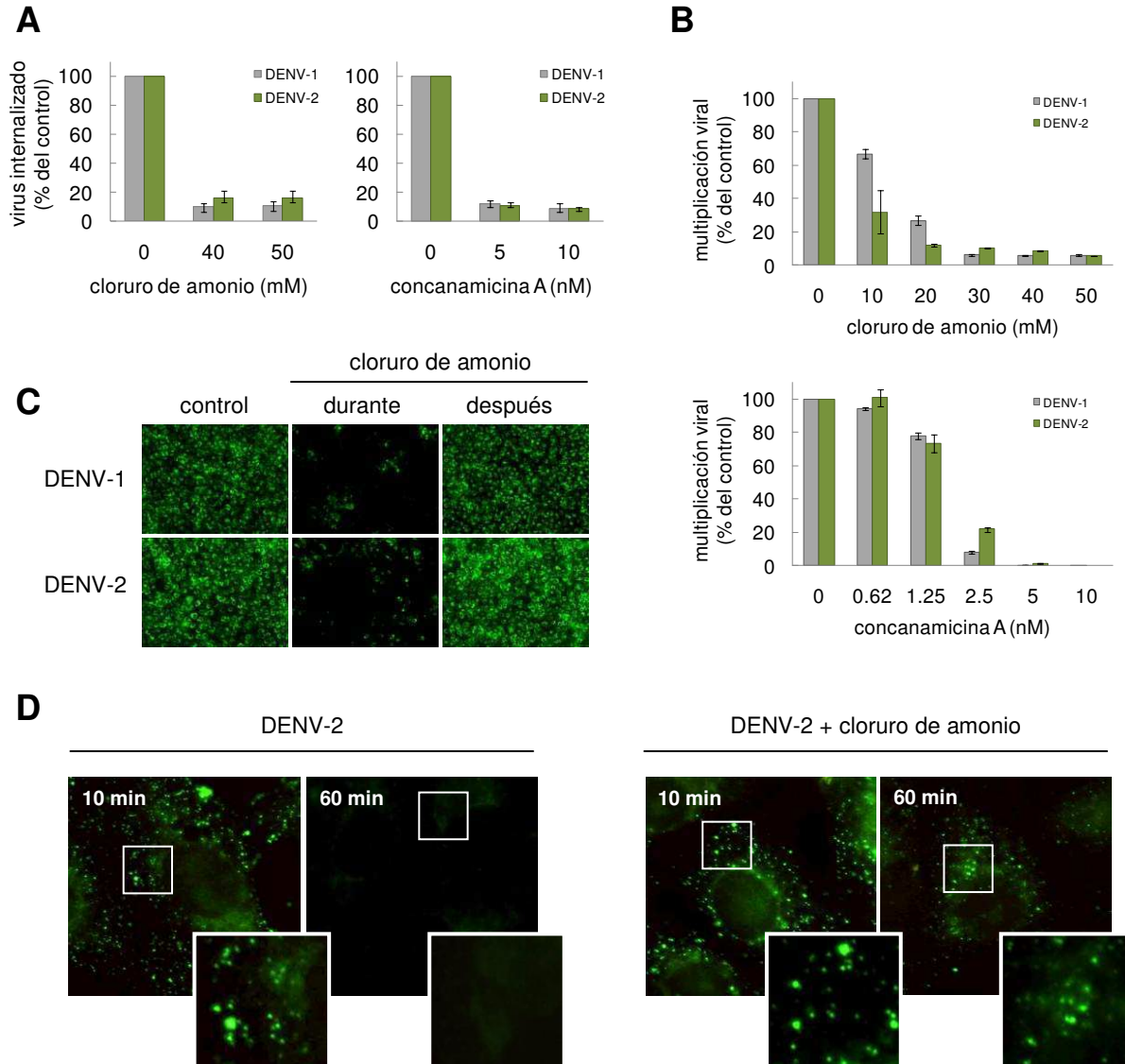


Figura 10. Efecto de inhibidores de la acidificación intravesicular frente a la entrada de DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Células Vero fueron tratadas durante 1 h con cloruro de amonio o concanamycin A y luego fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 1 UFP/célula. Luego de 1 h de infección en presencia de las drogas los cultivos se trataron con proteinasa K y se cuantificó el virus infeccioso internalizado por un ensayo de centros infecciosos. **B.** Cultivos celulares fueron tratados con varias concentraciones de las drogas y luego fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 h de internalización en presencia de los compuestos los cultivos se cubrieron con MM y se cuantificó la multiplicación viral a las 48 h p.i. por el método de formación de placas. **C.** Células Vero fueron tratadas con cloruro de amonio 50 mM y luego infectadas con DENV-1 o DENV-2 en presencia de la droga (durante) o alternativamente fueron infectadas y tratadas con cloruro de amonio luego de 1 h p.i. (después). En ambos casos el tratamiento de las células con cloruro de amonio se prolongó durante 2 h. Luego de 48 h p.i se fijaron los cultivos y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta contra la glicoproteína de envoltura viral. Aumento: 100X **D.** Cultivos celulares fueron tratados o no con cloruro de amonio y luego fueron infectados con DENV-2 a una m.i. de 10 UFP/célula. Al cabo de 10 o 60 min. de internalización las células fueron fijadas y procesadas para detectar la proteína de cápside viral por inmunofluorescencia indirecta. Aumento: 1000X. En A y B los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

partículas virales permanecen retenidas en compartimentos endosomales (Figura 10 D). Por lo tanto estos resultados indican que la entrada de DENV-1 y DENV-2 a células Vero ocurre por un mecanismo de endocitosis con exposición de las partículas virales a pH ácido, un paso necesario para que ocurra la liberación de la cápside viral al citoplasma celular.

I. 3. Caracterización de la vía endocítica infectiva utilizada por DENV-1 y DENV-2 para ingresar a células Vero

I. 3. a. Endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina

De todos los mecanismos endocíticos descritos hasta el momento, la endocitosis mediada por clatrina es la vía mejor caracterizada y la más utilizada por los virus para ingresar a las células (Marsh y Helenius, 2006; Sieczkarski y Whittaker, 2002a). A fin de determinar si la entrada de DENV-1 y DENV-2 en células Vero ocurre por esta vía se estudió el efecto de los inhibidores específicos clorpromazina y dansilcadaverina sobre la infección viral. La clorpromazina es una molécula catiónica anfifílica que perturba el ensamblaje de las redes de clatrina en la superficie celular y en los endosomas (Wang *et al.*, 1993), mientras que la dansilcadaverina es una monoamina que inhibe el agrupamiento de los complejos ligando-receptor, impidiendo en consecuencia su internalización (Levitzli *et al.*, 1980).

El tratamiento con concentraciones no citotóxicas de clorpromazina o dansilcadaverina (Figura 11 A) durante la primera hora de infección redujo marcadamente la multiplicación de DENV-1 mientras que no tuvo efecto inhibitorio sobre la producción de partículas de DENV-2 (Figura 11 B). El efecto de estos compuestos sobre la internalización de partículas virales infectivas se verificó mediante un ensayo de centros infecciosos. Ambos, clorpromazina y dansilcadaverina, redujeron la internalización de DENV-1 sin ejercer efecto inhibitorio sobre la internalización de DENV-2 (Figura 11 C). A fin de verificar que efectivamente las drogas estuviesen interfiriendo específicamente con la endocitosis dependiente de clatrina en células Vero, se analizó su efecto sobre la internalización de la proteína transferrina. Esta proteína es incorporada a las células por endocitosis dependiente de clatrina y por lo tanto es ampliamente utilizada como un ligando marcador de esta vía de entrada (Dautry-Varsat, 1986). En las células control, la transferrina fue incorporada dentro de vesículas endocíticas, visualizándose como un puntillado citoplasmático bien definido, mientras que en los cultivos tratados con clorpromazina o dansilcadaverina la proteína mostró un patrón de fluorescencia muy diferente, visualizándose de manera difusa en la superficie

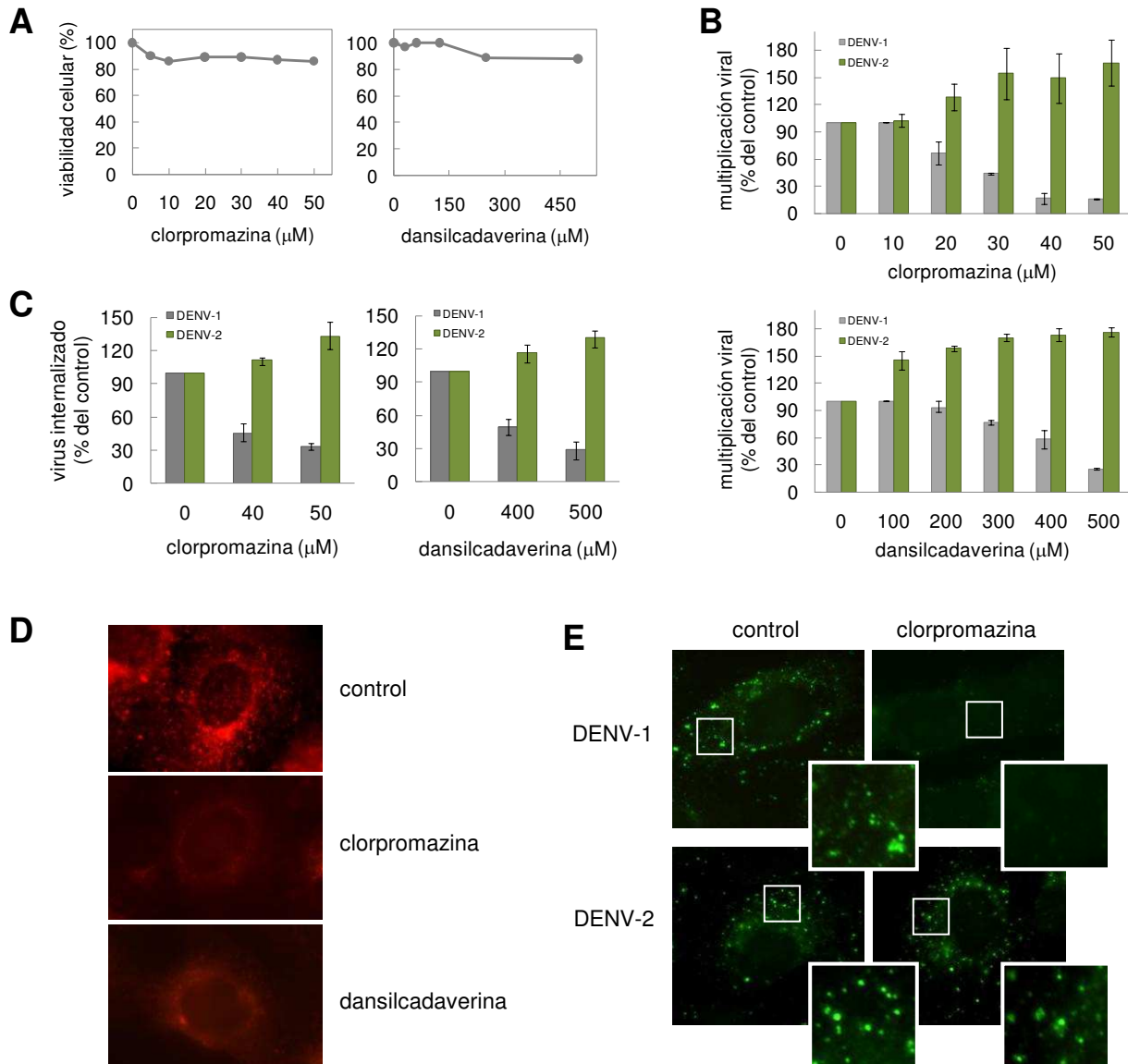


Figura 11. Efecto de inhibidores químicos de endocitosis mediada por clatrina frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Cultivos de células Vero fueron incubados con varias concentraciones de clorpromazina durante 3 h o dansilcadaverina durante 1,5 h y luego se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. **B.** Células Vero fueron tratadas durante 2 h con clorpromazina o durante 0,5 h con dansilcadaverina y luego fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 h de infección en presencia de las drogas se realizaron lavados con PBS y se cubrieron los cultivos con MM. La cuantificación de la producción viral se realizó a las 48 h p.i. por el método de formación de placas. **C.** Cultivos celulares fueron tratados con las drogas como en el punto B y luego fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 1 UFP/célula. Luego de 1 h de internalización en presencia de los compuestos se inactivó el virus extracelular por tratamiento con proteínasa K y se cuantificó el virus internalizado por la técnica de centros infecciosos. **D.** Células Vero tratadas o no con las drogas (50 μM clorpromazina o 500 μM dansilcadaverina) fueron incubadas con transferrina-TRITC. Luego de 1 h a 37 °C, las muestras fueron fijadas y visualizadas en un microscopio de fluorescencia. Aumento: 1000X. **E.** Cultivos celulares fueron tratados o no con clorpromazina (50 μM) y luego infectados con DENV a una m.i. de 10 UFP/célula. Luego de 30 min. de internalización los cultivos fueron fijados y procesados para detectar la glicoproteína de envoltura viral. Aumento: 1000X. En B y C los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones ± DE.

celular (Figura 11 D), lo que demuestra que la internalización dependiente de clatrina fue bloqueada eficientemente por la acción de los compuestos.

El efecto de las drogas sobre la internalización de las partículas virales se verificó también a través de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Cultivos celulares fueron tratados con clorpromazina 50 μ M y luego fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 10 UFP/célula. En paralelo se procesaron cultivos control sin tratar con el compuesto. Luego de 30 min de internalización a 37 °C, las células se fijaron y procesaron para detectar las partículas virales incorporadas mediante un ensayo de inmunofluorescencia con un anticuerpo reactivo contra la proteína de envoltura viral. En los cultivos controles las partículas de DENV-1 y DENV-2 presentaron un patrón de fluorescencia puntillado citoplasmático, indicativo de su localización en vesículas endocíticas (Figura 11 E). La presencia de clorpromazina redujo marcadamente la incorporación de DENV-1, dando un patrón de fluorescencia difusa que se asemeja al exhibido por la proteína transferrina en cultivos tratados con clorpromazina (Figura 11 D). Por el contrario, el tratamiento con esta droga no tuvo efecto sobre la internalización de partículas de DENV-2 (Figura 11 E).

A fin de corroborar de manera conclusiva la diferente dependencia de DENV-1 y DENV-2 en la vía mediada por clatrina para su ingreso a células Vero, se ensayó el efecto de un inhibidor molecular específico. La proteína Eps15 es una proteína celular altamente conservada indispensable en el proceso de endocitosis dependiente de clatrina. Se ha propuesto que Eps15 actúa como un puente entre el complejo adaptador proteico de membrana plasmática AP2 y otras proteínas celulares en el proceso de formación de la vesícula recubierta de clatrina (Benmerah *et al.*, 1998). La proteína Eps15 está organizada en tres dominios polipeptídicos: el dominio amino-terminal DI (en donde se encuentran los dominios EH de interacción proteína-proteína), el dominio central DII y el dominio carboxilo-terminal DIII que contiene el sitio de unión para el complejo AP-2. En este trabajo utilizamos una forma dominante negativa de la proteína Eps15, denominada EH29, la cual posee deletados el segundo y tercer dominio EH del DI y por lo tanto al ser sobreexpresada interfiere específicamente con la formación de vesículas de clatrina sin afectar las rutas de entrada independientes de clatrina (Benmerah *et al.*, 1999).

Cultivos de células Vero fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan las versiones fusionadas a GFP de la forma dominante negativa EH29, o una proteína control, DIII Δ 2, que es una versión truncada de Eps15 que no interfiere con la ruta de entrada por clatrina. A las 24 h post-transfección se infectaron las células con DENV-1 o DENV-2 y luego de 1 h de

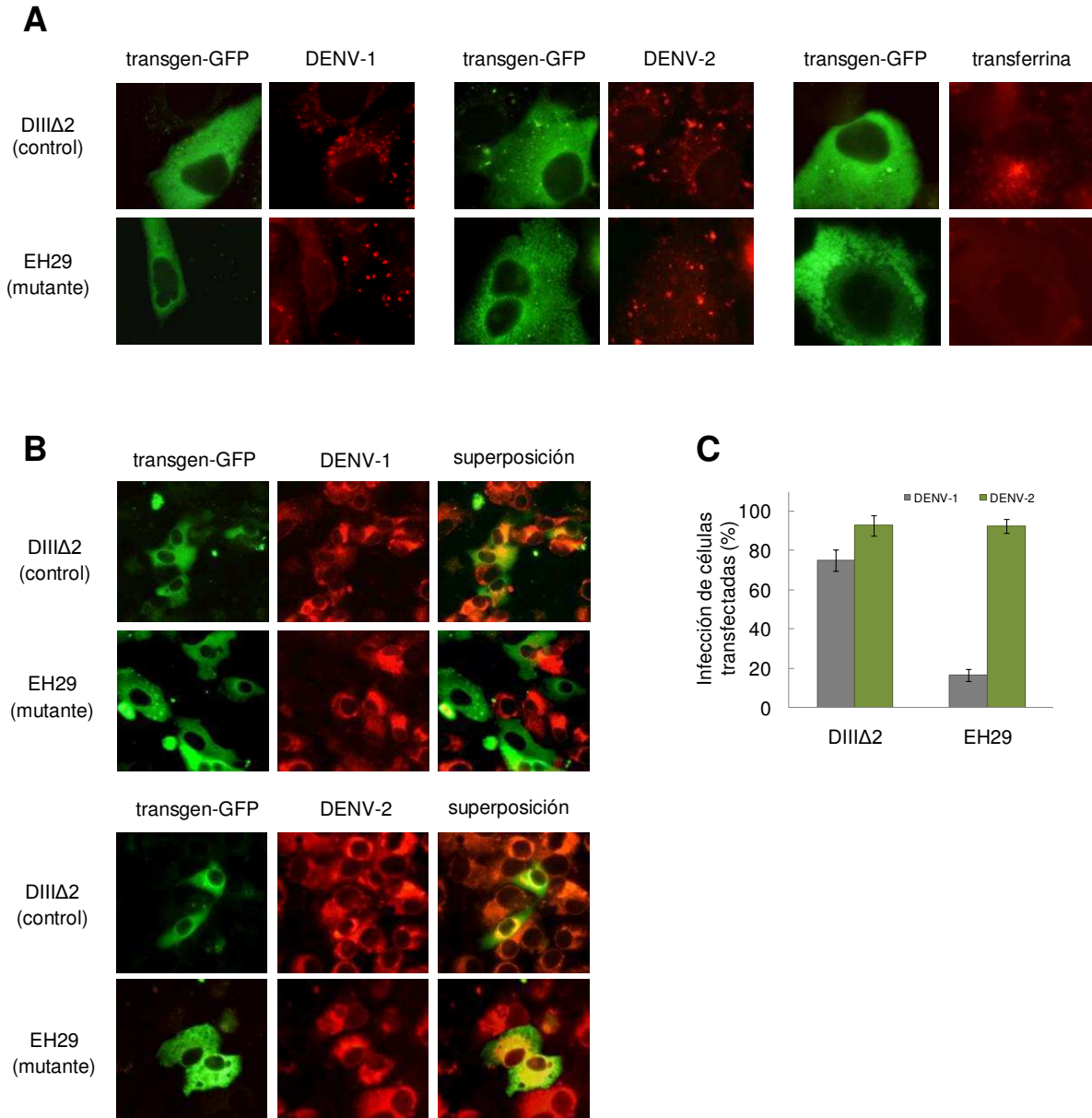


Figura 12. Efecto de un inhibidor molecular de endocitosis por clatrina frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Cultivos de células Vero fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan las versiones fusionadas a GFP del dominante negativo de la proteína celular Eps15 (EH29) o un plásmido control (DIIIΔ2). Luego de 24 h las células fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 10 UFP/célula. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 1 h y luego se fijaron y procesaron para detectar la glicoproteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta. **B.** Cultivos celulares transfectados como en el punto A fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 1 UFP/célula. Las células fueron incubadas durante 24 h y luego fueron fijadas para detectar la producción de antígeno viral mediante una inmunofluorescencia indirecta contra la glicoproteína de envoltura. **C.** A partir de las muestras del punto B se realizó un recuento de células infectadas sobre 250 células transfectadas y se calculó el porcentaje de infección. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones ± DE.

incubación a 37 °C, los cultivos fueron procesados para detectar la incorporación del virus por inmunofluorescencia indirecta simultáneamente con la expresión de la proteína autofluorescente GFP. En las células que expresan la proteína control, las partículas virales fueron incorporadas dentro de vesículas endocíticas, observándose una fluorescencia roja puntillada citoplasmática (Figura 12 A). Corroborando los resultados obtenidos con los inhibidores químicos, la expresión del dominante negativo EH29 impidió la internalización de partículas de DENV-1 (Figura 12 A, panel izquierdo), mientras que no produjo alteración en la incorporación de partículas de DENV-2 (Figura 12 A, panel central). Como control, se comprobó la funcionalidad del plásmido EH29 sobre la endocitosis dependiente de clatrina en células Vero analizando la entrada de la proteína transferrina. De acuerdo a lo esperado, sólo la expresión de la proteína dominante negativa impidió la incorporación de este ligando al interior de la célula (Figura 12 A, panel derecho). Para comprobar que las partículas DENV-2 internalizadas en células Vero que expresan el dominante negativo EH29 efectivamente poseen la capacidad de generar una infección productiva, cultivos transfectados fueron infectados con DENV-2, y paralelamente con DENV-1, y luego fueron incubados durante 24 h. Transcurrido ese lapso de tiempo, se detectó la expresión de GFP y la producción de antígeno viral por inmunofluorescencia y se determinó el porcentaje de infección de células transfectadas realizando un recuento sobre aproximadamente 250 células que expresaban niveles similares de la proteína autofluorescente GFP. Como era esperado, la expresión del dominante negativo tuvo un marcado efecto inhibitorio sobre la multiplicación de DENV-1 (Figura 12 B y C), reduciendo el porcentaje de células infectadas de un 75% en células que expresan la proteína control a un 16% cuando se expresa la proteína mutante. Por el contrario la expresión del dominante negativo no tuvo efecto sobre la multiplicación de DENV-2, presentando valores similares de porcentaje de infección en ambos cultivos (Figura 12 B y C), y demostrando que efectivamente hay infección productiva de DENV-2 en células Vero desprovistas de endocitosis clatrina-dependiente.

I. 3. b. Endocitosis mediada por caveolas/*lipid-rafts*

Con el fin de caracterizar la vía endocítica utilizada por DENV-2 para ingresar a las células Vero el siguiente paso fue analizar si en alguna etapa del proceso de entrada de este virus se requería de *lipid-rafts* y/o caveolas. Como se mencionó en la Introducción, los denominados *lipid-rafts* son dominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol utilizados por ciertos virus y toxinas para ingresar a la célula (Kirkham y Parton, 2005; Nichols y Lippincott-Schwartz, 2001). En

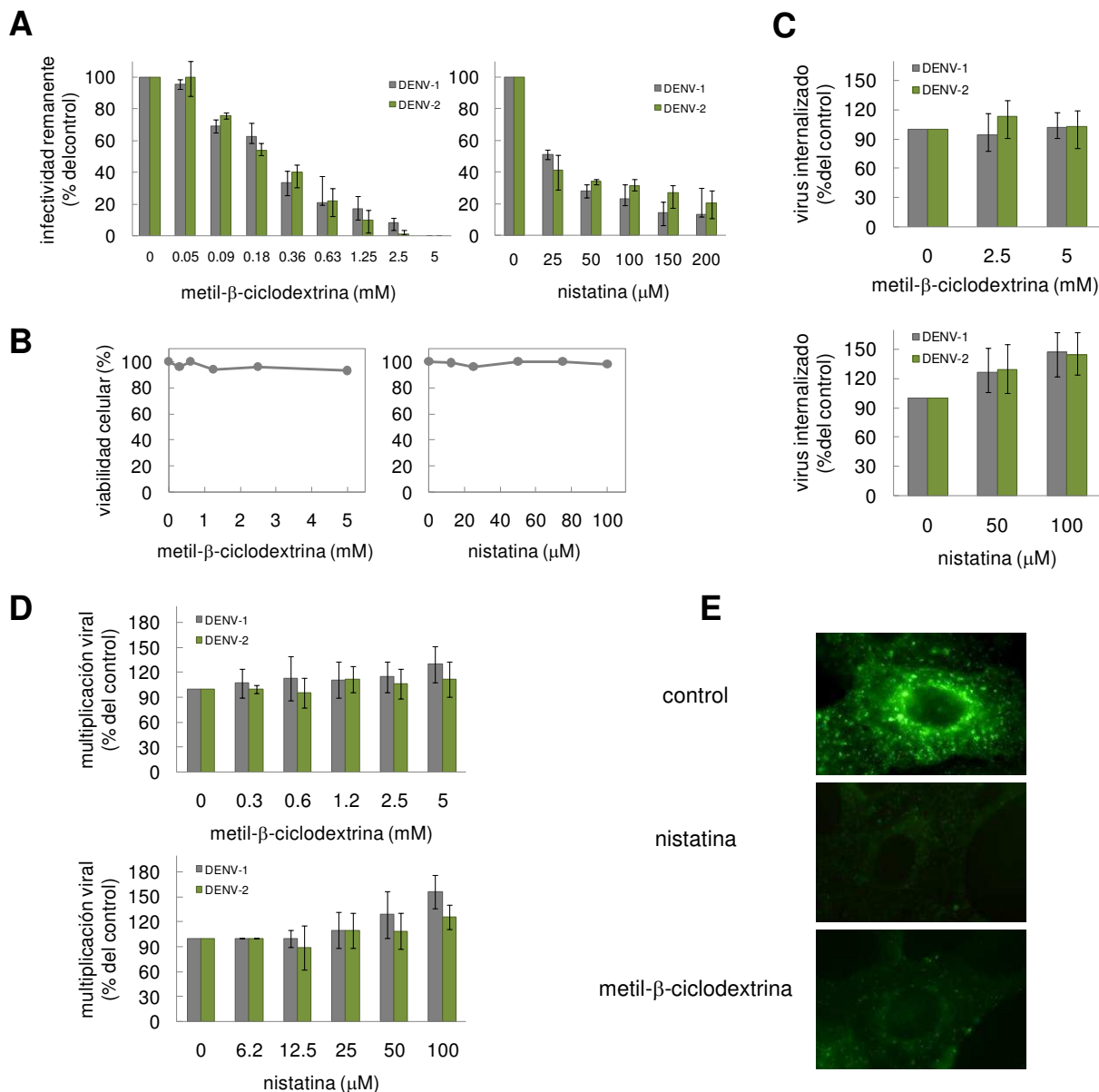


Figura 13. Efecto de inhibidores químicos de endocitosis por caveolas/lipid-rafts frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Suspensiones de DENV fueron incubadas con concentraciones crecientes de metil-β-ciclodextrina o nistatina. Luego de 1 h a 37 °C se determinó la infectividad viral remanente por el método de formación de placas. **B.** Cultivos celulares fueron incubados con varias concentraciones de metil-β-ciclodextrina durante 1 h o nistatina durante 5 h y luego se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. **C.** Células Vero fueron tratadas durante 1 h con metil-β-ciclodextrina o durante 5 h con nistatina y a continuación se realizaron intensos lavados con PBS y se infectaron las monocapas celulares con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 1 UFP/célula en ausencia de las drogas. Luego de 1 h de internalización se inactivó el virus extracelular por tratamiento con proteinasa K y se cuantificó el virus internalizado por el método de centros infecciosos. **D.** Cultivos celulares fueron tratados con las drogas como en el punto C y luego fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula en ausencia de los compuestos. Luego de 48 h se cuantificó la producción viral por el método de formación de placas. **E.** Células Vero tratadas con nistatina (100 μM) o metil-β-ciclodextrina (5 mM) en las mismas condiciones que en los puntos C y D fueron incubadas con toxina cólica-FITC. Luego de 1 h a 37°C, las muestras fueron fijadas y visualizadas en un microscopio de fluorescencia. Aumento: 1000X. En A, C y D los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones ± DE.

particular, las caveolas son *lipid-rafts* especializados en los que se encuentra asociada la proteína caveolina, y representan una de las vías de entrada más utilizadas por ciertos virus que no se internalizan en vesículas de clatrina (Pelkmans, 2005). Las rutas celulares dependientes de *lipid-rafts/caveolas* son muy sensibles a agentes que actúan sobre el colesterol de la membrana celular, por lo tanto se analizó el efecto sobre la infección con DENV de las drogas nistatina y metil- β -ciclodextrina. La nistatina es un compuesto que forma complejos con el colesterol presente en las membranas celulares, mientras que la metil- β -ciclodextrina extrae el colesterol de las membranas. Ambas drogas producen la desestabilización de la estructura de los *lipid-rafts/caveolas* y el bloqueo de este tipo de entrada (Anderson *et al.*, 1996; Ilangumaran y Hoessli, 1988; Pelkmans *et al.*, 2001).

Como este tipo de compuestos pueden también modificar la composición de la bicapa lipídica de la envoltura del virus, inactivándolo en consecuencia, primero se estudió el efecto virucida de ambas drogas por incubación de suspensiones de DENV-1 y DENV-2 con concentraciones crecientes de los compuestos durante 1 h a 37 °C. Luego, las muestras se diluyeron 1:100 con MM sin suero y se tituló la infectividad remanente por UFP en células Vero. La dilución fue realizada con el fin de reducir la concentración de droga a ser incubada con las células de modo de asegurar que cualquier disminución observada en el título de virus se deba exclusivamente a una inactivación del virión. Como se muestra en la Figura 13 A las drogas produjeron una inactivación dosis-dependiente de DENV-1 y DENV-2, siendo mucho más potente en el caso de metil- β -ciclodextrina, como probable consecuencia de una interacción de las mismas con colesterol presente en la membrana viral. Por lo tanto, las condiciones experimentales para probar el efecto sobre la infección de células Vero con DENV se eligieron de modo de afectar la organización de los *lipid-rafts* de la membrana celular pero sin un contacto directo entre las drogas y las partículas virales. Para ello las monocapas celulares se pre-incubaron con concentraciones no citotóxicas de ambas drogas (Figura 13 B) y luego se lavaron intensamente con PBS previamente a la infección. El pre-tratamiento con concentraciones crecientes de nistatina o metil- β -ciclodextrina no afectó la internalización (Figura 13 C) ni la multiplicación de DENV-1 o DENV-2 en células Vero (Figura 13 D). La efectividad del tratamiento para inhibir la endocitosis mediante *lipid-rafts/caveolas* se comprobó usando como control la entrada de la subunidad B de la toxina colérica, proteína marcadora de internalización por esta vía, en las mismas condiciones de pre-tratamiento que las utilizadas para los ensayos de infección viral. Las células no tratadas mostraron un patrón de fluorescencia perinuclear debido a la acumulación de la toxina en el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático, en tanto que en las células tratadas se previno muy marcadamente la

incorporación de la toxina observándose escasa fluorescencia en el interior de la célula (Figura 13 E).

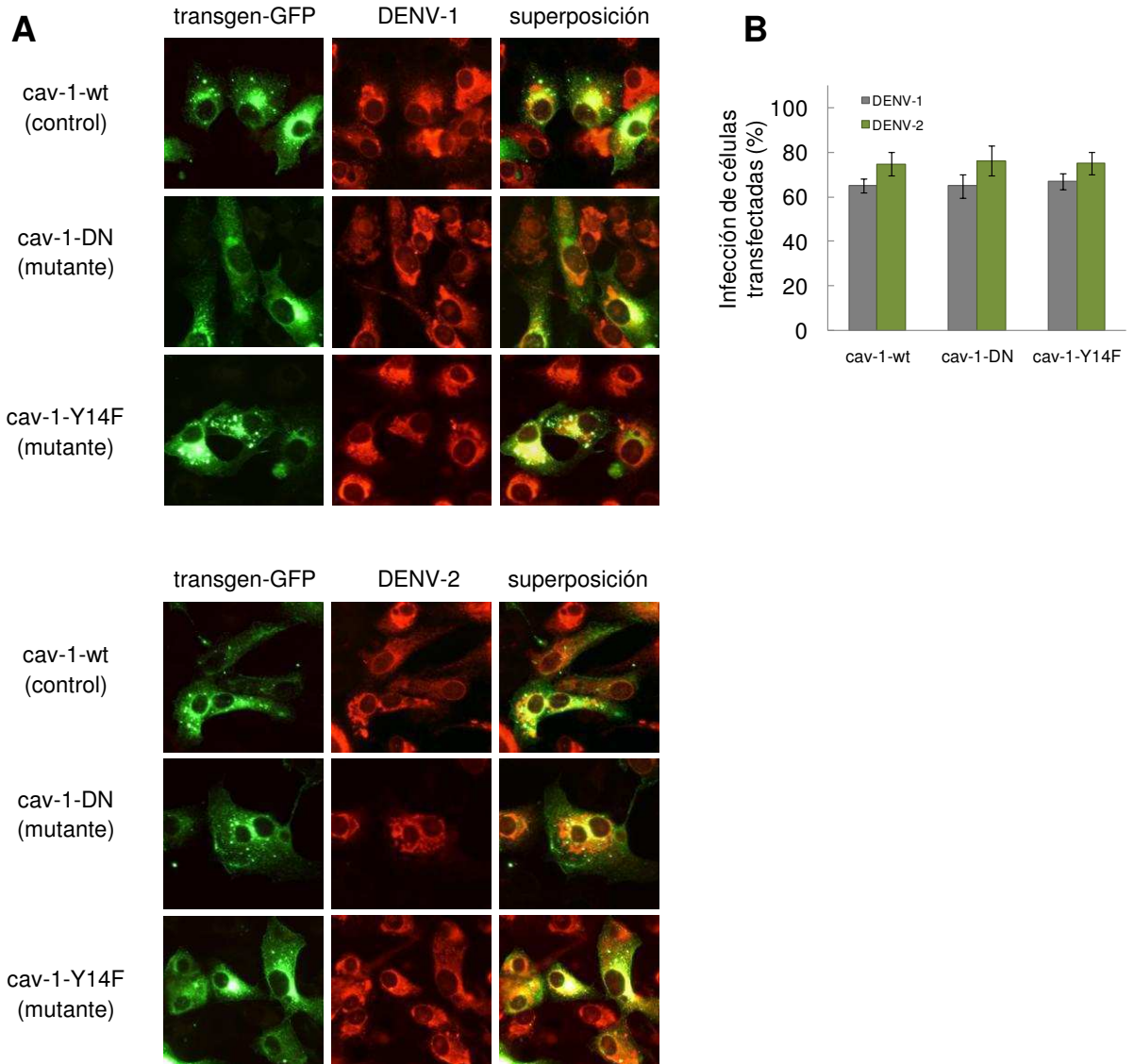


Figura 14. Efecto de un inhibidor molecular de endocitosis por caveolas frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Cultivos de células Vero fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan las versiones dominantes negativas (cav-1-DN o cav-1-Y14F) o un plásmido que codifica para la proteína caveolina-1 salvaje (cav-1-wt) fusionadas a GFP. Luego de 24 h las células fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 1 UFP/célula y al cabo de 24 h de infección los cultivos se fijaron y procesaron para detectar la glicoproteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta. **B.** A partir de las muestras del punto A se realizó un recuento de células infectadas sobre 250 células transfectadas y se determinó el porcentaje de infección. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

Para corroborar los resultados obtenidos con los inhibidores químicos por otra metodología que nos independizara del efecto virucida de los compuestos se utilizaron inhibidores moleculares específicos de la vía de caveolas. Se ha reportado que la fusión de la proteína GFP en el extremo amino-terminal de la proteína caveolina-1 afecta su funcionalidad actuando la misma como dominante negativa (cav-1-DN), mientras que la fusión de GFP en el extremo carboxilo-terminal no afecta su función y puede ser utilizada como control (cav-1-wt) (Pelkmans *et al.*, 2001). Recientemente se ha generado una mutante dominante negativa de caveolina-1, denominada cav-1-Y14F, portadora de una mutación que impide la fosforilación de la proteína en la tirosina 14 y, en consecuencia, se bloquea su internalización (Coyne y Bergelson, 2006).

Células Vero se transfectaron con los plásmidos conteniendo las versiones fusionadas a GFP de cav-1 wt y ambas mutantes dominantes negativas. A las 24 h post-transfección, las células se infectaron con DENV-1 o DENV-2 y luego de 24 h de infección se fijaron y analizaron para detectar la autofluorescencia de GFP y la producción de antígeno viral por inmunofluorescencia. No se observó ninguna diferencia en la capacidad de ser infectadas y expresar antígeno viral entre las células transfectadas con la caveolina-1 wt y las mutantes (Figura 14 A). En 250 células transfectadas expresando niveles similares de GFP el recuento de células que expresaban antígeno de DENV-1 o DENV-2 mostraron valores similares de infección en células transfectadas con cav-1-wt, cav-1-DN y cav-1-Y14F, siendo de alrededor del 65 % para DENV-1 y del 75 % para DENV-2 (Figura 14 B). Este resultado confirma la independencia de la vía de caveolas para la entrada de DENV-1 y DENV-2 a células Vero.

I. 3. c. Participación de la proteína dinamina

La suma de nuestros resultados señala una entrada de DENV-2 a células Vero por una vía no clásica independiente de clatrina y caveolas. En los últimos años se ha descrito que ciertos virus pueden utilizar este tipo de entrada (Quirin *et al.*, 2008; Rojek *et al.*, 2008; Siczarski y Whittaker, 2002b). Sin embargo la participación de la proteína dinamina, GTPasa esencial para la endocitosis mediada por clatrina y por caveolas, parece no ser siempre esencial en los procesos de entrada no clásicos. Para analizar si esta proteína está involucrada en la internalización de DENV-2 a células Vero se ensayó el efecto de dinasore, un inhibidor de dinamina de reciente desarrollo (Macia *et al.*, 2006). El tratamiento con esta droga produjo una importante reducción tanto en la producción infectiva (Figura 15 A) como en la internalización de DENV-2 (Figura 15 B) sin ejercer efecto citotóxico sobre las células (Figura 15 C). Como era esperado para un virus que

es internalizado a través de un mecanismo dependiente de vesículas recubiertas de clatrina, este compuesto ejerció efecto inhibitorio sobre la multiplicación e internalización de DENV-1 (Figura 15 A y B). Como control se verificó el efecto de dinasore sobre la internalización dependiente de

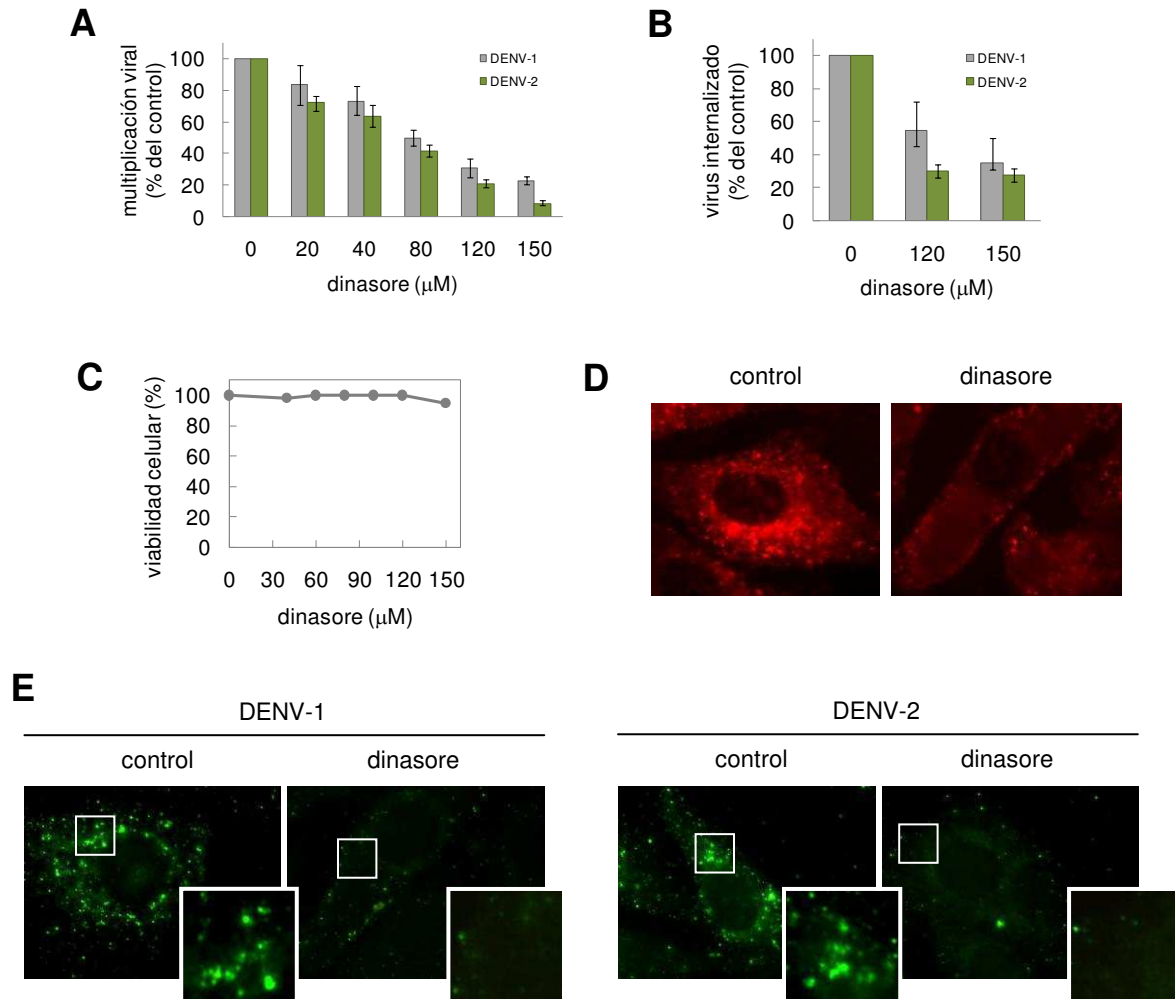


Figura 15. Efecto de un inhibidor químico de dinamina frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Cultivos celulares fueron incubados con concentraciones crecientes de dinasore durante 1 h y a continuación fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 h de infección en presencia de la droga se retiraron los inóculos virales y se cubrió con MM. La producción viral se cuantificó a las 48 h p.i. por el método de formación de placas. **B.** Células Vero fueron pretratadas con dinasore como en el punto A y luego se infectaron con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 1 UFP/célula en presencia del compuesto. Luego de 1 h de internalización se inactivó el virus extracelular por tratamiento con proteinasa K y se cuantificó el virus internalizado por el método de centros infecciosos. **C.** Cultivos celulares fueron tratados durante 2 h con varias concentraciones de dinasore y luego se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. **D.** Células Vero tratadas o no con dinasore (150 μM) en las mismas condiciones que en los puntos A y B fueron incubadas con transferrina-TRITC en presencia de la droga. Luego de 1 h a 37°C, las muestras fueron fijadas y visualizadas en un microscopio de fluorescencia. **E.** Cultivos celulares fueron tratados con dinasore (150 μM) y luego infectados con DENV a una m.i. de 10 UFP/célula. Luego de 30 min de internalización los cultivos fueron fijados y procesados para detectar la glicoproteína de envoltura viral. Aumento: 1000X. En A y B los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones ± DE.

dinamina en células Vero. Cultivos celulares fueron tratados con dinasore en las mismas condiciones que en los ensayos de infectividad y luego fueron incubadas con transferrina-TRITC. El tratamiento con dinasore redujo marcadamente la incorporación en esta proteína, encontrándose distribuida de manera difusa en la superficie celular, en contraste con el típico patrón puntillado observado en el cultivo control sin tratar con el compuesto (Figura 15 D). De manera similar, la presencia de dinasore durante el proceso de entrada del virus redujo la internalización de partículas virales de ambos serotipos (Figura 15 E), aportando una clara evidencia de la necesidad de dinamina para la incorporación de las partículas de DENV.

Para confirmar la participación de dinamina en la entrada de DENV-2 se utilizó como inhibidor molecular específico la mutante dominante negativa de dinamina, dyn II K44A, una

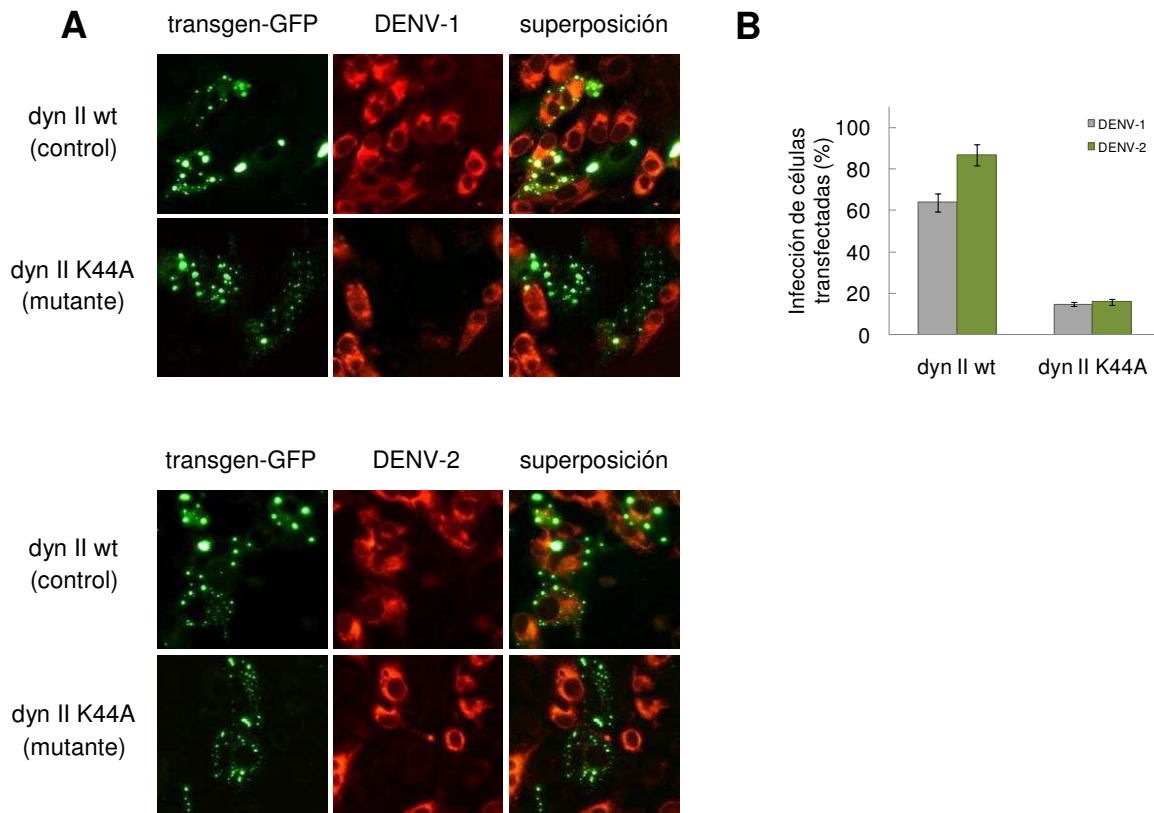


Figura 16. Efecto de un inhibidor molecular de dinamina frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Cultivos de células Vero fueron transfectados con plásmidos que expresan las versiones fusionadas a GFP de la proteína dinamina salvaje (dyn II wt) o dominante negativa (dyn II K44A). Luego de 24 h las células fueron infectadas con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 1 UFP/célula. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h y luego se fijaron y procesaron para detectar la glicoproteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta. **B.** A partir de las muestras del punto A se realizó un recuento de células infectadas sobre 250 células transfectadas y se calculó el porcentaje de infección. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones ± DE.

versión de esta proteína que posee reducida su capacidad de unión e hidrólisis de GTP (Damke *et al.*, 1994; Oh *et al.*, 1998; Sauvonnnet *et al.*, 2005). Células Vero fueron transfectadas con los plásmidos que expresan dinamina salvaje (dyn II wt) y mutante (dyn II K44A) fusionadas a GFP, y a las 24 h post-transfección se infectaron con DENV-2 y paralelamente con DENV-1. Luego de 24 h de infección, los cultivos se procesaron para revelar la multiplicación viral por inmunofluorescencia y se realizó el recuento de aproximadamente 250 células transfectadas. En concordancia con los resultados obtenidos con el inhibidor químico dinasore, la infección con DENV-2 resultó afectada por la expresión de la dinamina mutada dyn II K44A (Figura 16 A, panel inferior), obteniéndose porcentajes de infección en células transfectadas con dinamina salvaje y mutante del 87 % y 16 %, respectivamente (Figura 16 B). Como era esperado, la expresión del dominante negativo también ejerció efecto inhibitorio frente a DENV-1 (Figura 16 A, panel superior y Figuar 16 B).

I. 3. d. Endocitosis mediada por macropinocitosis/fagocitosis y participación del citoesqueleto

Con el objetivo de estudiar si la entrada de DENV-2 a células Vero tenía lugar a través del mecanismo de macropinocitosis nuestro siguiente paso fue analizar el efecto del compuesto amiloride, un inhibidor de la bomba $\text{Na}^{2+}/\text{H}^{+}$ indispensable en el proceso macropinocítico, sobre la internalización del virus (Swanson y Watts, 1995). Sin embargo, nuestro análisis preliminar del efecto del compuesto sobre las partículas virales demostró que el mismo presentaba un potente efecto virucida al ser incubado durante 1 h con DENV-2 previamente a la infección (Figura 17 A). En este caso la estrategia anteriormente utilizada de pretratar las células y luego infectarlas en ausencia de compuesto no fue considerada una opción viable, dada la evidente naturaleza reversible del efecto de este compuesto sobre la macropinocitosis (Koivusalo *et al.*, 2010).

Por lo tanto, para estudiar la participación de la endocitosis por macropinocitosis en la entrada de DENV se utilizaron otro tipo de compuestos. Si bien los mecanismos moleculares que gobiernan los procesos de macropinocitosis y fagocitosis son fundamentalmente diferentes, ambos mecanismos comparten la característica de ser altamente dependientes de la dinámica del citoesqueleto de actina, el cual regula la formación de protuberancias o pseudópodos de la membrana celular. Se decidió analizar el efecto sobre la entrada de DENV-1 y DENV-2 del compuesto citochalasina D, una droga que se une a la actina en su forma filamentosa interfiriendo con su polimerización (Stossel, 1989). Cultivos celulares fueron tratados con concentraciones no

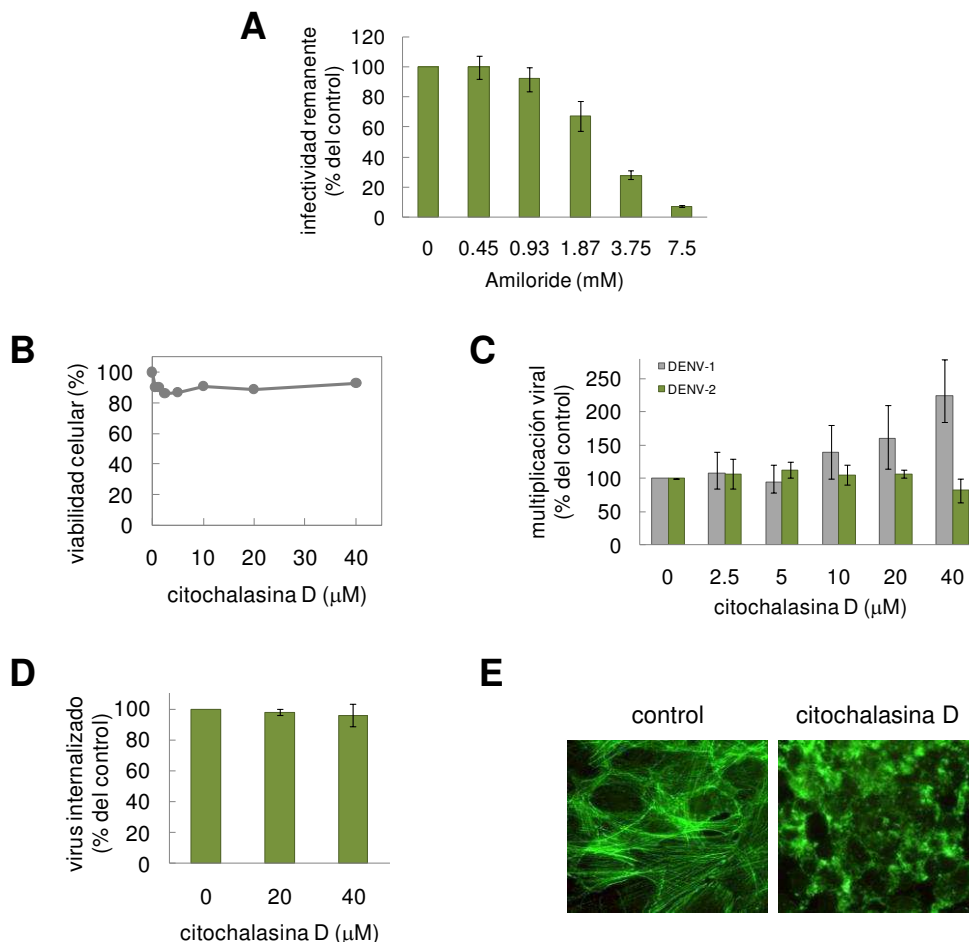


Figura 17. Efecto de inhibidores químicos de endocitosis por macropinocitosis/fagocitosis frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Suspensiones de DENV-2 fueron incubadas con concentraciones crecientes de amiloride y luego de 1 h a 37 °C se determinó la infectividad viral remanente por el método de formación de placas. **B.** Cultivos celulares fueron incubados con varias concentraciones de citochalasina D durante 3 h y luego se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. **C.** Células Vero fueron tratadas durante 2 h con citochalasina D y luego se infectaron con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula en presencia de la droga. Luego de 48 h se cuantificó la producción viral por el método de formación de placas. **D.** Células Vero tratadas con la droga en las mismas condiciones que en el punto C fueron infectadas con DENV-2 en presencia del compuesto. Luego de 1 h de internalización se inactivó el virus extracelular por tratamiento con proteinasa K y se cuantificó el virus internalizado por el método de centros infecciosos. **E.** Cultivos celulares fueron tratados o no con citochalasina D 40 µM y luego fueron fijados e incubados con faloidina-FITC a fin de revelar los microfilamentos de actina. Aumento: 400X. En A, C y D los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones ± DE.

citotóxicas del compuesto (Figura 17 B) y luego fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 en presencia del mismo. Luego de 1 h de infección se retiraron los inóculos virales, se cubrieron los cultivos con MM y se cuantificó la producción viral a las 48 h p.i. Como se observa en la Figuar 17 C, el tratamiento con citochalasina D no solo no ejerció efecto inhibitorio sobre la multiplicación de DENV-1 o DENV-2, sino que incluso generó un incremento en la producción de partículas

infectivas de DENV-1 a las mayores concentraciones evaluadas. La falta de participación de las fibras de actina en la internalización de DENV-2 a células Vero se corroboró por medio de un ensayo de centros infecciosos. La presencia de citochalasin D durante la primera hora de infección no redujo la internalización de partículas infectivas de DENV-2 (Figura 17 D), aún cuando el tratamiento con esta droga indujo el efecto esperado sobre los microfilamentos de actina, como revela una tinción con faloidina-FITC de cultivos tratados con la droga (Figura 17 E).

A fin de excluir definitivamente una posible participación del citoesqueleto de actina en la entrada de DENV-2 a células Vero se evaluó por medio de ensayos de inhibición del rendimiento viral el efecto de dos compuestos adicionales: latrunculina A y jasplakinolide. Latrunculina A actúa uniéndose a la actina en su forma globular e inhibiendo su polimerización (Morton *et al.*, 2000), mientras que jasplakinolide se une a la actina en su forma filamentosa estabilizando los microfilamentos y por lo tanto inhibiendo la dinámica del citoesqueleto de actina (Bubb *et al.*, 1994). Ninguno de estos agentes (Figura 18 A y B) redujeron la producción de DENV-2 cuando los cultivos fueron tratados con dosis no tóxicas de estas drogas durante la primera hora de infección, indicando por lo tanto que para la entrada infectiva de DENV-2 a células Vero no se requiere de la

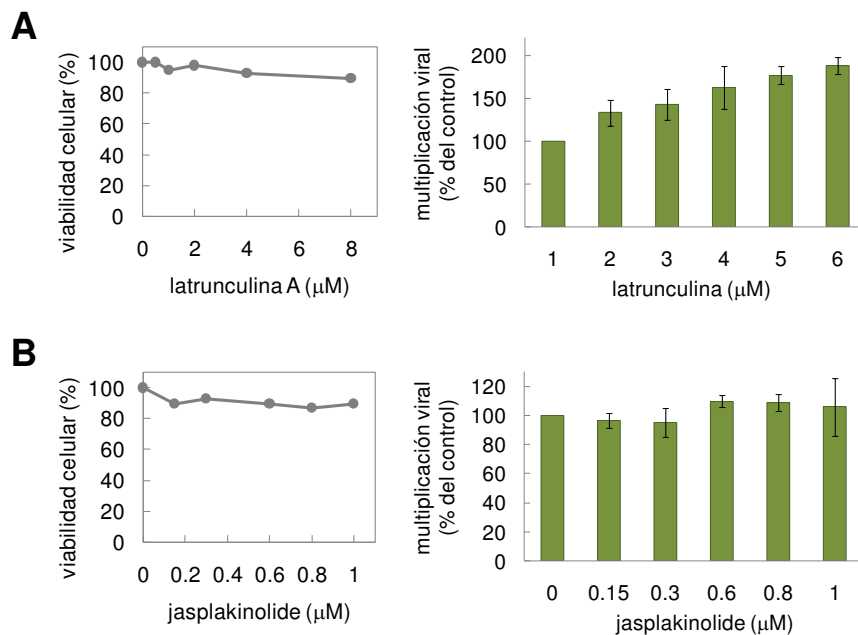


Figura 18. Efecto de agentes despolimerizantes o estabilizantes del citoesqueleto de actina frente a DENV-2 en células Vero. Cultivos celulares fueron incubados con varias concentraciones de latrunculina A (**A**) o jasplakinolide (**B**) durante 1,5 h y luego se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. Células Vero fueron tratadas durante 0,5 h con latrunculina A (**A**) o jasplakinolide (**B**) y luego se infectaron con DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula en presencia de las drogas. Luego de 48 h p.i. se cuantificó la producción viral por el método de formación de placas.

integridad ni de la dinámica del citoesqueleto de actina, hecho que permite excluir cualquier posible participación de las vías de macrofagocitosis/fagocitosis en la internalización de este virus.

Una vez establecida la independencia del citoesqueleto de actina para la entrada de DENV-1 y DENV-2 a células Vero se decidió ampliar la caracterización del proceso de entrada explorando acerca de la participación de los microtúbulos. Para ello se analizó el efecto de los agentes despolimerizantes, nocodazol y colchicina (Hamel, 1996), mediante ensayos de inhibición del rendimiento viral. El tratamiento con estos compuestos tuvo un efecto diferencial frente a DENV-1 y DENV-2, ejerciendo ambos un efecto inhibitorio moderado frente a DENV-2, pero sin presentar efecto inhibitorio frente a la multiplicación de DENV-1 (Figura 19 A) en cultivos tratados con dosis no citotóxicas (Figura 19 B). Mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal reactivo contra β -tubulina se verificó que las drogas efectivamente indujeron la despolimerización de los microtúbulos en las condiciones experimentales utilizadas (Figura 19 C).

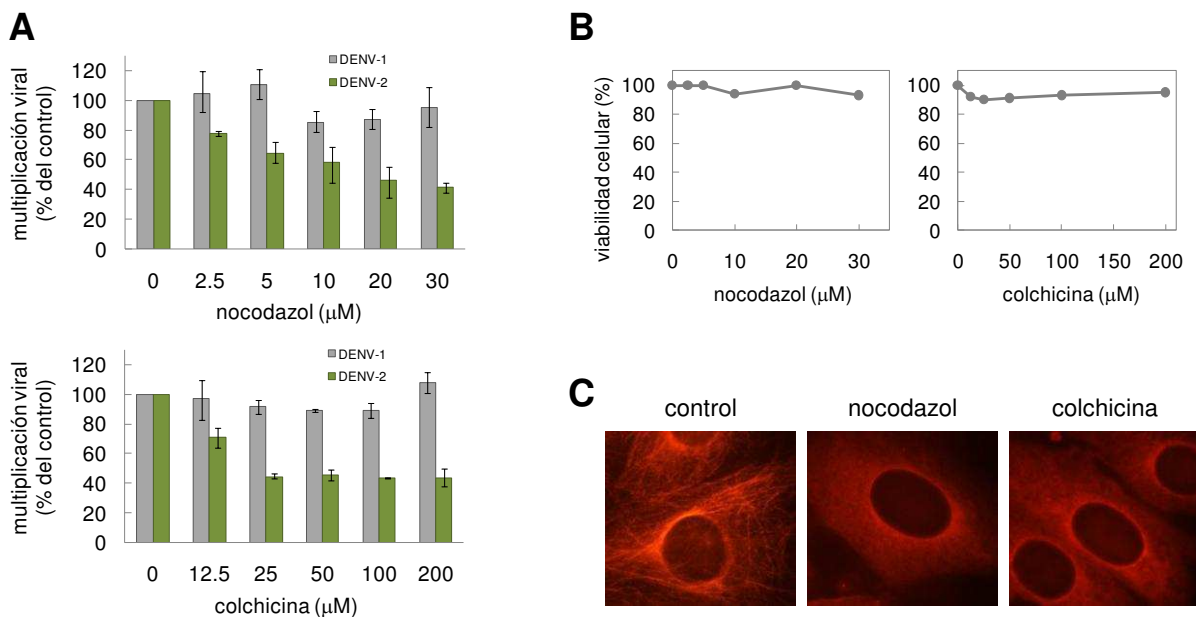


Figura 19. Efecto de agentes despolimerizantes de microtúbulos frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Células Vero fueron tratadas durante 2 h con nocodazol o colchicina y luego se infectaron con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula en presencia de las drogas. Luego de 1 h de incubación se retiraron los inóculos y se cubrieron los cultivos con MM. La cuantificación de la producción viral se realizó a las 48 h p.i. por el método de formación de placas. **B.** Cultivos celulares fueron incubados con varias concentraciones de las drogas durante 3 h y luego se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. **C.** Células Vero fueron tratadas o no con nocodazol (30 μ M) o colchicina (200 μ M) en las mismas condiciones que en el punto A y luego fueron fijadas y procesadas para revelar la proteína tubulina por inmunofluorescencia. En A los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

I. 3. e. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-1 y DENV-2 a células Vero

La suma de nuestros resultados indica que DENV-1 utilizaría una vía infectiva dependiente de clatrina para su ingreso a células Vero, mientras que DENV-2 utilizaría una vía independiente de clatrina, caveolas y *lipid-rafts*, pero dependiente de dinamina. A fin de confirmar estas conclusiones y visualizar el tipo de estructuras celulares involucradas en la entrada de DENV-2 se realizaron observaciones por microscopía electrónica de la entrada de ambos virus. Cultivos celulares se infectaron con DENV-1 o DENV-2 a 4 °C, aproximadamente a una m.i. de 60 UFP/célula, y a continuación se transfirieron a 37 °C para dar inicio a la internalización viral. Luego de 25 min de incubación, se fijaron las células con glutaraldehído y se procesaron para microscopía electrónica.

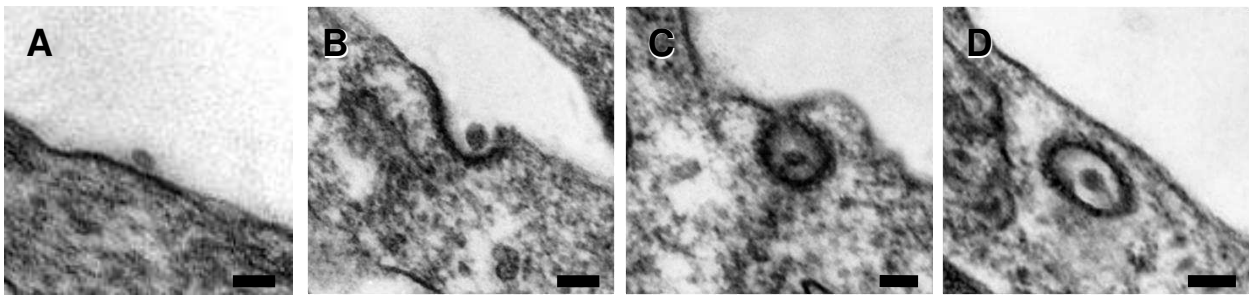


Figura 20. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-1 a células Vero. Cultivos celulares fueron infectados con DENV-1 durante 1 h a 4 °C y luego fueron transferidos a 37 °C para dar inicio a la internalización viral. Luego de 25 min de incubación las células fueron fijadas y procesadas para su visualización por microscopía electrónica de transmisión. Barra: 100nm.

En concordancia con las descripciones bibliográficas las partículas virales de DENV-1 y DENV-2 observadas tuvieron un tamaño dentro del rango 44–52 nm (Damonte *et al.*, 2004) y presentaron un núcleo electrodens rodeado por una membrana lipídica (Figura 20 y 21). Como se observa en la figura 20, encontramos partículas de DENV-1 en el espacio extracelular asociado a regiones engrosadas de la membrana plasmática (Figura 20 A) y en hendiduras electrodensas que se asemejan a las invaginaciones recubiertas de clatrina descritas en la bibliografía (Figura 20 B y C) (Marsh y Helenius, 2006). En numerosas ocasiones se visualizaron partículas virales dentro de invaginaciones recubiertas en distintos estadios del proceso endocítico: las típicas invaginaciones en forma de “U” que corresponden a los primeros momentos del proceso de formación de la invaginación (Figura 20 B), y las hendiduras en forma de “O” que corresponden a invaginaciones prácticamente completas que están a punto de cerrarse para dar una vesícula primaria (Figura 20

C). Además se observó el virus dentro de vesículas endocíticas recubiertas de aproximadamente 100-150 nm, un tamaño que se encuentra dentro del rango descrito para las vesículas recubiertas de clatrina (Figura 20 D) (Bishop, 1997; Ehrlich *et al.*, 2004; Heuser, 1980).

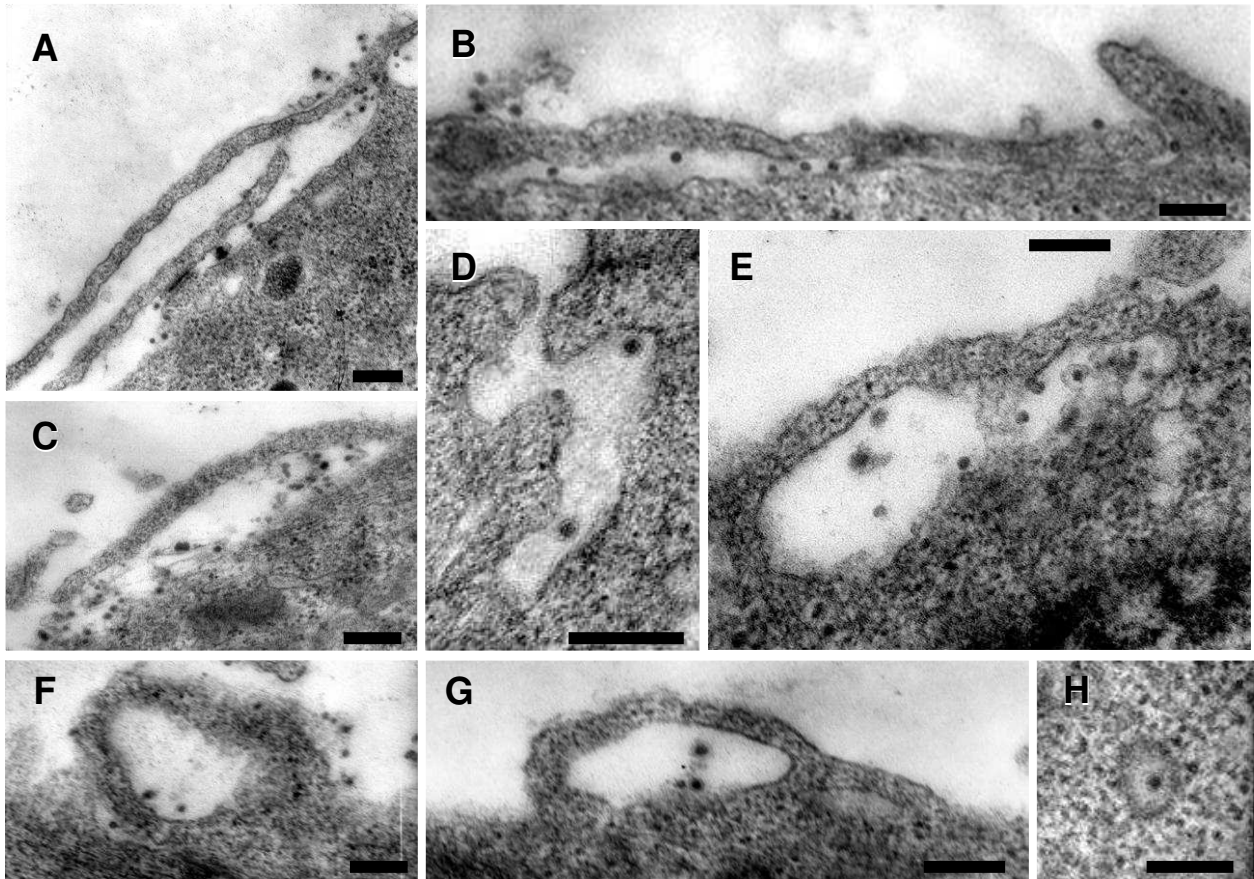


Figura 21. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-2 a células Vero. Cultivos celulares fueron infectados con DENV-2 durante 1 h a 4 °C y luego fueron transferidos a 37 °C para dar inicio a la internalización viral. Luego de 25 min de incubación las células fueron fijadas y procesadas para su visualización por microscopía electrónica de transmisión. Barra: 300nm.

En el caso de DENV-2 el panorama fue muy distinto. Observamos partículas virales en el espacio extracelular asociado a proyecciones de la membrana plasmática (Figura 21 A, B y C) o en hendiduras no recubiertas de la membrana (Figura 21 D). En varias ocasiones se encontraron partículas virales dentro de vesículas desnudas de gran tamaño (Figura 21 E, F y G), aunque aún queda por ser determinado si verdaderamente representan vesículas endocíticas primarias o son simplemente el resultado de los numerosos plegamientos y proyecciones de la membrana

plasmática observados. Sólo en muy raras ocasiones se encontraron partículas virales dentro de vesículas recubiertas (Figura 21 H).

Por lo tanto, estos resultados demuestran de manera definitiva que la entrada de DENV-1 a células Vero tiene lugar a través de la vía endocítica dependiente de clatrina, mientras que la entrada de DENV-2 ocurre por una ruta no clásica independiente de clatrina.

I. 4. Análisis de la afinidad por heparán sulfato

A continuación se decidió analizar si la variación observada en la vía endocítica en células Vero con el serotipo viral tenía relación con una diferencia en el receptor celular utilizado para su internalización. Desafortunadamente, como se mencionó en la Introducción, la identidad del receptor celular que interactúa con la proteína de envoltura del virus dengue no ha sido claramente dilucidada.

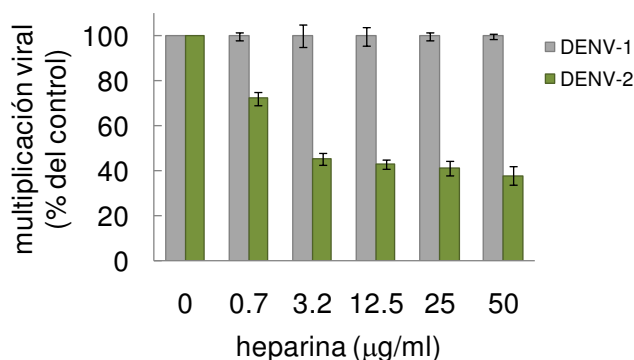


Figura 22. Efecto de heparina frente a DENV-1 y DENV-2. Células Vero fueron tratadas durante 1 h con concentraciones crecientes de heparina y luego fueron infectadas con 100-150 UFP de DENV-1 o DENV-2. Luego de 1 h de infección en presencia de la droga se retiraron los inóculos y se cubrieron los cultivos con medio de plaqueo. Al cabo de 6 o 7 días dependiendo del serotipo viral, se fijaron las células, se realizó el recuento de UFP y se calculó el porcentaje de multiplicación con respecto a un cultivo sin tratar con la droga. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

Trabajos previos de nuestro laboratorio sugieren que el heparán sulfato participaría tanto en la adsorción como en la internalización de DENV-2 en células Vero (Talarico y Damonte, 2007). A fin de analizar posibles diferencias en la afinidad por el heparán sulfato en el proceso de entrada de DENV-1 y DENV-2 se estudió el efecto del compuesto heparina. La heparina es un análogo estructural del heparán sulfato que compite con este último por la unión

a DENV. Como se observa en la figura 22, la presencia de heparina durante la primera hora de infección no ejerció efecto frente a DENV-1, mientras que redujo la multiplicación de DENV-2. Estos resultados indican que ambos serotipos presentan una afinidad diferencial frente al heparán sulfato, lo que podría estar implicado en el direccionamiento de las partículas virales hacia una u otra vía endocítica.

I. 5. Comparación con otras cepas de DENV-1 y DENV-2

A fin de establecer si la diferencia observada en la vía de entrada a células Vero entre DENV-1 y DENV-2 era atribuible a alguna particularidad de las dos cepas de referencia utilizadas, DENV-2 NGC y DENV-1 HW, o por el contrario era una propiedad distintiva y representativa compartida por diferentes variantes de cada serotipo, se amplió el estudio a otra cepa de referencia y también a aislamientos clínicos provenientes de pacientes de epidemias recientes de nuestro país. Se trabajó con la cepa de referencia 16681 de DENV-2, con dos aislamientos clínicos de DENV-1 denominados ARG9920 y ARG0044 correspondientes a casos detectados en la ciudad de Buenos Aires en pacientes que provenían de Paraguay durante los años 1999 y 2000 (Barrero y Mistchenko, 2004), y dos aislamientos de DENV-2, denominados 67655 y 67702, provenientes de pacientes del brote registrado en la provincia de Salta en 2006. Para cada aislamiento las suspensiones virales para ensayar se prepararon en células de mosquito C6/36 HT en las mismas condiciones experimentales que para las dos cepas de referencia inicialmente estudiadas. Dado que la diferencia principal en cuanto al modo de entrada de ambos serotipos en células Vero consistió en la dependencia o no de clatrina para la endocitosis, con estas cinco cepas sólo se analizó este parámetro evaluando la susceptibilidad de la infección al inhibidor clorpromazina por determinación de los rendimientos virales en presencia y ausencia de esta droga.

Como puede observarse en la Figura 23 A, la infección con los aislamientos clínicos de DENV-1 fue marcadamente afectada, en forma similar a lo observado con la cepa de referencia HW, confirmando que este serotipo es internalizado en células Vero a través de vesículas recubiertas de clatrina. Por su parte, todas las cepas de DENV-2 ensayadas mostraron un comportamiento similar a la cepa NGC siendo totalmente resistentes a la acción de clorpromazina.

En el caso de la cepa de referencia 16681 se decidió complementar este resultado evaluando el efecto de la expresión del dominante negativo de la proteína celular Eps15. En concordancia con el resultado obtenido con el inhibidor químico clorpromazina, la expresión del

dominante negativo EH29 no ejerció efecto inhibitorio sobre la multiplicación del virus (Figura 23 B).

Estos resultados indican que la forma de entrada diferencial en células Vero en cuanto a la dependencia de clatrina sería una característica propia de los serotipos DENV-1 y DENV-2 compartida por distintas cepas.

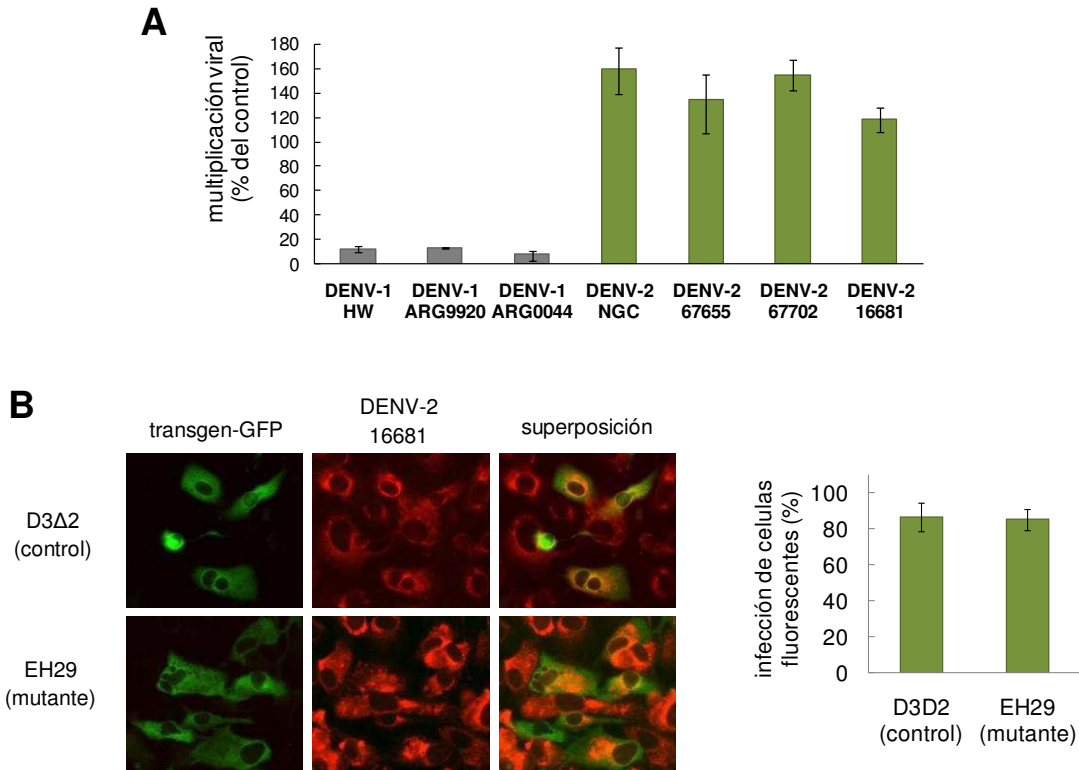


Figura 23. Efecto de inhibidores de endocitosis por clatrina frente a aislamientos clínicos de DENV-1 y DENV-2 y la cepa de referencia 16681 de DENV-2 **A.** Cultivos celulares fueron tratados con clorpromazina 50 μ M y luego fueron infectados con los aislamientos clínicos de DENV-1 o DENV-2 o con la cepa 16681 de DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 h de infección en presencia del compuesto se retiraron los inóculos virales y se cubrieron los cultivos con MM. La cuantificación de la infección viral se realizó a las 48 h p.i. por el método de formación de placas. **B.** Cultivos de células Vero fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan las versiones fusionadas a GFP del dominante negativo de la proteína celular Eps15 (EH29) o un plásmido control (D3 Δ 2). Luego de 24 h las células fueron infectadas con DENV-2 16681 a una m.i. de 1 UFP/célula. Las células fueron incubadas durante 24 h y luego fueron fijadas para detectar la producción de antígeno viral mediante una inmunofluorescencia indirecta contra la glicoproteína de envoltura. A partir de estas muestras se realizó un recuento de células infectadas sobre 250 células transfectadas y se calculó el porcentaje de infección. En A y B los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

I. 6. Comparación con la entrada de DENV-1 y DENV-2 a otras células de mamífero

Dado el extendido rango de huésped que posee DENV, con capacidad de infectar una amplia variedad de células de mamífero, se estudió la entrada de los serotipos DENV-1 y DENV-2 en la línea celular humana A549 para comparar la vía de entrada en una línea celular diferente de mamífero. Para ello se utilizó como parámetro de evaluación el efecto de los inhibidores farmacológicos de las diferentes rutas endocíticas sobre la multiplicación de DENV. Las células se trataron con cloruro de amonio, clorpromazina, dansilcadaverina, nistatina, metil- β -ciclodextrina o dinasore en las mismas condiciones de tiempo de tratamiento y concentración que las utilizadas previamente para células Vero, ya que en dichas condiciones la viabilidad de las células A549 se mantuvo siempre por encima del 90 % (Figura 24 A). Mediante tinciones con los marcadores específicos de pH endosomal, y endocitosis por clatrina y caveolas, se observó que el rango de concentraciones ensayado fue suficiente para inducir esencialmente los mismos efectos bloqueantes en las vías endocíticas en A549 que en Vero (Figura 24 B). Luego, se determinó la capacidad infectiva de DENV-1 y DENV-2 en células tratadas con cada droga midiendo la producción de virus a las 48 h p.i. Los resultados sugieren que DENV-1 y DENV-2 entran por una ruta endocítica dependiente de pH ácido ya que se detectó una significativa reducción dosis-dependiente en la infectividad viral después del incremento de pH producido por cloruro de amonio (Figura 25 A). El tratamiento con clorpromazina, dansilcadaverina y dinasore produjo una drástica inhibición en la multiplicación de ambos serotipos virales, mientras que no se produjo inhibición en presencia de nistatina o metil- β -ciclodextrina (Figura 25 A).

Asimismo, se evaluó el efecto de los inhibidores químicos sobre la internalización de partículas de DENV-1 y DENV-2 por inmunofluorescencia indirecta. El tratamiento con clorpromazina y dinasore redujo marcadamente la incorporación de partículas de DENV-1 y DENV-2 a células A549, mientras que el pretratamiento con nistatina no tuvo efecto sobre la internalización viral. (Figura 25 B).

Estos resultados indican que la entrada de DENV-1 y DENV-2 en células A549 ocurre por una endocitosis pH dependiente mediada por clatrina y, en consecuencia, difiere del mecanismo de entrada seguido por DENV-2 en células Vero (Figuras 11 y 12). Por lo tanto, hay factores celulares funcionales que pueden determinar vías alternativas de entrada para producir una infección exitosa con el mismo inóculo de DENV en diferentes tipos de células de vertebrado.

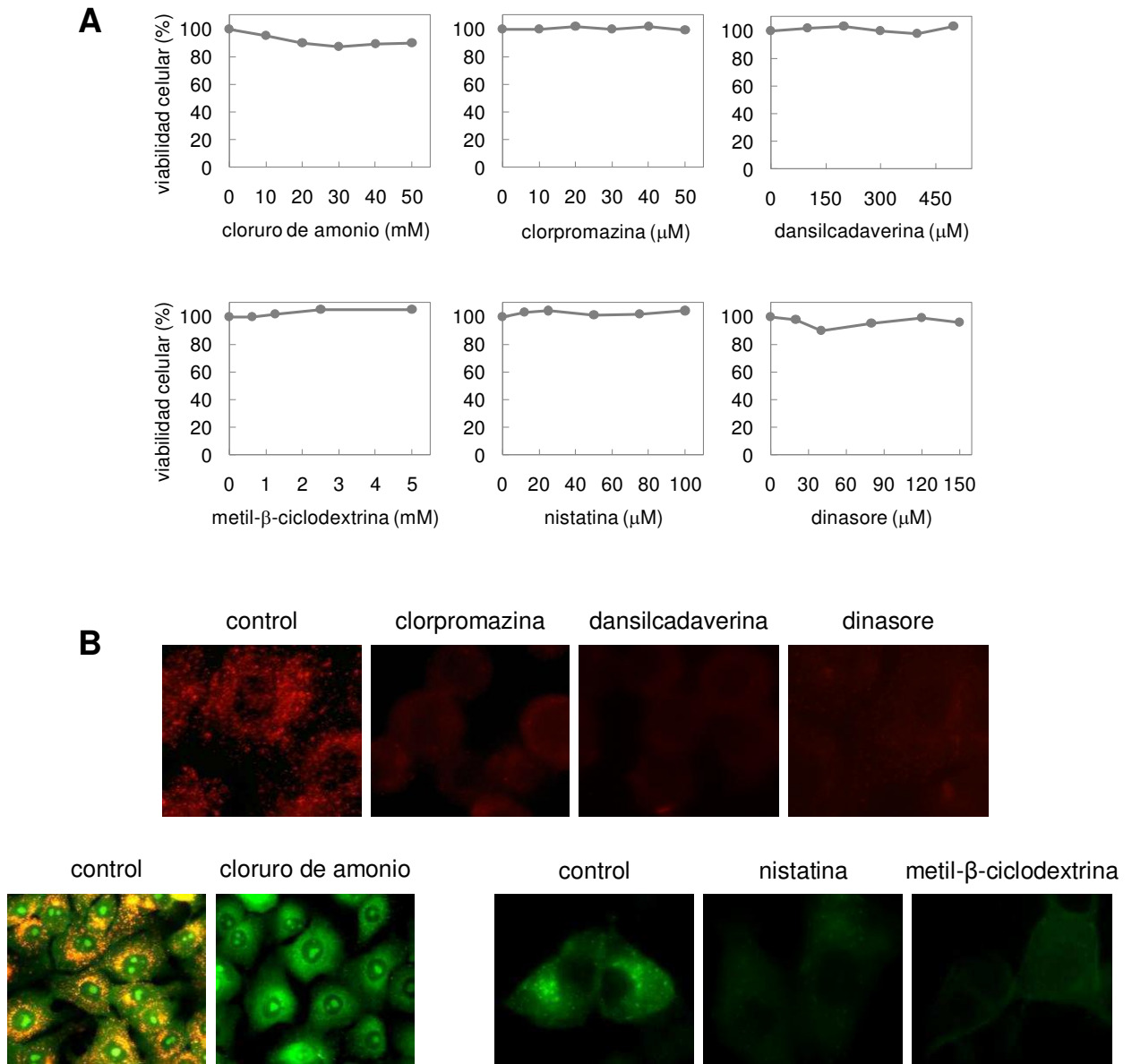


Figura 24. Efecto de inhibidores químicos de distintas vías endocíticas sobre la viabilidad celular y los procesos endocíticos en la línea A549. **A.** Cultivos de células A549 fueron tratados con concentraciones crecientes de las distintas drogas y luego fueron incubados con una solución de MTT. Al cabo de 2 h de incubación se cuantificó la cantidad de cristales de formazán producidos y se calculó la viabilidad celular con respecto a un cultivo sin tratar con los compuestos. **B.** Cultivos de células A549 fueron tratados con clorpromazina (50 μM), dansilcadaverina (500 μM), dinasore (150 μM), cloruro de amonio (50 mM), nistatina (100 μM) o metil-β-ciclodextrina (5 mM). A continuación los cultivos se incubaron con transferrina-TRITC, toxina colérica-FITC o se realizaron tinciones con naranja de acridina y se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia.

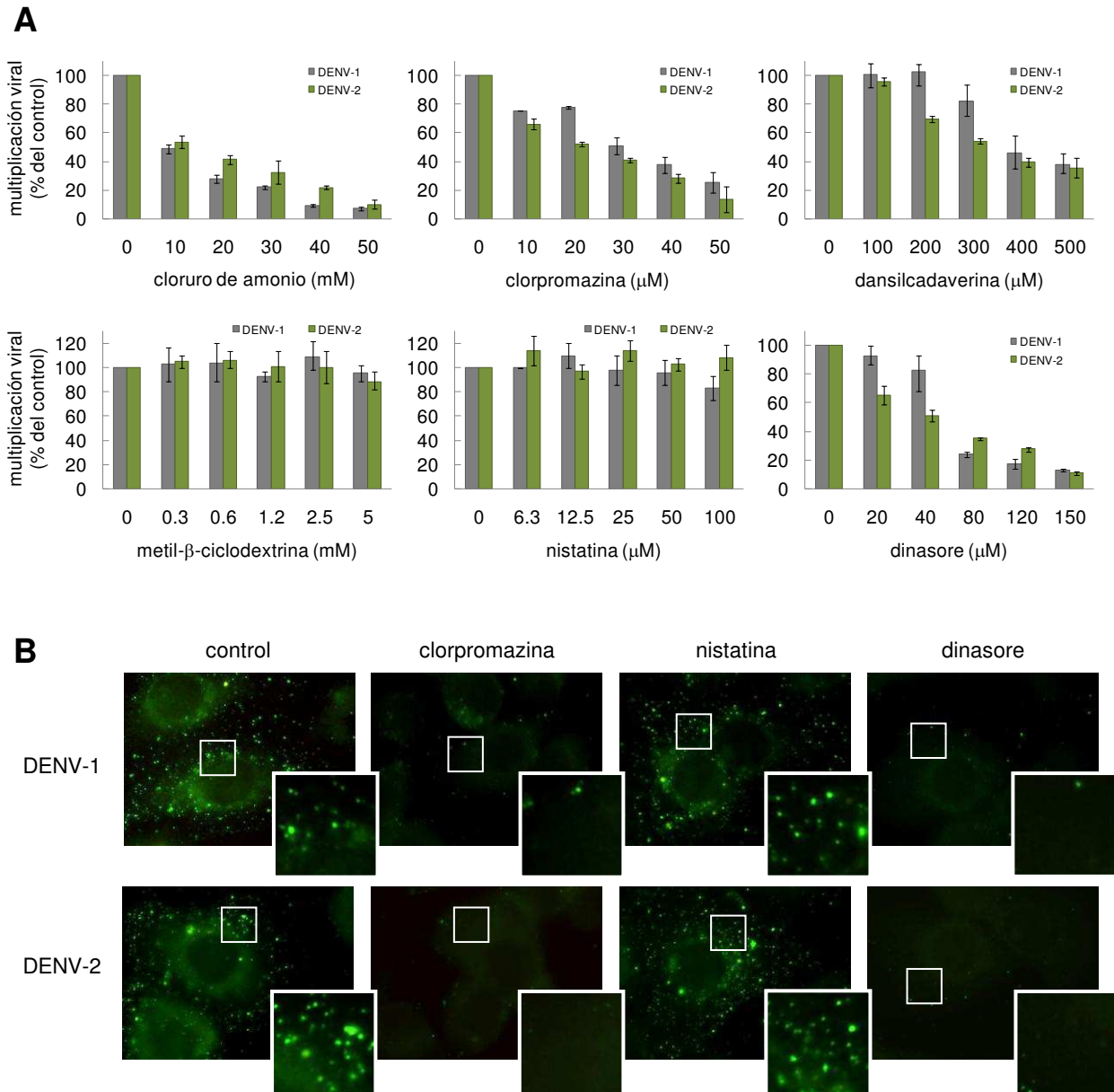


Figura 25. Efecto de inhibidores químicos de distintas vías endocíticas frente a la multiplicación de DENV-1 y DENV-2 en células A549. **A.** Cultivos de células A549 fueron tratados con concentraciones crecientes de cada droga y luego fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 h de internalización en presencia o ausencia de los compuestos se cubrieron los cultivos con MM y se cuantificó la producción viral por el método de formación de placas a las 48 h p.i. **B.** Cultivos celulares fueron incubados con clorpromazina (50 μ M), nistatina (100 μ M) o dinasore (150 μ M) y luego fueron infectados con DENV-1 o DENV-2 a una m.i. de 10 UFP/célula en presencia o ausencia de las drogas. Luego de 30 min. los cultivos fueron fijados y procesados para detectar la glicoproteína de envoltura viral. En A los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

CAPITULO II: La entrada de DENV a células de insecto

II. La entrada de DENV-2 a células de mosquito C6/36 HT

Una vez establecido el proceso de entrada de DENV en cultivos de células de mamífero el siguiente paso fue ampliar nuestra investigación al estudio del proceso de entrada en células de mosquito derivadas de la especie *Aedes Albopictus*, uno de los hospedadores naturales de DENV y vector para la transmisión del virus al ser humano.

II. 1. Cinética de internalización de DENV-2

De manera similar al análisis realizado en células Vero, el primer paso de nuestra investigación sobre la entrada de DENV-2 (cepa NGC) en cultivos de células de mosquito C6/36 HT consistió en establecer los tiempos óptimos para el trabajo con inhibidores químicos de las distintas vías endocíticas. Para ello se estudió la cinética de internalización viral por medio de un ensayo de centros infecciosos y se determinó el porcentaje de partículas virales internalizadas a distintos tiempos calculando la relación entre el número de placas en cultivos tratados con proteinasa K y cultivos sin tratar con la enzima. El perfil cinético observado para este virus en células de mosquito (Figura 26) fue muy similar al observado en células Vero (Figura 8), alcanzando porcentajes de partículas infectivas internalizadas del 84-98 % entre los 60 y 90 min de iniciado el proceso de internalización (Figura 26). Por lo tanto, al igual que en células Vero, el tratamiento con inhibidores químicos en células C6/36 HT se realizó durante los

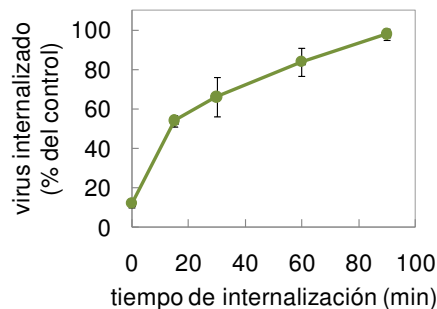


Figura 26. Cinética de internalización de DENV-2 en células de mosquito. Cultivos de células C6/36 HT fueron infectados con DENV-2 a 4 °C y luego fueron transferidos a 33 °C para dar inicio a la internalización viral. A diferentes tiempos luego del cambio de temperatura se inactivó el virus extracelular con proteinasa K. Los resultados se expresan como el porcentaje de virus internalizado con respecto a un control en el que se sustituyó la proteinasa K con PBS.

un mecanismo de endocitosis dependiente de pH ácido (Figuras 10 y 25). Por lo tanto, se decidió corroborar las observaciones de Hase y colaboradores, por medio de un análisis bioquímico.

En primer lugar se estudió el efecto citotóxico del compuesto lisosomotrópico cloruro de amonio sobre la viabilidad de cultivos de células C6/36 HT por el método del MTT (Figura 27 A) y luego se verificó que en el rango de concentraciones elegidas, el compuesto estuviera ejerciendo su efecto basificador del pH endosomal. De manera similar a lo observado en células Vero, en células C6/36 HT los compartimentos ácidos fueron teñidos de color naranja intenso por acumulación de la naranja de acridina, mientras que en los cultivos tratados con cloruro de amonio la ausencia de tinción naranja fue total (Figura 27 B). El efecto de esta base débil sobre los pasos iniciales de la infección viral se analizó por medio de un ensayo de inhibición del rendimiento viral. Cultivos de células C6/36 HT fueron pretratados con concentraciones crecientes de cloruro de amonio y luego fueron infectados con DENV-2 en presencia del compuesto. Luego de 1 h de infección se retiraron los inóculos virales y se cubrieron los cultivos con MM. A las 48 h p.i. se cuantificó la producción viral por el método de formación de placas en monocapas de células Vero. La presencia de cloruro de amonio tuvo un marcado efecto inhibitorio sobre la multiplicación de DENV-2 en todo el rango de concentraciones ensayadas, alcanzando una inhibición de aproximadamente el 84 % entre las concentraciones 30 mM y 50 mM (Figura 27 C). Por otra parte, se verificó la acción inhibitoria de esta droga sobre los momentos iniciales del ciclo de replicación por medio de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta en cultivos infectados y fijados a las 48 h p.i. El tratamiento con cloruro de amonio durante la primera hora de infección redujo marcadamente la multiplicación de DENV-2, provocando una reducción del 95 % en el número de células infectadas, mientras que no tuvo efecto cuando fue adicionado luego de 1 h p.i. (Figura 27 D).

Estos resultados difieren claramente de los reportados por Hase *et al.* (1989) ya que sugieren que la entrada de DENV-2 a células de mosquito tendría lugar por un mecanismo de endocitosis dependiente de pH ácido, similar a lo observado en células de mamífero.

II. 3. Caracterización de la vía endocítica utilizada por DENV-2 para infectar células C6/36 HT

A fin de caracterizar la vía endocítica por la cual DENV-2 es conducido en células C6/36 HT hacia una infección productiva se analizó el efecto sobre la multiplicación viral del panel de inhibidores químicos de las distintas vías endocíticas previamente utilizados en células de mamífero.

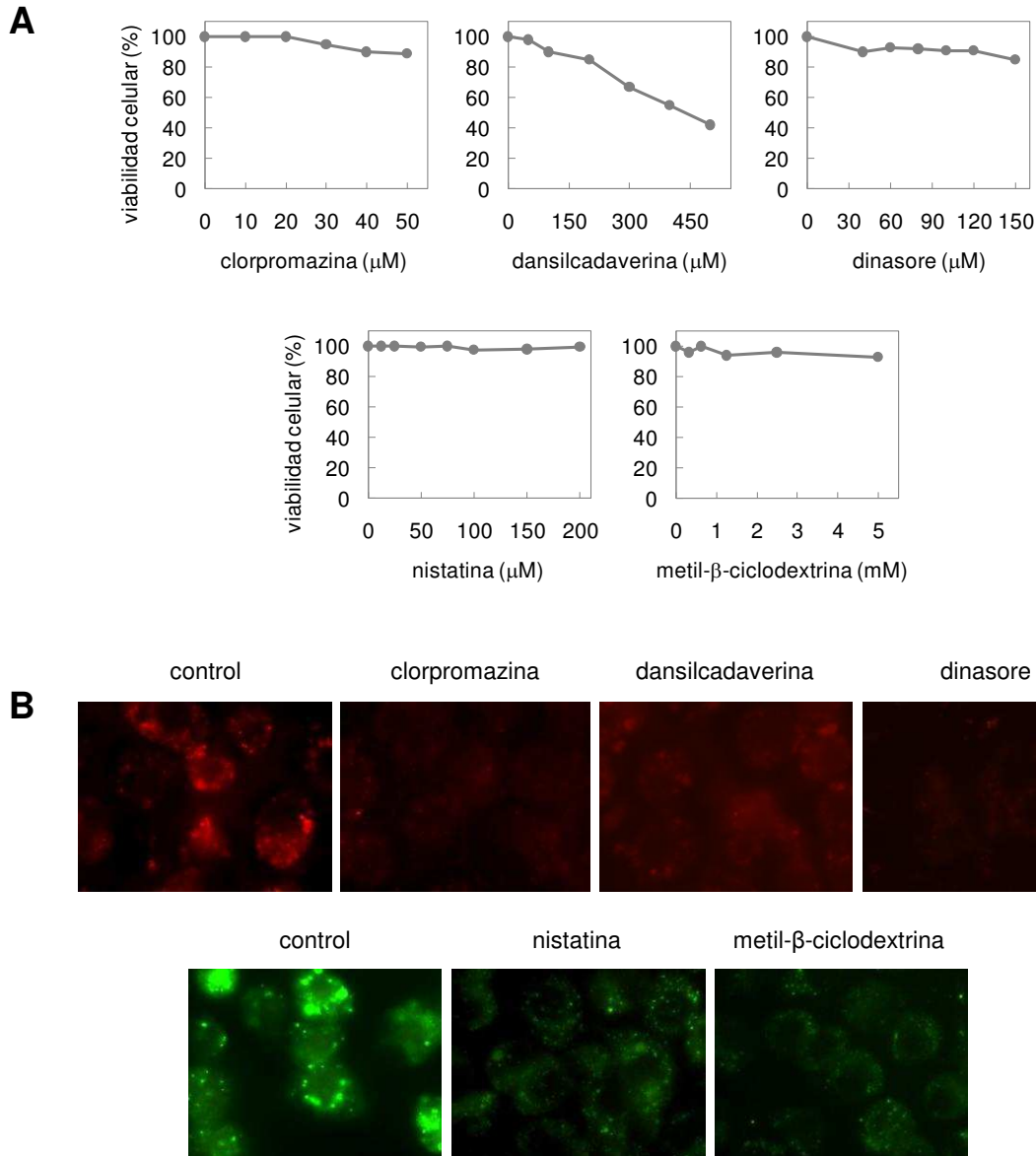


Figura 28. Efecto de inhibidores químicos de distintas vías endocíticas sobre la viabilidad celular y los procesos endocíticos en células de mosquito C6/36 HT. **A.** Cultivos de células C6/36 HT fueron tratados con concentraciones crecientes de las distintas drogas y luego fueron incubados con una solución de MTT. Al cabo de 2 h de incubación se cuantificó la cantidad de cristales de formazán producidos y se calculó la viabilidad celular con respecto a un cultivo sin tratar con los compuestos. **B.** Cultivos celulares fueron tratados con clorpromazina (50 μM), dansilcadaverina (200 μM), dinasore (150 μM), nistatina (200 μM) o metil-β-ciclodextrina (5 mM). A continuación los cultivos se incubaron con transferrina-TRITC o toxina colérica-FITC en presencia (clorpromazina, dansilcadaverina, dinasore) o ausencia (controles, nistatina, metil-β-ciclodextrina) de las drogas, se fijaron y visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia. Aumento: 1000X.

Para ello primeramente se determinó el efecto de los mismos sobre la viabilidad celular por el método del MTT. Los rangos de concentraciones seleccionados para ser utilizados posteriormente en los ensayos de inhibición del rendimiento viral fueron esencialmente los mismos que los evaluados en células de mamífero para la mayoría de los inhibidores, a excepción de dansilcadaverina que demostró ejercer en células de mosquito alto efecto citotóxico en concentraciones mayores a 200 μM y nistatina en cuyo caso, gracias a su escasa actividad citotóxica, fue posible extender el rango de concentraciones hasta 200 μM (Figura 28 A). La acción inhibitoria de estas drogas sobre los procesos endocíticos en las condiciones experimentales a ser utilizadas frente a la infección viral se verificó analizando la internalización de los ligandos controles transferrina y toxina colérica conjugados a fluorocromos. En los cultivos controles la transferrina fue incorporada dando un patrón puntillado citoplasmático característico, similar al que se observa en células de mamífero, debido a su localización en vesículas endocíticas (Figura 28 B, panel superior). Los inhibidores de endocitosis dependiente de clatrina, clorpromazina y dansilcadaverina, y el inhibidor de la proteína celular dinamina, dinasore, impidieron la incorporación del marcador visualizándose el mismo de manera difusa en la superficie de las células. Por otra parte la toxina colérica, marcadora de endocitosis dependiente de *caveolas/lipid-rafts*, fue internalizada en las células controles dando un patrón de fluorescencia perinuclear, debido a su acumulación en retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Figura 28 B, panel inferior). El pretratamiento con las drogas nistatina y metil- β -ciclodextrina, inhibitoras de este tipo de entrada, redujo la incorporación del ligando.

Mediante ensayos de inhibición del rendimiento viral se determinó que la presencia de inhibidores de endocitosis por clatrina afectó la multiplicación del virus en cultivos tratados previamente y durante la primera hora de infección con DENV-2, siendo las máximas inhibiciones alcanzadas del 84 % frente a clorpromazina y del 64 % frente a dansilcadaverina (Figura 29 A, panel superior). De manera similar, el tratamiento con dinasore redujo muy marcadamente la producción viral, presentando valores de inhibición del rendimiento viral del 97 % en la concentración 150 μM (Figura 29 A, panel superior). El pretratamiento de las células con los compuestos metil- β -ciclodextrina y nistatina no ejerció efecto negativo sobre la producción de partículas virales infectivas. De hecho, el pretratamiento con nistatina provocó un aumento en la multiplicación viral siendo la cantidad de virus producido en los cultivos tratados con 100 y 200 μM casi dos veces mayor que en el control sin tratar con el compuesto (Figura 29 A, panel inferior).

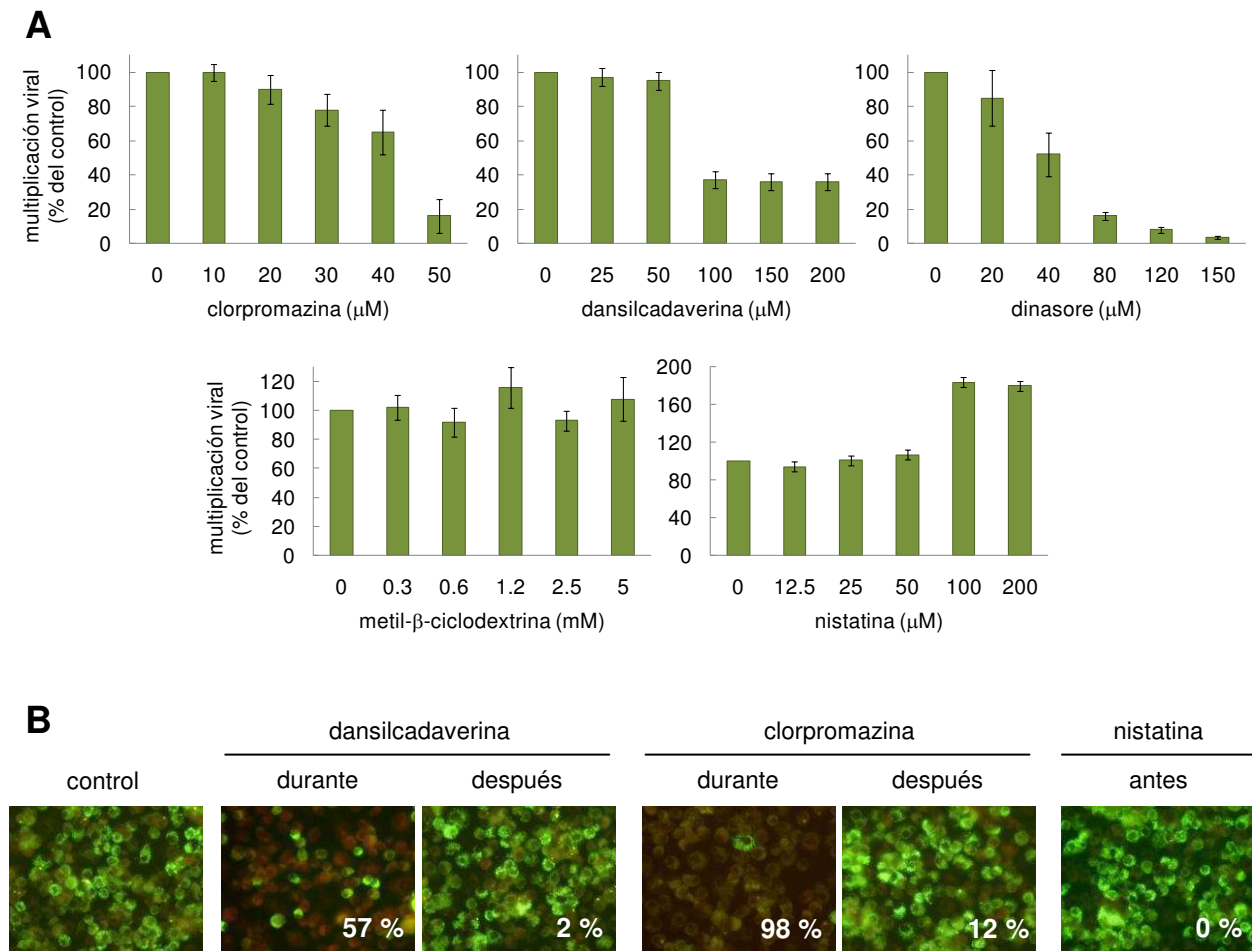


Figura 29. Efecto de inhibidores químicos de distintas vías endocíticas frente a la multiplicación de DENV-2 en células C6/36 HT. **A.** Cultivos de células C6/36 HT fueron tratados con concentraciones crecientes de cada droga y luego fueron infectados con DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 h de internalización en presencia (clorpromazina, dansilcadaverina, dinasore) o ausencia (controles, metil-β-ciclodextrina, nistatina) de los compuestos se cubrieron los cultivos con MM y se cuantificó la producción viral por el método de formación de placas a las 48 h p.i. **B.** Monocapas de células C6/36 HT fueron tratadas con dansilcadaverina 200 μM, clorpromazina 50 μM o nistatina 200 μM y luego infectadas con DENV-2 en presencia de la droga (durante) o alternativamente fueron infectadas y tratadas luego de 1 h p.i. (después). En el caso de nistatina sólo se realizó el tratamiento de los cultivos previamente a la infección (antes). Luego de 48 h p.i. se fijaron los cultivos y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta contra la glicoproteína de envoltura viral. Se realizó un recuento de células infectadas sobre 20 campos seleccionados al azar y se calculó el porcentaje de inhibición de la multiplicación viral con respecto al cultivo control sin tratar (valores insertos). Aumento: 400X. En A los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones ± DE.

Al comparar el porcentaje de células infectadas en cultivos tratados con los inhibidores de endocitosis por clatrina antes y durante el momento de la infección con aquellos tratados luego de 1 h p.i. se verificó que los mismos ejercen efecto inhibitorio únicamente cuando se encuentran presentes durante la primera hora de infección. Los valores de inhibición

alcanzados en cultivos tratados durante la infección fueron del 57 % frente a dansilcadaverina y del 98 % frente a clorpromazina, mientras que en cultivos tratados luego de 1 h p.i. las inhibiciones fueron sólo del 2 % y 12 %, respectivamente (Figura 29 B), demostrando que en células de mosquito estos compuestos no afectan eventos posteriores del ciclo de replicación viral. Como era esperado, el pretratamiento de los cultivos con nistatina no tuvo efecto alguno sobre la multiplicación de DENV-2.

Por lo tanto, estos resultados sugieren fuertemente que la entrada de DENV-2 en cultivos de células de mosquito ocurre por medio de una endocitosis dependiente de vesículas recubiertas de clatrina. A fin de complementar estos resultados el siguiente paso consistió en evaluar el efecto de la expresión del dominante negativo de la proteína Eps15 sobre la internalización viral. Trabajos previos han demostrado, mediante la utilización de la secuencia codificante del gen *eps15* humano, que *eps15* es miembro de una familia de genes altamente conservada durante la evolución (Wong *et al.*, 1998), y que la transfección transiente de células de mosquito con las secuencias de la versión dominante negativa de Eps15 humana, EH29, permite la inhibición de la entrada dependiente de clatrina en esta línea celular (Chu *et al.*, 2006). Con estos antecedentes, cultivos de células C6/36 HT fueron transfectados durante 24 h con las versiones fusionadas a GFP de la proteína Eps15 humana control (DIIIΔ2) o su forma

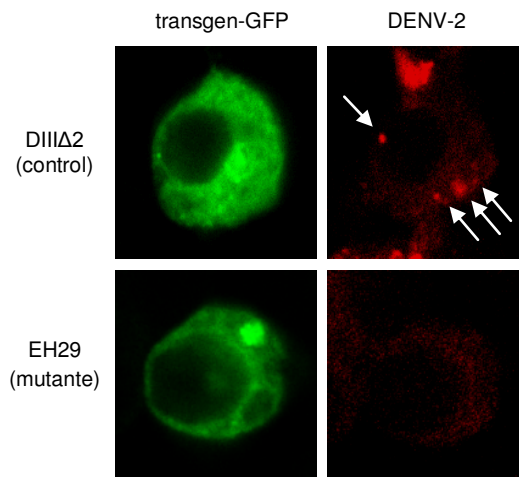


Figura 30. Efecto de un inhibidor molecular de endocitosis por clatrina frente a DENV-2 en células C6/36 HT. Cultivos de células C6/36 HT fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan las versiones fusionadas a GFP del dominante negativo de la proteína celular Eps15 (EH29) o un plásmido control (DIIIΔ2). Luego de 24 h las células fueron infectadas con DENV-2 a una m.i. de 10 UFP/célula. Los cultivos se incubaron a 33 °C durante 1 h y luego se fijaron y procesaron para detectar la glicoproteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta. Las muestras se visualizaron bajo un microscopio confocal.

dominante negativa (EH29) y luego fueron infectados con DENV-2 a una alta m.i. Luego de 1 h de incubación a 33 °C se fijaron los cultivos y procesaron para revelar las partículas virales internalizadas por inmunofluorescencia indirecta. Como era esperado, en los cultivos que expresan la proteína control las partículas virales fueron internalizadas dando el típico patrón de fluorescencia puntillada en el citoplasma celular (Figura 30, flechas), mientras que en las células que expresan la proteína dominante negativa EH29 el virus no fue incorporado dentro de las células (Figura 30), demostrando claramente la necesidad de una endocitosis dependiente de clatrina funcional para la incorporación de partículas de DENV-2 a células de mosquito C6/36 HT.

II. 4. Participación del citoesqueleto

A continuación se analizó la participación del citoesqueleto en la entrada de DENV-2 a células de mosquito, mediante la utilización de los agentes despolimerizantes, citochalcina D y colchicina.

Primeramente se determinó el efecto de estos agentes sobre la viabilidad celular (Figura 31 A) y luego se analizó si estas concentraciones no citotóxicas eran capaces de inducir la despolimerización de microfilamentos y microtúbulos en células de mosquito de la misma manera que lo hacen en células de mamífero. Mediante tinciones con faloidina conjugada a FITC observamos que en células de mosquito el patrón de fibras de actina es muy similar al descrito en células de mamífero, visualizándose en los cultivos controles como manojos de fibras finas distribuidas por todo el citoplasma celular. El tratamiento con citochalcina D indujo la completa despolimerización de las fibras, visualizándose un patrón de fluorescencia difuso distribuido por toda la célula (Figura 31 B). La distribución de microtúbulos se reveló utilizando un anticuerpo reactivo contra tubulina. El típico patrón de túbulos bien definidos que irradian desde la zona perinuclear hacia la membrana plasmática fue totalmente transformado en los cultivos tratados con colchicina dando un patrón de fluorescencia amorfo en todo el citoplasma celular (Figura 31 B).

Una vez establecido un eficiente efecto de estas drogas sobre la integridad del citoesqueleto de células de mosquito se procedió a evaluar su efecto sobre la multiplicación del virus por medio de ensayos de inhibición del rendimiento viral. El tratamiento de los cultivos con citochalcina D redujo la multiplicación de DENV-2 en todo el rango de concentraciones

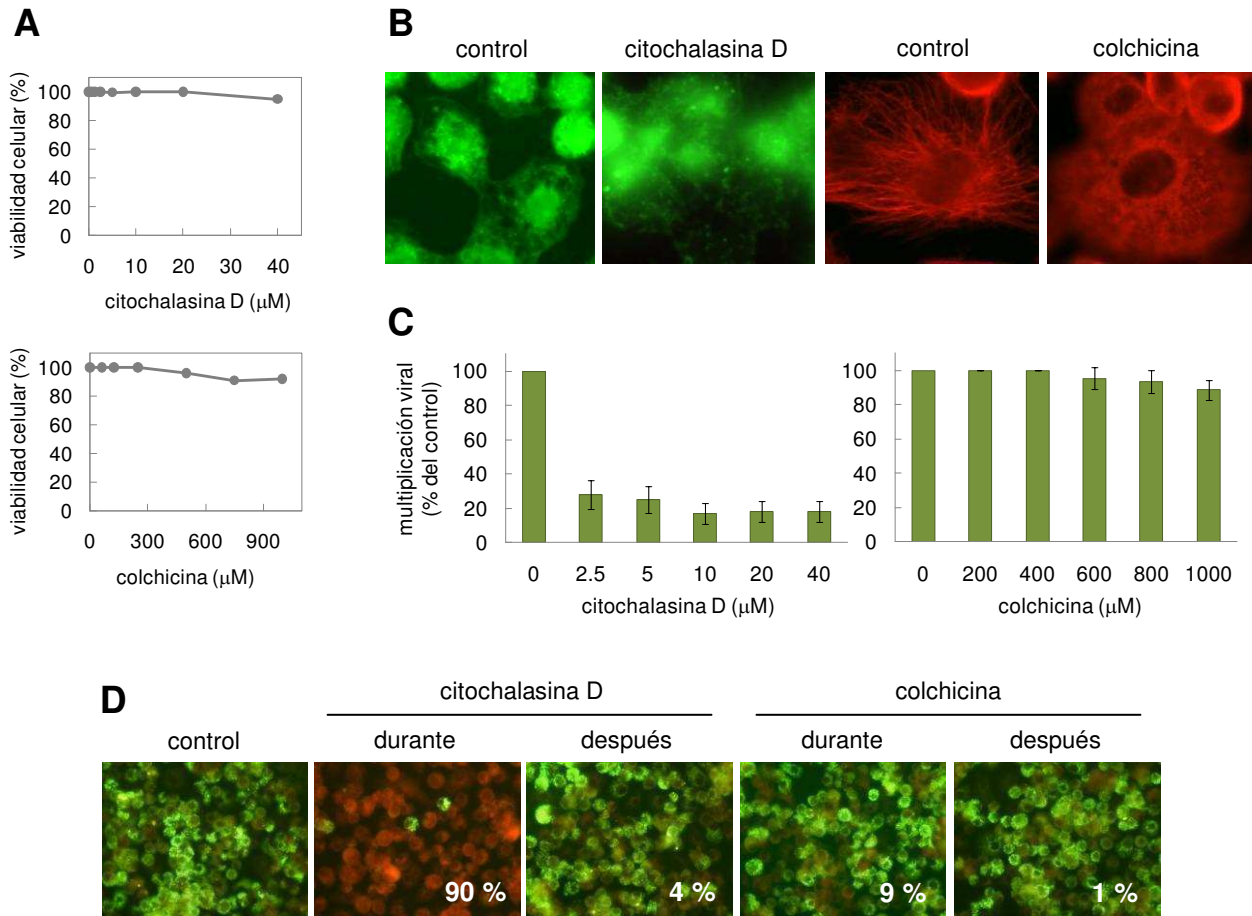


Figura 31. Efecto de agentes despolimerizantes de microfilamentos de actina y microtúbulos frente a DENV-2 en células C6/36 HT. **A.** Células C6/36 HT fueron incubadas con varias concentraciones de citochalasina D o colchicina durante 3 h y luego se determinó la viabilidad celular por el método del MTT **B.** Cultivos celulares fueron tratados o no con citochalasina D 40 μM o colchicina 1000 μM durante 2 h luego fueron fijados e incubados con faloidina-FITC a fin de revelar los microfilamentos de actina o con un anticuerpo dirigido contra la proteína tubulina. Aumento: 1000X. **C.** Cultivos celulares fueron tratados durante 2 h con citochalasina D o colchicina y luego se infectaron con DENV-2 a una m.i. de 0,1 UFP/célula en presencia de las drogas. Luego 1 h se cubrieron las monocapas con MM y se cuantificó la producción viral por el método de formación de placas a las 48 h p.i. **D.** Monocapas de células C6/36 HT fueron tratadas con citochalasina D 40 μM o colchicina 1000 μM y luego infectadas con DENV-2 en presencia de la droga (durante) o alternativamente fueron infectadas y tratadas luego de 1 h p.i. (después). Luego de 48 h se fijaron los cultivos y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta contra la glicoproteína de envoltura viral. Se realizó un recuento de células infectadas sobre 20 campos seleccionados al azar y se calculó el porcentaje de inhibición de la multiplicación viral con respecto al cultivo control sin tratar (valores insertos). Aumento: 400X. En C los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones ± DE.

ensayadas (Figura 31 C) mientras que por el contrario, la despolimerización de los microtúbulos inducida por el tratamiento con colchicina no tuvo efecto sobre la multiplicación de DENV-2 (Figura 31 C). Cabe destacar que la falta de efecto inhibitorio ejercida por colchicina se mantuvo aun cuando el rango de concentraciones se extendió hasta 1000 μM (Figura 31 C),

una dosis no tóxica mucho mayor que la requerida para inducir la completa despolimerización de los microtúbulos observada en la figura 31 B.

Por otra parte, la adición de citochalasin D luego de 1 h p.i. y durante 3 h no tuvo efecto sobre la producción de antígeno viral como se determinó por medio de ensayos de inmunofluorescencia indirecta en cultivos infectados y fijados luego de 48 h (Figura 31 D). Como era esperado, la adición de este compuesto junto con el inóculo viral redujo el porcentaje de células infectadas en un 90 % cuando se compara con el cultivo control (Figura 31 D), corroborando los resultados de inhibición del rendimiento viral y demostrando la necesidad de un citoesqueleto de actina íntegro durante los primeros momentos de la infección con DENV-2 en células de mosquito. El tratamiento de los cultivos con colchicina no tuvo efecto ya sea cuando fue adicionada junto con el virus o luego de 1 h p.i. (Figura 31 D).

Estos resultados indican un requerimiento de microfilamentos de actina intactos en la entrada dependiente de clatrina de DENV-2 a células de mosquito, mientras que la integridad de los microtúbulos no sería necesaria para conducir a una infección productiva.

II. 5. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-2 a células de mosquito

Finalmente, a fin de visualizar la ruta de entrada de DENV-2 a células C6/36 HT, se realizaron estudios de microscopía electrónica. Cultivos celulares fueron infectados con DENV-2 a 4 °C y luego transferidos a 33 °C a fin de sincronizar la internalización. Luego de 25 min de incubación, las células fueron fijadas con glutaraldehído y procesadas para su observación en un microscopio electrónico de transmisión.

Se encontraron partículas virales en el espacio extracelular (Figura 32 A), o adheridas a invaginaciones electrodensas de la membrana plasmática (Figura 32 B), similares a las visualizadas en la entrada de DENV-1 a células Vero (Figura 20) y que concuerdan con las descripciones de invaginaciones de membrana recubiertas de clatrina en células de *A. aegypti* (Roth y Porter, 1964). También se encontraron partículas dentro de vesículas de aproximadamente 120 nm de diámetro (Figura 32 C). En ningún caso se observó fusión directa del virus con la membrana plasmática o nucleocápsides virales desnudas en el citoplasma celular.

La suma de estos resultados indica que a diferencia de lo descrito en trabajos previos (Hase *et al.*, 1989) o de lo que ocurre en células Vero, la entrada de DENV-2 a células de mosquito tiene lugar por endocitosis mediada por receptor en vesículas recubiertas de clatrina.

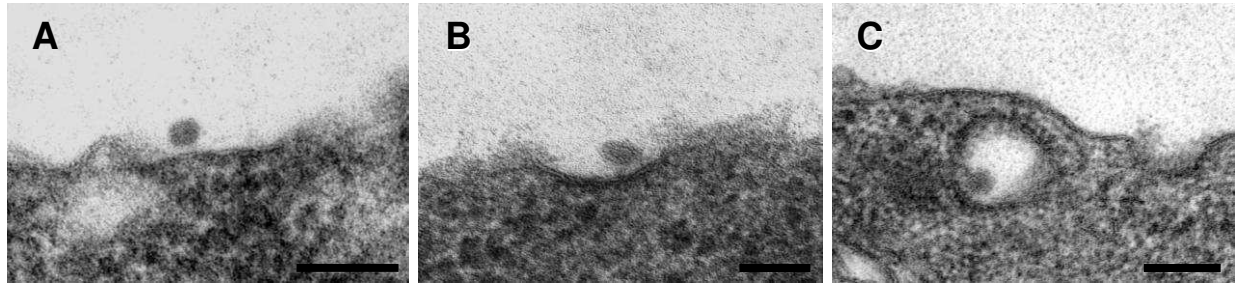


Figura 32. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-2 a células C6/36 HT. Cultivos celulares fueron infectados con DENV-2 durante 1 h a 4 °C y luego fueron transferidos a 33 °C para dar inicio a la internalización viral. Luego de 25 min de incubación las células fueron fijadas y procesadas para su visualización por microscopía electrónica de transmisión. Barra: 100 nm.

II. 6. Extensión del estudio a otro serotipo viral: DENV-1

Dada la diferencia observada en la entrada de DENV-1 y DENV-2 a células Vero nos preguntamos si podrían existir diferencias en el modo de internalización de distintos serotipos de DENV en células de mosquito. Para ello se amplió el estudio analizando la internalización del serotipo DENV-1.

Primeramente se evaluó el efecto de inhibidores farmacológicos de las distintas vías endocíticas reproduciendo las mismas condiciones experimentales que las descritas para DENV-2. El tratamiento de los cultivos con los compuestos cloruro de amonio, clorpromazina, dansilcadaverina y dinasore produjo una notable inhibición de la multiplicación de DENV-1 (Figura 33), indicando que en células C6/36 HT DENV-1 es internalizado por medio de un mecanismo dependiente de pH ácido, clatrina y dinamina. Por su parte, los compuestos metil- β -ciclodextrina y nistatina no ejercieron efecto inhibitorio, sugiriendo que las *caveolas/lipid-rafts* de membrana no serían imprescindibles para la entrada de DENV-1 a esta línea celular (Figura 33).

Los resultados obtenidos a partir del análisis bioquímico fueron confirmados por medio de observaciones en el microscopio electrónico de transmisión. De manera similar a lo

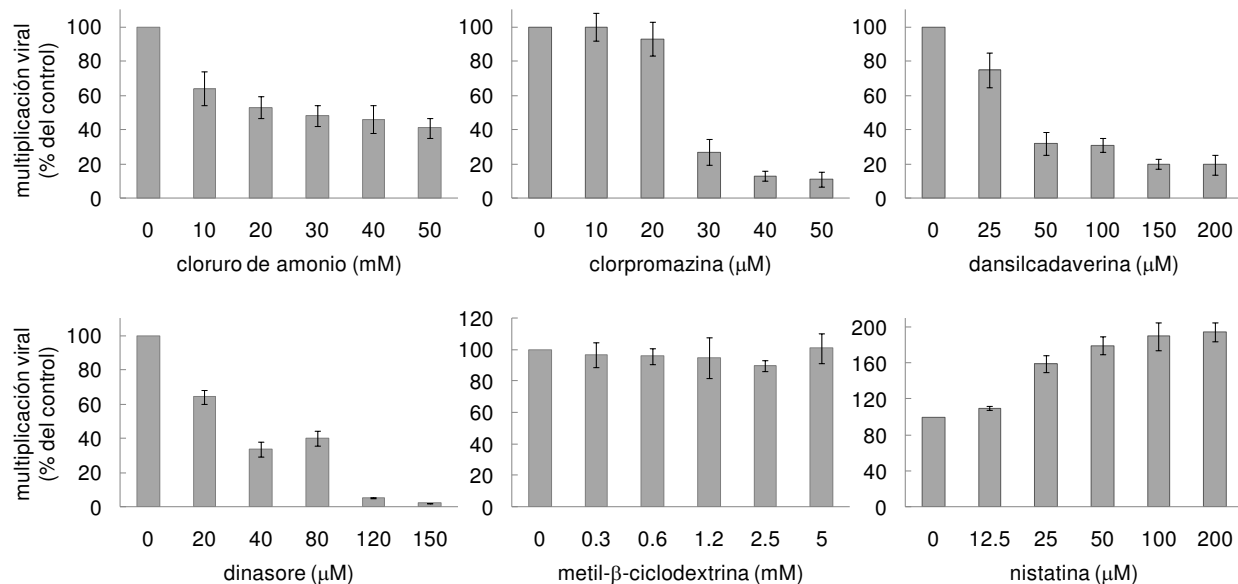


Figura 33. Efecto de inhibidores químicos de distintas vías endocíticas frente a la multiplicación de DENV-1 en células C6/36 HT. Cultivos de células C6/36 HT fueron tratados con concentraciones crecientes de cada droga y luego fueron infectados con DENV-1 a una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de 1 h de internalización en presencia o ausencia de los compuestos se cubrieron los cultivos con MM y se cuantificó la producción viral por el método de formación de placas a las 48 h p.i. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

observado para DENV-2, las partículas de DENV-1 se encontraron en el espacio extracelular asociadas a zonas engrosadas en la membrana plasmática o invaginaciones electrodensas que concuerdan con las descripciones de zonas de la membrana recubiertas de clatrina en su cara citoplasmática (Figura 34 A y B). Asimismo fue posible visualizar partículas virales individuales dentro de vesículas recubiertas (Figura 34 C).

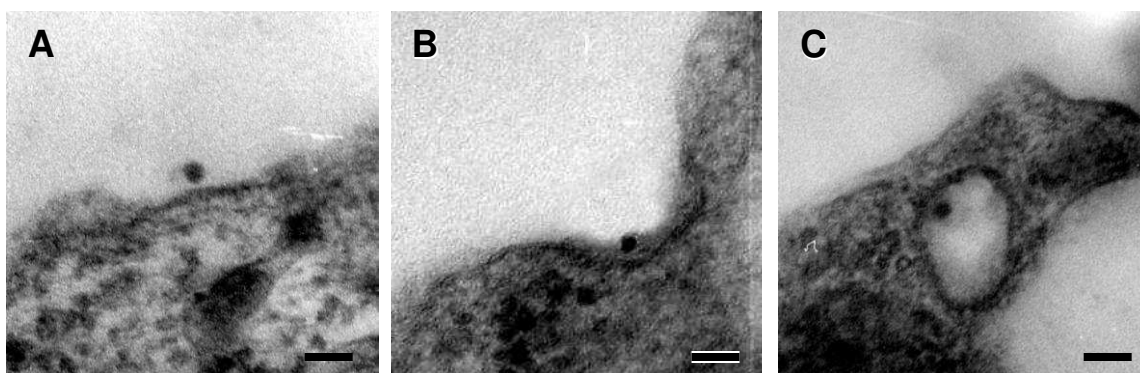


Figura 34. Análisis ultraestructural de la entrada de DENV-1 a células C6/36 HT. Cultivos celulares fueron infectados con DENV-1 durante 1 h a 4 °C y luego fueron transferidos a 33 °C para dar inicio a la internalización viral. Luego de 25 min de incubación las células fueron fijadas y procesadas para su visualización por microscopía electrónica de transmisión. Barra: 100 nm.

Estos resultados demuestran de manera concluyente que los virus DENV-1 y DENV-2 son internalizados en células de mosquito a través de un mecanismo endocítico dependiente de pH ácido en vesículas recubiertas de clatrina.

CAPITULO III: Tránsito intravesicular de DENV en células Vero

III. Transporte intracelular de DENV-1 y DENV-2

Mientras que ha sido ampliamente demostrado que los ligandos internalizados por la vía de clatrina son transportados inicialmente a los endosomas tempranos por un mecanismo dependiente de Rab5 (Lakadamyali *et al.*, 2006) para luego seguir hacia su destino final en la célula, aún no se conoce con certeza la ruta intracelular recorrida por las moléculas internalizadas a través de las vías endocíticas no clásicas.

En el Capítulo I se describió cómo los virus DENV-1 y DENV-2 tienen una entrada infectiva dependiente de pH ácido en células Vero (Figura 10). Esto implica un tránsito del virus en vesículas endosomales hasta el momento en que se dispara la fusión entre la membrana viral y la membrana de la vesícula transportadora. Dado que en este sistema celular DENV-1 y DENV-2 presentan diferente mecanismo endocítico, nos propusimos estudiar a continuación la ruta intracelular recorrida por las partículas virales hasta el momento de su desnudamiento y determinar si las observadas diferencias en la vía endocítica tienen como consecuencia variaciones en la ruta intravesicular utilizada por estos virus.

III. 1. Cinética de fusión de DENV-1 HW, DENV-2 NGC y DENV-2 16681 en células Vero

Luego de ser incorporados en vesículas endocíticas primarias, los virus siguen las mismas rutas intracelulares que aquellas utilizadas por los ligandos fisiológicos y componentes de la membrana plasmática. Típicamente, las moléculas incorporadas desde la superficie celular por endocitosis dependiente de clatrina alcanzan los endosomas tempranos en menos de 2 min, los endosomas tardíos localizados en la región perinuclear en 10-12 min y los lisosomas en 30-60 min luego de iniciada su internalización (Griffiths *et al.*, 1989; Lakadamyali *et al.*, 2006; Mercer *et al.*, 2010). En concordancia se ha descrito que los virus que fusionan en distintos compartimentos a lo largo de su ruta endocítica presentan diferentes cinéticas de fusión, siendo muy rápida en aquellos virus que fusionan en endosomas tempranos, con valores de tiempo medio de fusión de alrededor de 1-5 min. (Johannsdottir *et al.*, 2009; Vonderheit y Helenius, 2005), y algo más lenta para el caso de virus que fusionan en endosomas tardíos, presentando valores medios de fusión de aproximadamente 10-20 min post-internalización (Quirin *et al.*, 2008; Mercer *et al.*, 2010).

A fin de determinar el tiempo transcurrido desde que las partículas de DENV inician su internalización hasta el momento en que se dispara la fusión de membranas inducida por el pH endosomal, se realizó un ensayo de susceptibilidad a cloruro de amonio. Monocapas celulares fueron infectadas a 4 °C con 100-200 UFP por cavidad de DENV-1 cepa HW o DENV-2 cepas NGC o 16681 y luego fueron lavadas con PBS frío para eliminar el virus no adsorbido. Inmediatamente después se cubrieron las células con MM precalentado a 37 °C para dar inicio a la internalización viral. Los cultivos se incubaron a 37 °C y a distintos tiempos luego del cambio de temperatura se indujo una elevación instantánea del pH endosomal con el agregado de cloruro de amonio en una concentración final de 50 mM. La presencia del cloruro de amonio se mantuvo en los cultivos hasta las 3 h luego de iniciada la internalización. Transcurrido este tiempo se eliminó cualquier partícula viral que pudiera permanecer en el espacio extracelular por tratamiento con buffer citrato y se cubrieron las monocapas con medio de plaqueo. Al cabo de 6 o 7 días p.i., dependiendo del serotipo viral, se fijaron las células y se realizó el recuento de UFP que fueron capaces de internalizarse y fusionar en cada tiempo de tratamiento. Como se observa en la figura 35, los tres virus presentaron los mismos perfiles cinéticos de susceptibilidad. La gran mayoría de las partículas virales (80-90 %) alcanzaron su punto de activación pH-dependiente dentro de los primeros 30 min de internalización. La fusión viral se inició a los 5 min y alcanzó su valor medio entre los 14-16 min post-internalización (Figura 35,

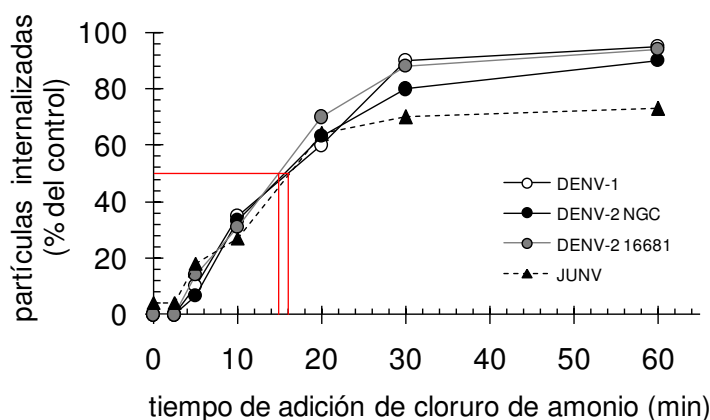


Figura 35. Cinética de fusión de DENV-1 HW, DENV-2 NGC y DENV-2 16681 en células Vero. Monocapas de células Vero fueron infectadas con 100-150 UFP de DENV-1 (HW), DENV-2 (NGC o 16681) o JUNV a 4 °C. Luego se dio inicio a la internalización viral con el agregado de medio de cultivo precalentado a 37 °C. A diferentes tiempos de incubación a 37 °C se adicionó cloruro de amonio en una concentración final de 50 mM. Las monocapas celulares se incubaron durante 3 hs en presencia del compuesto y luego se inactivaron las partículas virales extracelulares con buffer citrato. Luego de tres lavados con PBS los cultivos se cubrieron con medio de plaqueo y se fijaron las células a los 6 o 7 días post-infección.

líneas rojas). Como punto de referencia incluimos en nuestro experimento al virus Junín (JUNV), un virus cuya penetración ocurre en los endosomas tardíos (Castilla *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 2009). Los valores de tiempo medio presentados por DENV y JUNV fueron casi idénticos entre sí, asemejándose a los exhibidos por otros virus que fusionan en endosomas tardíos (Quirin *et al.*, 2008). Llamativamente, estos tiempos medios de fusión se acercan a los descritos por van der Schaar *et al.* (2007; 2008) para DENV-2 PR159 S1, una cepa que en células BS-C-1 fusiona en endosomas tardíos con un tiempo promedio de 10-13 min post-internalización.

Se ha descrito para otros virus, como Semliki Forest o VSV, que durante el evento de fusión entre la membrana viral y endosomal el genoma del virus es liberado al citoplasma celular junto con la proteína de la cápside, mientras que las proteínas de envoltura permanecen asociadas a la membrana del endosoma. Eventualmente estos endosomas evolucionan a endolisosomas en donde ocurre la degradación proteolítica de las proteínas de envoltura y de las partículas virales que no lograron una fusión exitosa (Singh y Helenius, 1992; Johannsdottir *et al.*, 2009). A fin de analizar si el mismo curso de eventos tiene lugar durante la internalización de DENV, células Vero fueron infectadas con DENV-2 NGC a 4 °C y luego fueron transferidas a 37 °C. A diferentes tiempos los cultivos fueron fijados y procesados para revelar la distribución de las proteínas de cápside y envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta.

Como puede observarse en la Figura 36, a los 5 min post-internalización las células presentaron un patrón de fluorescencia puntillado muy numeroso distribuido en todo el citoplasma celular, indicativo de la incorporación de partículas virales en compartimentos endosomales. En concordancia con la cinética de fusión exhibida por DENV (Figura 35) entre los 10 y 15 min de iniciada la internalización comenzó a verse una reducción en la cantidad de puntos fluorescentes de proteína de cápside, los cuales fueron localizándose gradualmente hacia la zona perinuclear para prácticamente desaparecer a partir de los 30 min. Por otra parte, la cantidad e intensidad de puntos fluorescentes de la glicoproteína E se mantuvo relativamente constante entre los 5 y 45 min post-internalización, encontrándose la proteína cada vez más distribuida en la región perinuclear hasta finalmente comenzar a desaparecer a partir de los 90 min (Figura 36). Este cambio de patrón diferencial entre las proteínas de cápside y envoltura viral sugieren que una vez iniciado el evento de fusión las proteínas de la cápside son liberadas al citoplasma celular (proceso que se completaría alrededor de los 30 min), mientras que las proteínas de envoltura permanecerían asociadas a las membranas endosomales hasta

finalmente ser degradadas, posiblemente en endolisosomas (proceso que se completaría alrededor de los 120 min post-infección).

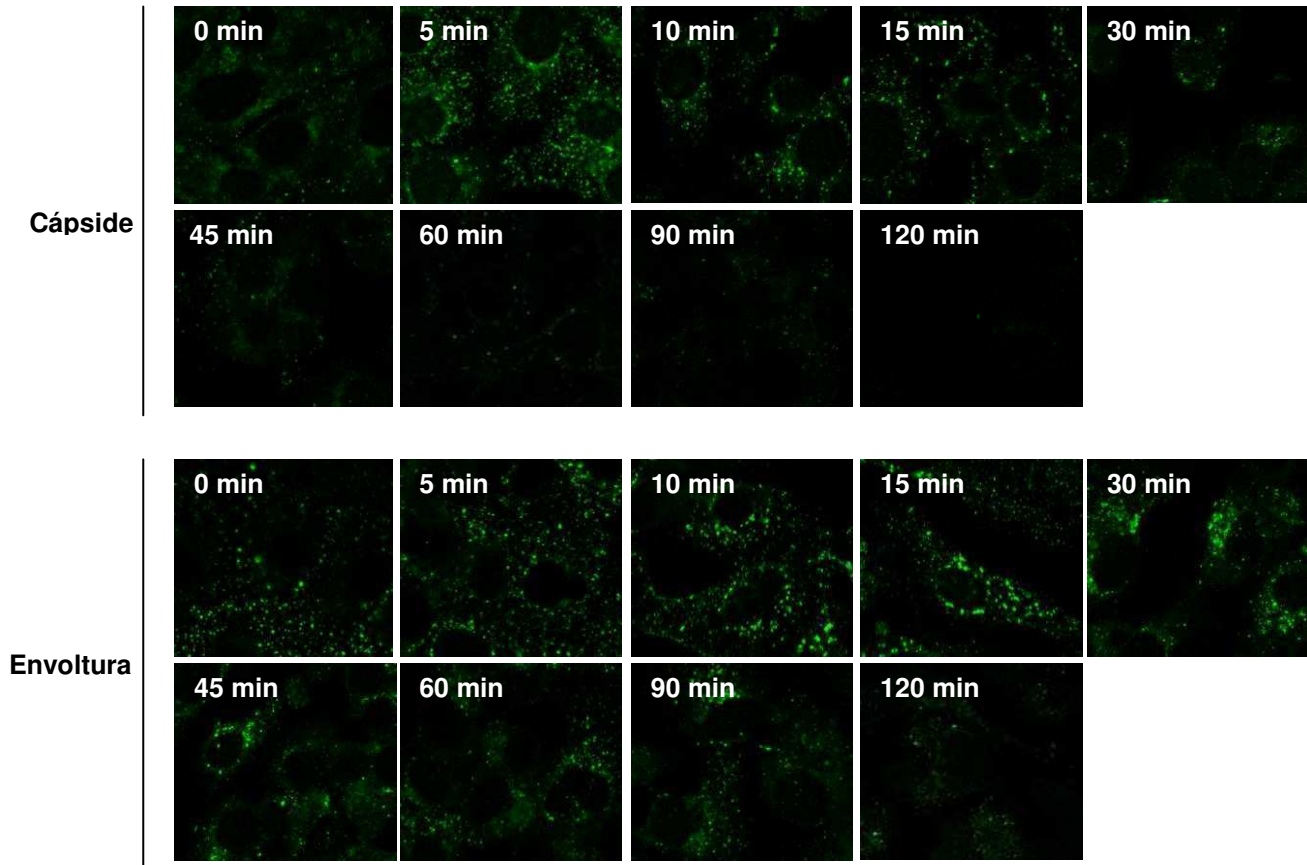


Figura 36. Patrón de distribución de las proteínas de cápside y envoltura de DENV-2 en función del tiempo. Cultivos de células Vero fueron infectados con DENV-2 NGC a 4 °C a una m.i. de 10 UFP/célula. A continuación se transfirieron los cultivos a 37 °C y a distintos tiempos luego del cambio de temperatura se fijaron las células con metanol. Las proteínas de cápside y envoltura se revelaron por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Las muestras se observaron bajo un microscopio confocal.

III. 2. Participación de Rab GTPasas en el tráfico intravesicular de DENV

La especificidad de las proteínas Rab como reguladores de distintos pasos a lo largo de la vía endocítica las ha convertido en herramientas sumamente útiles para el estudio de los requerimientos de transporte intracelular de numerosos virus. Por lo tanto, nuestro siguiente paso consistió en determinar la vía intracelular recorrida por DENV en células Vero a través del análisis del requerimiento funcional de distintas Rab GTPasas.

III. 2. a. Transporte de DENV desde la membrana plasmática hacia endosomas tempranos: Rol de Rab5

En primer lugar, a fin de corroborar el requerimiento del transporte de las partículas virales desde la membrana plasmática hasta los endosomas tempranos se evaluó el efecto de la forma dominante negativa de la proteína Rab5. Células Vero se transfectaron con los plásmidos conteniendo las versiones fusionadas a GFP de Rab5 salvaje, Rab5 wt, y una

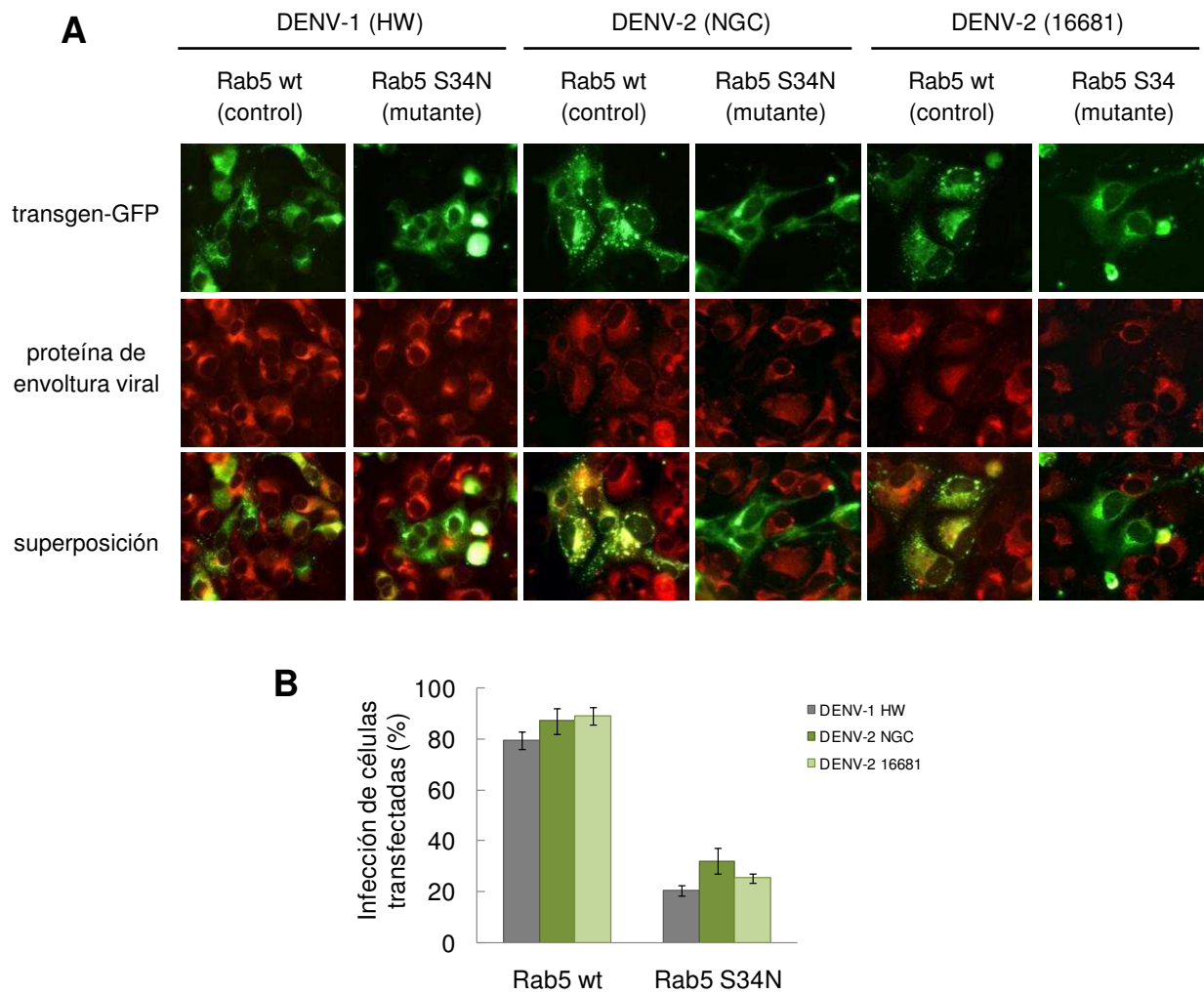


Figura 37. Efecto de la expresión de las versiones salvaje y dominante negativa de Rab5 frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Cultivos de células Vero fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan la versión dominante negativa de Rab5 (S34N) o un plásmido que codifica para la proteína salvaje (wt) fusionadas a GFP. Luego de 24 h las células fueron infectadas con DENV-1 (HW) o DENV-2 (NGC o 16681) a una m.i. de 1 UFP/célula y al cabo de 24 h de infección los cultivos se fijaron y procesaron para detectar la glicoproteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta. **B.** A partir de las muestras del punto A se realizó un recuento de células infectadas sobre 250 células transfectadas y se determinó el porcentaje de infección. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

mutante dominante negativa denominada Rab5 S34N que posee afinidad preferencial por GDP. A las 24 h post-transfección, las células se infectaron con DENV-1 HW o DENV-2 NGC o 16681 y luego de 24 h de infección se fijaron y analizaron para detectar la autofluorescencia de GFP y la producción de antígeno viral por inmunofluorescencia indirecta. La expresión de la forma mutante de Rab5 produjo una marcada inhibición en la multiplicación de DENV-1 y ambas cepas de DENV-2 (Figura 37 A) reduciendo el número de células infectadas en un 74 %, 63 % y 72 % frente a DENV-1, DENV-2 NGC y DENV-2 16681 respectivamente, cuando se compara con el cultivo que expresa la proteína salvaje (Figura 37 B). Este resultado sugiere la necesidad de un Rab5 funcional para que ocurra una infección exitosa.

En este punto consideramos importante tener en cuenta reportes recientes que demuestran que la proteína Rab5 desempeña un rol esencial en la formación de redes membranosas indispensables para la replicación del genoma del flavivirus hepatitis C (Manna *et al.*, 2010; Stone *et al.*, 2007). Al igual que hepatitis C, el genoma de DENV es replicado asociado a estructuras membranosas (Welsch *et al.*, 2009). Si bien aún no se ha descripto un rol de Rab5 en la formación de estas estructuras de membrana para la replicación de DENV quisimos corroborar que efectivamente la inhibición de la multiplicación viral observada frente a

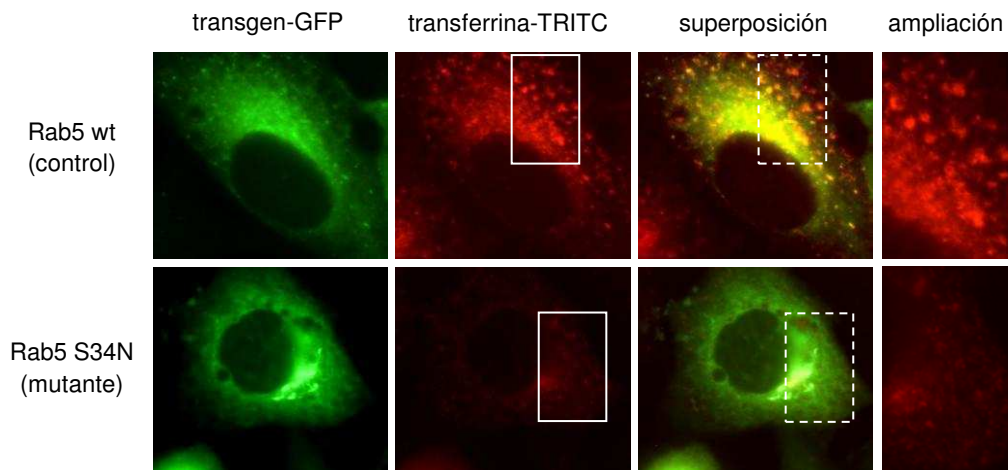


Figura 38. Efecto de la expresión de las versiones salvaje y dominante negativa de Rab5 sobre la internalización de transferrina en células Vero. Cultivos de células Vero fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan la versión dominante negativa de Rab5 (S34N) o un plásmido que codifica para la proteína salvaje (wt) fusionadas a GFP. Luego de 24 h las células fueron incubadas con transferrina conjugada a TRITC. Luego de 30 min los cultivos fueron fijados y visualizados bajo un microscopio de fluorescencia. Aumento: 1000 X. En la columna derecha se muestran las ampliaciones del patrón de distribución de la proteína transferrina en las zonas señaladas por los recuadros.

Rab5 S34N (Figura 37) era debida a un bloqueo en el proceso de entrada del virus y no a un paso posterior en su ciclo de replicación.

Se encuentra bien documentado que la expresión de Rab5 S34N en cultivos de células HeLa y BHK induce la formación de vesículas endosomales pequeñas en el citoplasma celular y reduce la capacidad de internalización de transferrina desde la membrana plasmática (Stenmark *et al.*, 1994). Corroboramos este efecto en células Vero luego de incubar con transferrina-TRITC cultivos transfectados durante 24 h con Rab5 salvaje y mutante. La expresión de Rab5 S34N redujo la acumulación de transferrina, evidenciándose menor intensidad de fluorescencia en el citoplasma celular y visualizándose de manera difusa o en

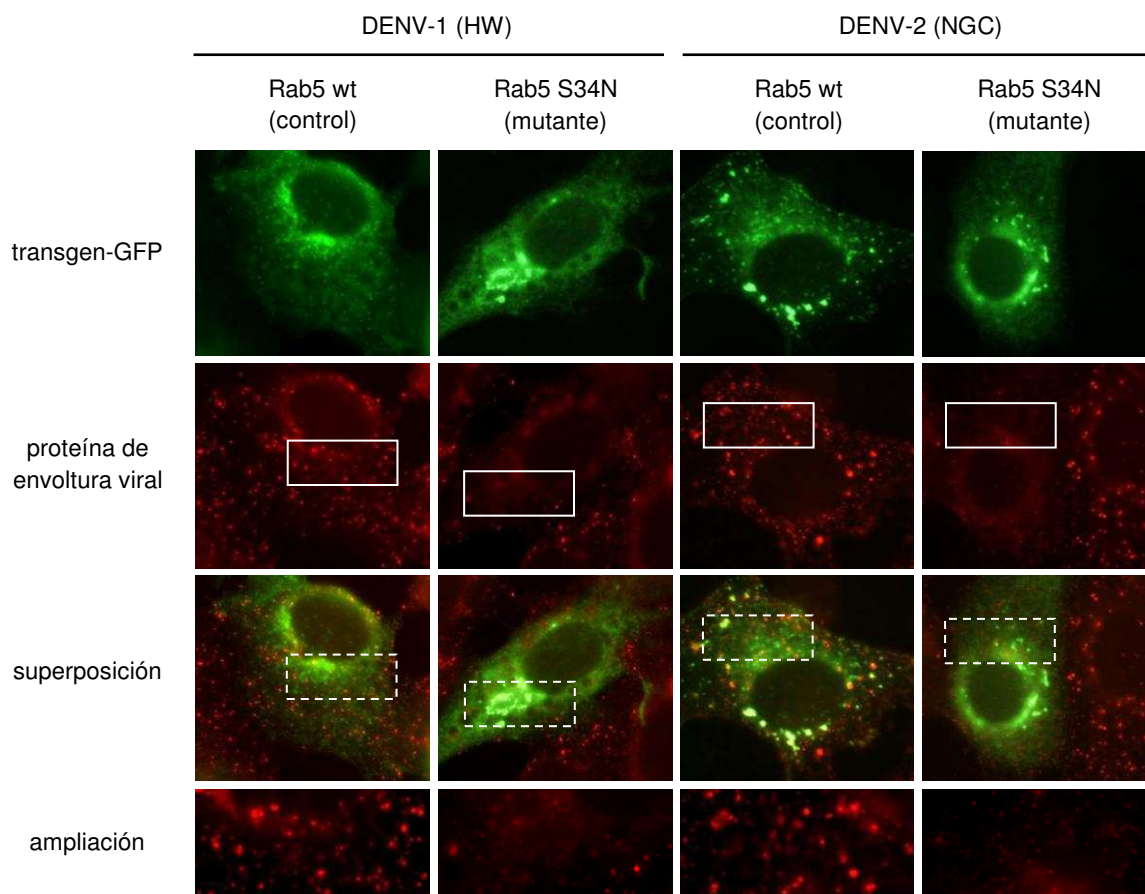


Figura 39. Efecto de la expresión de las versiones salvaje y dominante negativa de Rab5 frente a la internalización de DENV-1 y DENV-2 en células Vero. Cultivos de células Vero fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan la versión dominante negativa de Rab5 (S34N) o un plásmido que codifica para la proteína salvaje (wt) fusionadas a GFP. Luego de 24 h las células fueron infectadas con DENV-1 (HW) o DENV-2 (NGC) a una m.i. de 10 UFP/célula y al cabo de 1 h de infección los cultivos se fijaron y procesaron para detectar la glicoproteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta. En la fila inferior se muestran las ampliaciones del patrón de distribución de la glicoproteína de envoltura viral en la zona señalada por los recuadros.

vesículas endocíticas pequeñas (Figura 38). Una vez establecido el efecto de esta proteína mutante sobre la morfología de los endosomas y la internalización de moléculas desde el exterior en células Vero se procedió a evaluar su efecto sobre la incorporación de partículas virales. Cultivos celulares fueron transfectados con Rab5 wt o Rab5 S34N y luego de 24 h fueron infectados con DENV-1 HW o DENV-2 NGC a una alta m.i. Los cultivos fueron incubados a 37 °C y luego de 1 h fueron fijados y procesados para detectar la incorporación de partículas virales por inmunofluorescencia indirecta. En células transfectadas con el plásmido salvaje, las partículas de DENV-1 y DENV-2 fueron internalizadas dentro de vesículas endocíticas, observándose una fluorescencia puntillada intensa en el citoplasma celular (Figura 39, ampliaciones). La expresión de la proteína dominante negativa tuvo un impacto muy importante sobre la internalización viral, visualizándose una fluorescencia difusa de baja intensidad o un puntillado muy pequeño (Figura 39, ampliaciones).

Por lo tanto, estos resultados demuestran el requerimiento del transporte de las partículas de DENV-1 y DENV-2 desde la membrana plasmática hasta los endosomas tempranos para que ocurra una infección productiva.

III. 2. b. Transporte de DENV desde endosomas tempranos hacia endosomas tardíos: Rol de Rab7 y PI 3-K

Dado que el tiempo transcurrido desde que se inicia la internalización viral hasta que ocurre la fusión del promedio de las partículas virales sugiere un transporte hasta un compartimento ubicado posteriormente a los endosomas tempranos, evaluamos a continuación el efecto de la expresión de la forma dominante negativa de la proteína Rab7 sobre la infección con DENV.

Cultivos de células Vero fueron transfectados durante 24 h con las versiones salvaje (Rab7 wt) o mutante dominante negativa (Rab7 N125I) de la proteína Rab7 fusionadas a GFP. Luego se infectó con DENV-1 HW o DENV-2 NGC o 16681 y al cabo de 24 h se fijaron los cultivos y se reveló la expresión de antígeno viral por inmunofluorescencia indirecta.

Como se observa en la figura 40 A, la expresión de la forma mutante de Rab7 tuvo un efecto inhibitorio diferencial frente a DENV, afectando la multiplicación de DENV-2 16681 sin ejercer efecto frente a DENV-1 o DENV-2 NGC. Mediante un recuento de células infectadas sobre un total de 250 células transfectadas en cada cultivo se determinó que la expresión de

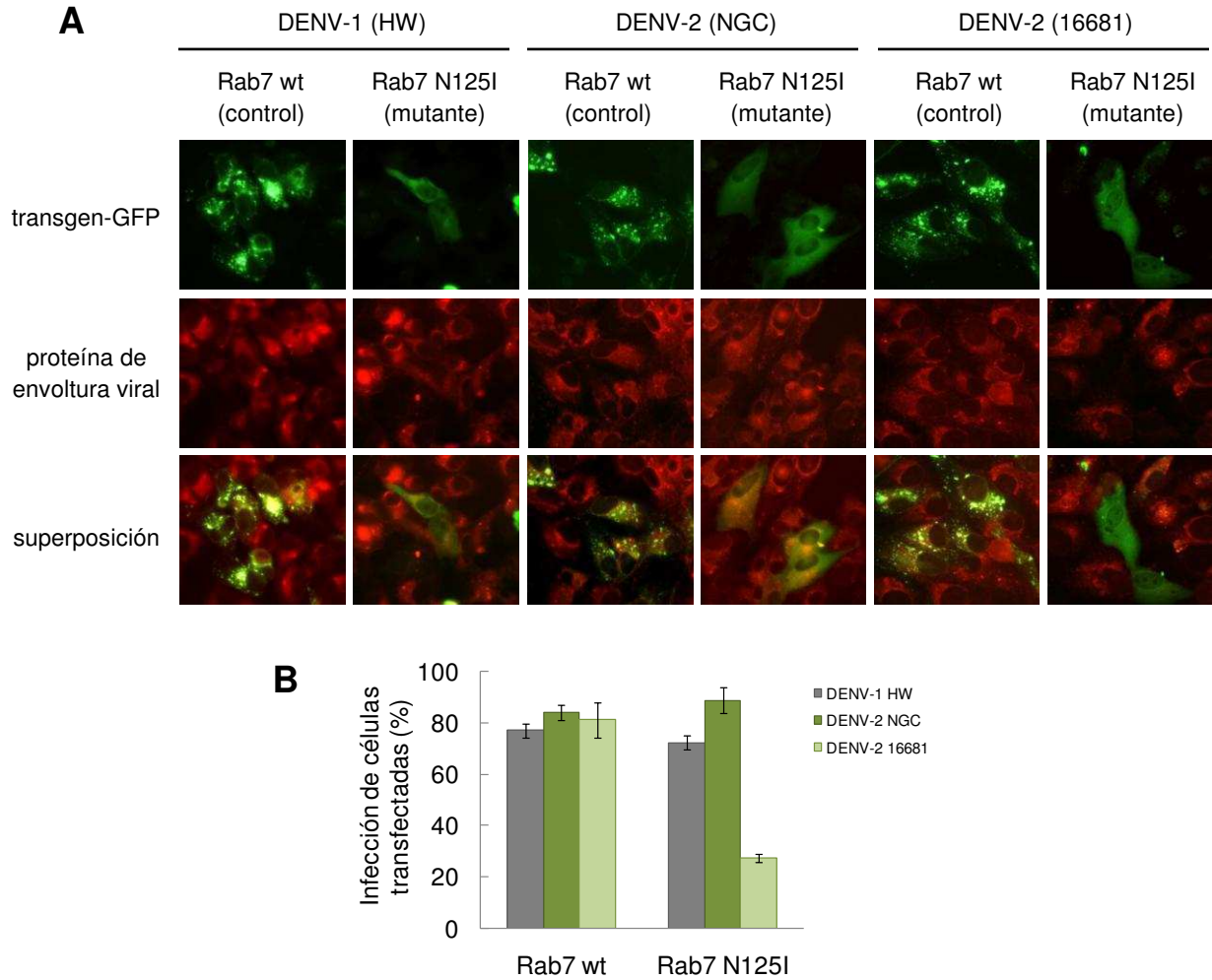


Figura 40. Efecto de la expresión de las versiones salvaje y dominante negativa de Rab7 frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Cultivos de células Vero fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan la versión dominante negativa de Rab7 (N125I) o un plásmido que codifica para la proteína salvaje (wt) fusionadas a GFP. Luego de 24 h las células fueron infectadas con DENV-1 (HW) o DENV-2 (NGC o 16681) a una m.i. de 1 UFP/célula y al cabo de 24 h de infección los cultivos se fijaron y procesaron para detectar la glicoproteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta. **B.** A partir de las muestras del punto A se realizó un recuento de células infectadas sobre 250 células transfectadas y se determinó el porcentaje de infección. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

Rab7 N125I redujo la multiplicación de DENV-2 16681 en un 67 % cuando se lo compara con el cultivo que expresa Rab7 wt (Figura 40 B). Esto indica que el transporte de las partículas de DENV desde endosomas tempranos hacia endosomas tardíos sería un requerimiento exclusivo de DENV-2 16681, mientras que los virus DENV-1 y DENV-2 NGC pueden multiplicar eficientemente aún cuando el transporte mediado por Rab7 se halla bloqueado.

Como se mencionó en la Introducción, los endosomas tempranos se encuentran enriquecidos en PI(3)P, generados mediante el reclutamiento de la enzima fosfoinosítido 3 quinasa (PI 3-K) Vps34p. PI(3)P es indispensable para la formación de las vesículas intraluminales, por lo que la inhibición farmacológica de la actividad de la PI 3-K bloquea la maduración de endosomas tempranos a tardíos (Fernandez-Borja *et al.*, 1999) Se ha observado que el tratamiento con el inhibidor de Vps34p, wortmanina, induce la acumulación del rinovirus humano 2 en endosomas tempranos (Brabec *et al.*, 2006). Por lo tanto, se decidió evaluar si, al igual que Rab7 N125I, el tratamiento de células Vero con wortmanina tenía un efecto diferencial sobre el transporte de DENV-2 NGC y DENV-2 16681. Para ello, cultivos celulares fueron tratados con wortmanina y luego fueron infectados con los virus a alta m.i. Al cabo de 10 min o 60 min de infección a 37 °C se fijaron las células y se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta para revelar el patrón de la proteína de cápside viral.

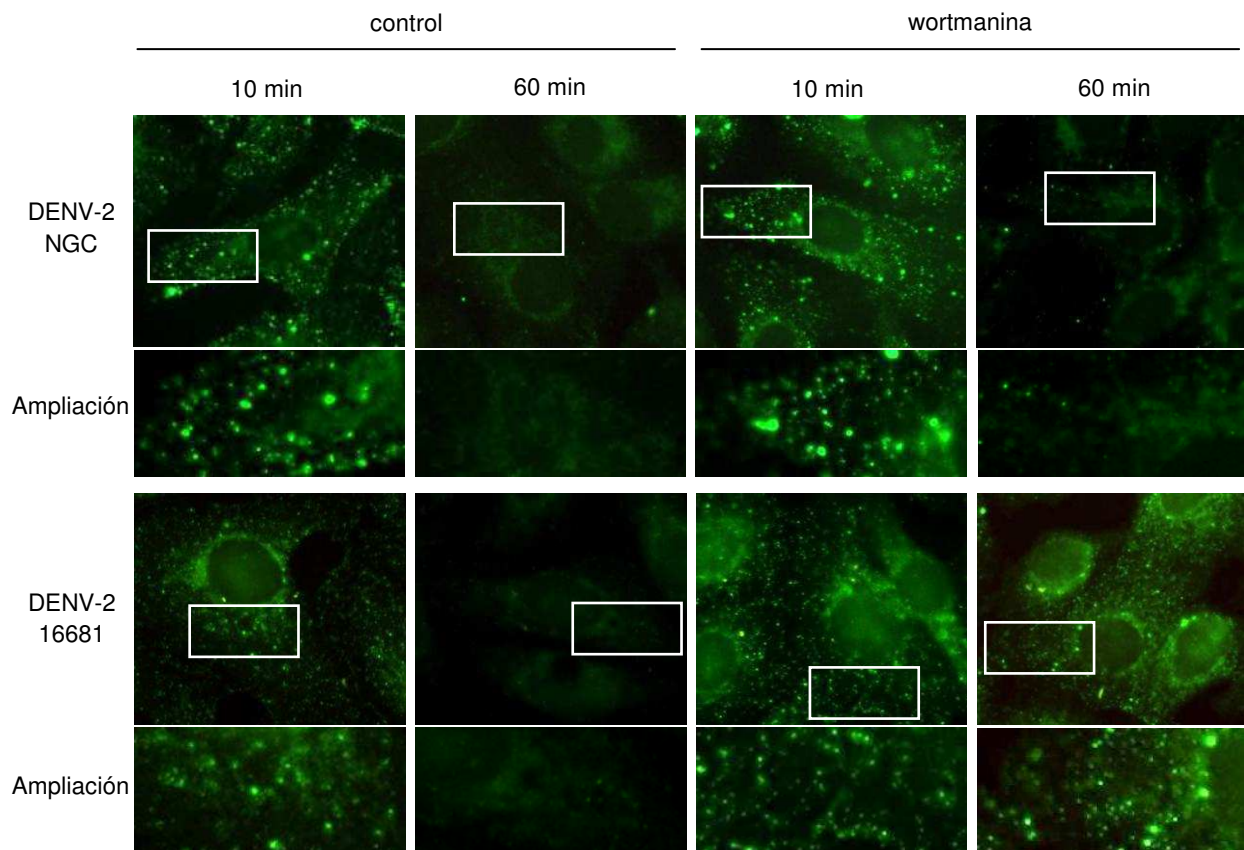


Figura 41. Efecto de wortmanina sobre el transporte de las partículas virales. Cultivos de células Vero fueron tratados o no durante 1 h con wortmanina (100 nM) y luego fueron infectados con DENV-2 NGC o 16681 a una m.i. de 10 UFP/célula. Al cabo de 10 o 60 min de internalización las células fueron fijadas y procesadas para detectar la proteína de cápside viral por inmunofluorescencia indirecta. Aumento: 1000X.

De manera similar a lo observado previamente (Figura 10 D), luego de 10 min de internalización tanto en los cultivos controles como en los cultivos tratados la proteína de cápside de ambos serotipos virales presentó un patrón de fluorescencia puntillado, indicativo de la presencia de las partículas virales en compartimentos endosomales (Figura 41). En concordancia con los ensayos de cinética de fusión (Figuras 35 y 36), luego de 60 min de internalización este patrón de fluorescencia puntillado desapareció por completo en los cultivos controles, debido a que a este tiempo p.i. ya tuvo lugar el desnudamiento del virus (Figura 41). La presencia de wortmanina durante la internalización no tuvo efecto sobre la penetración de DENV-2 NGC, ya que al igual que en el cultivo control, luego de 60 min el patrón de fluorescencia puntillado desapareció por completo (Figura 41, panel superior). Sin embargo, a este tiempo aún puede observarse el patrón de fluorescencia puntillado de las partículas de DENV-2 16681 (Figura 41, panel inferior), demostrando que el bloqueo en la maduración de endosomas tempranos a tardíos afecta el transporte de este virus hasta su sitio de fusión.

III. 2. c. Transporte de DENV a través de la vía de reciclaje lenta: Rol de Rab22 y Rab11

La falta de efecto inhibitorio de Rab7 N125I frente a DENV-1 HW y DENV-2 NGC indica que estos virus no serían transportados hasta los endosomas tardíos. Sin embargo, el perfil cinético de fusión viral (Figura 35) sugiere que los mismos escapan tardíamente al citoplasma celular. Por este motivo, se planteó la posibilidad que las partículas de DENV-1 HW y DENV-2 NGC fueran transportadas más allá de los endosomas tempranos, probablemente hasta los compartimentos de reciclaje perinucleares.

A fin de corroborar esta hipótesis decidimos evaluar la participación de Rab22 en la entrada infectiva de DENV-1 HW, DENV-2 NGC y 16681 en células Vero. Se ha reportado que tanto la expresión de Rab22 wt como su versión mutante Rab22 Q64L alteran la morfología endosomal, inducen una redistribución de varias proteínas celulares involucradas en el reciclaje e inhiben el normal transporte de la proteína transferrina provocando su acumulación en vesículas periféricas (Magadan *et al.*, 2006; Mesa *et al.*, 2001). Por el contrario, la sobreexpresión de esta Rab GTPasa no afecta la internalización o transporte de ligandos que siguen la vía degradativa. Células Vero fueron transfectadas con plásmidos que codifican para el gen humano de Rab22 wt y su versión mutante Q64L, ambas fusionadas a GFP. Como control se transfectó un cultivo celular con el vector pEGFP-C1 que expresa la proteína GFP. Luego de 24 h la células fueron infectadas con los virus DENV-1 HW, DENV-2 NGC o DENV-2

16681, y a las 24 h p.i. las células fueron fijadas y procesadas para revelar la producción de antígeno viral por inmunofluorescencia indirecta.

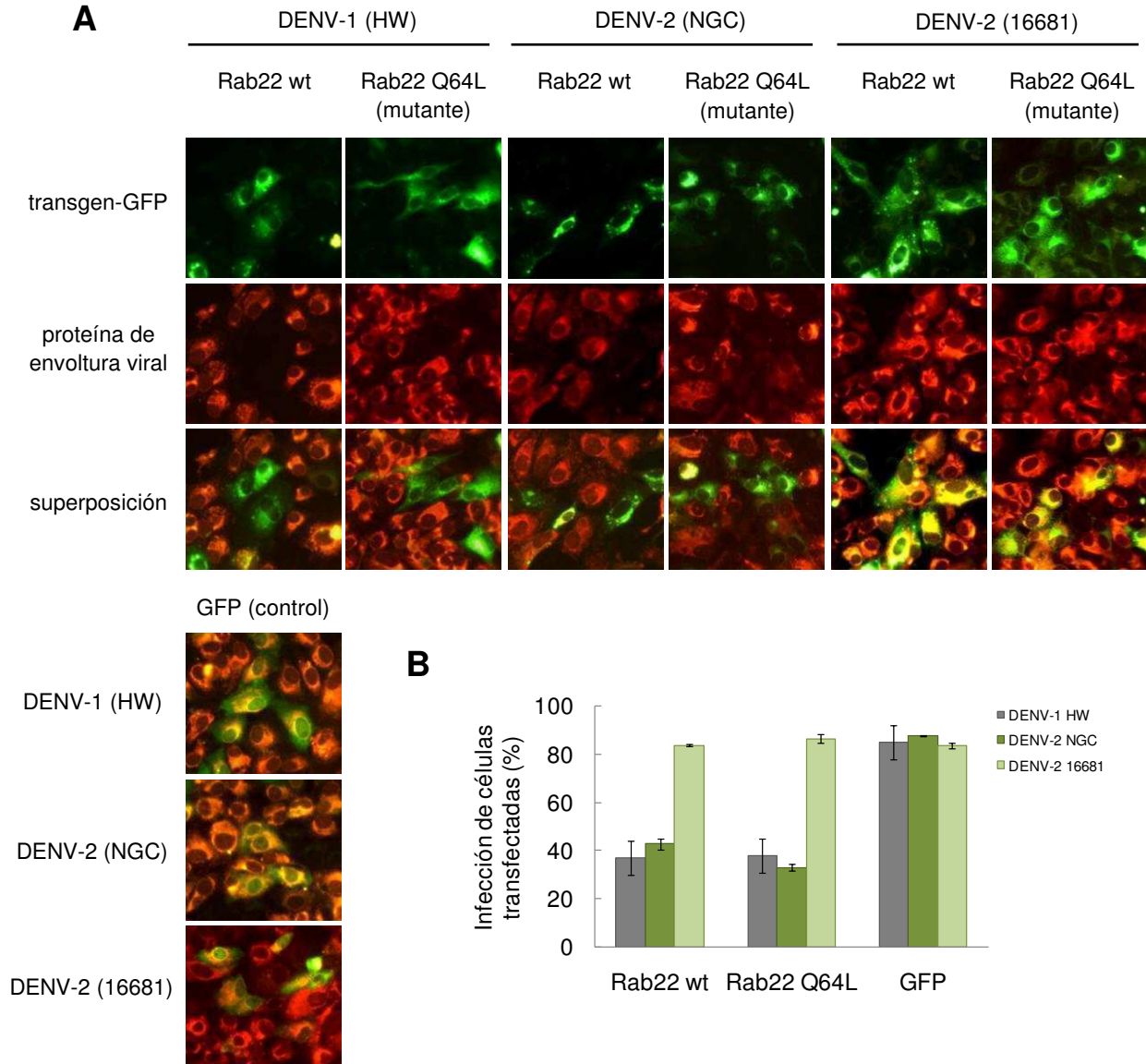


Figura 42. Efecto de la expresión de las versiones salvaje y mutante de Rab22 frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Cultivos de células Vero fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan la versión mutante de Rab22 (Q64L), un plásmido que codifica para la proteína salvaje (wt) fusionadas a GFP, o un plásmido que codifica para la proteína GFP (control). Luego de 24 h las células fueron infectadas con DENV-1 (HW) o DENV-2 (NGC o 16681) a una m.i. de 1 UFP/célula y al cabo de 24 h de infección los cultivos se fijaron y procesaron para detectar la glicoproteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta. **B.** A partir de las muestras del punto A se realizó un recuento de células infectadas sobre 250 células transfectadas y se determinó el porcentaje de infección. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

Tanto la expresión de Rab22 wt como el mutante Q64L afectaron la multiplicación de DENV-1 HW y DENV-2 NGC, reduciendo los porcentajes de infección entre un 50 % y 60 % con respecto al cultivo control que expresa la proteína GFP (Figura 42). Contrariamente, la multiplicación de DENV-2 16681 no estuvo comprometida por la expresión de estas proteínas.

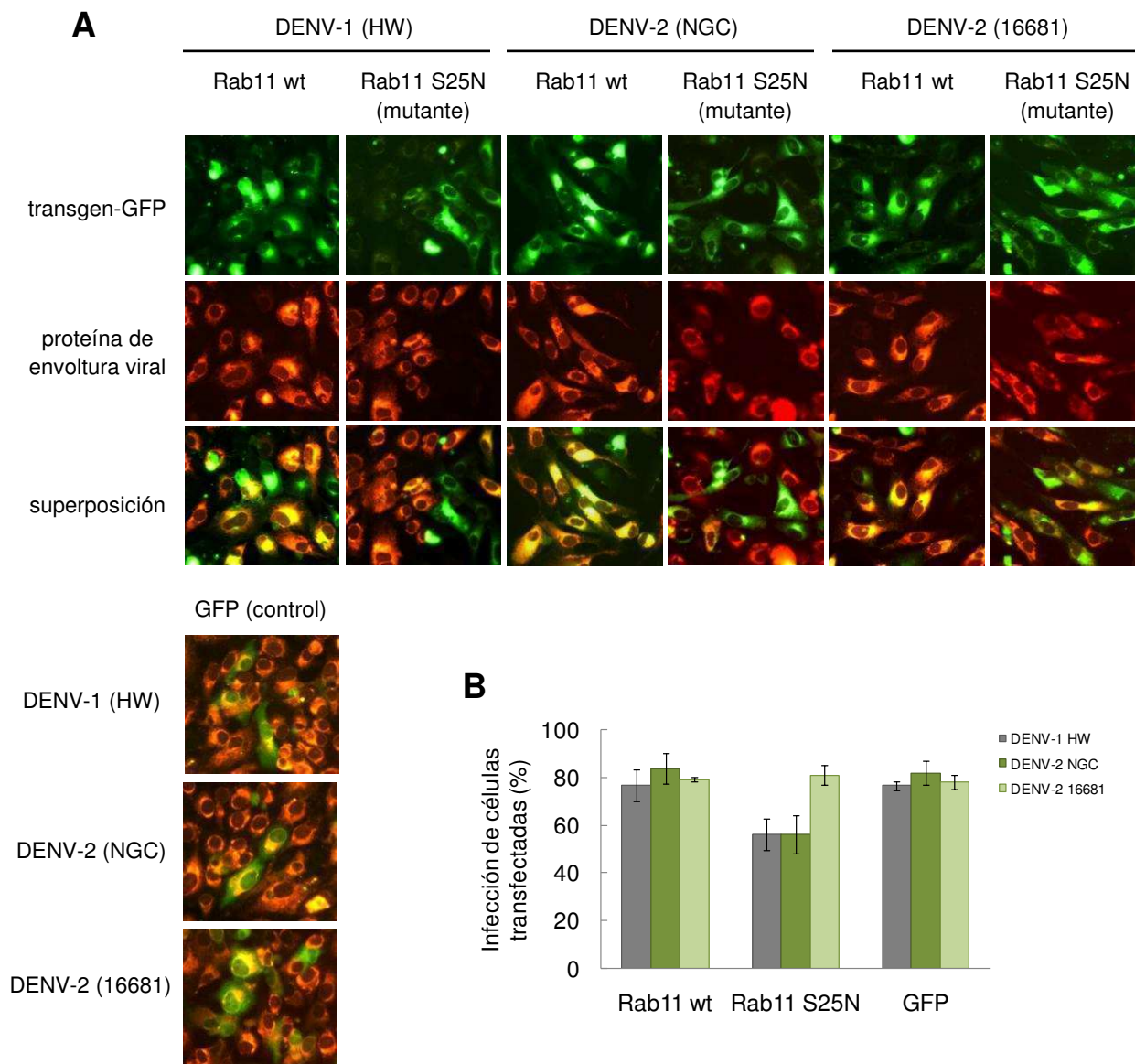


Figura 43. Efecto de la expresión de las versiones salvaje y dominante negativa de Rab11 frente a DENV-1 y DENV-2 en células Vero. **A.** Cultivos de células Vero fueron transfectados con construcciones plasmídicas que expresan la versión dominante negativa de Rab11 (S25N), un plásmido que codifica para la proteína salvaje (wt) fusionadas a *Green lantern-1* o un plásmido que codifica para la proteína GFP (control). Luego de 24 h las células fueron infectadas con DENV-1 (HW) o DENV-2 (NGC o 16681) a una m.i. de 1 UFP/célula y al cabo de 24 h de infección los cultivos se fijaron y procesaron para detectar la proteína de envoltura viral por inmunofluorescencia indirecta. **B.** A partir de las muestras del punto A se realizó un recuento de células infectadas sobre 250 células transfectadas y se determinó el porcentaje de infección. Los resultados se expresan como el promedio de tres determinaciones \pm DE.

A continuación quisimos complementar este resultado evaluando el efecto sobre la multiplicación de DENV del otro miembro conocido de la familia Rab que participa en el reciclaje de la vía lenta, Rab11. De manera similar a lo realizado con Rab22, cultivos de células Vero fueron transfectados con las versiones wt y dominante negativa (S25N) de Rab11 fusionadas a *Green Lantern*, una versión modificada de la proteína fluorescente GFP. Luego de 24 h los cultivos fueron infectados y a las 24 h p.i. fueron fijados y procesados por inmunofluorescencia indirecta. Se ha observado que la expresión de Rab11 wt también puede afectar, aunque de manera moderada, el reciclaje de transferrina (Ullrich *et al.*, 1996). Por este motivo, se realizaron transfecciones con el plásmido pEGFP-C1 a fin de determinar los niveles normales de infección. El recuento de 250 células transfectadas reveló que la expresión de la proteína dominante negativa no ejerció efecto sobre la multiplicación de DENV-2 16681, mientras que tuvo un moderado efecto inhibitorio frente a DENV-1 HW y DENV-2 NGC (Figura 43).

La suma de estos resultados indica que mientras DENV-2 16681 sería transportado desde los endosomas tempranos hacia los endosomas tardíos a través de la ruta degradativa, DENV-1 HW y DENV-2 NGC tomarían la vía de reciclaje lenta hacia los endosomas de reciclaje perinucleares.

Discusión

En el presente trabajo de tesis doctoral se estudió el mecanismo de entrada de DENV en líneas celulares de distinto origen (mosquito, mono y humano) por medio de la utilización de inhibidores químicos y moleculares, medidas de infectividad, inmunofluorescencia indirecta y observaciones por microscopía electrónica. Nuestros resultados describen un panorama complejo en el que un mismo serotipo viral puede utilizar diferentes vías infectivas en distintos tipos celulares, y que a su vez, distintos serotipos virales pueden utilizar vías de entrada alternativas en un mismo tipo celular.

Del análisis de los posibles factores que podrían influir sobre la elección de una vía endocítica en particular, se estableció que no habría diferencias entre distintas cepas dentro de un mismo serotipo, pero que por el contrario, características propias de cada cepa determinarían el recorrido intracelular de las partículas virales hasta llegar al sitio preferencial de fusión.

Mecanismos de internalización: DENV puede utilizar más de un modo de ingresar a la célula huésped

El estudio del mecanismo de entrada utilizado por los dos serotipos de dengue analizados en este trabajo expone claramente la complejidad del proceso de entrada de este patógeno humano.

Nuestros resultados muestran por primera vez que estos virus pueden presentar un modo de entrada diferencial en un mismo tipo celular, como es el caso de DENV-1 y DENV-2 en células Vero (Figura 44). DENV-1 utiliza en este sistema celular un mecanismo endocítico clásico, dependiente de clatrina y dinamina, mientras que DENV-2 es internalizado por medio de una vía no clásica. Como se mencionó en la Introducción, aún no existe un claro consenso sobre cómo clasificar este tipo de vías endocíticas, por lo que simplemente se las puede definir de manera operacional. El análisis sistemático de la participación de los principales componentes celulares reveló que la vía empleada por DENV-2 es independiente de clatrina, caveolas, *lipid-rafts* y actina pero dependiente de dinamina.

La participación diferencial de la vía de clatrina para la internalización de DENV-1 y DENV-2 se demostró mediante la utilización de las drogas clorpromazina y dansilcadaverina, y la expresión de la forma dominante negativa de la proteína Eps15, los cuales afectaron la internalización de las partículas virales y consecuentemente la producción de DENV-1 sin

ejercer efecto inhibitorio sobre la incorporación a la célula o multiplicación de DENV-2 (Figuras 11 y 12). Esta diferente dependencia fue corroborada de manera definitiva por medio de observaciones por microscopía electrónica de transmisión que revelaron la presencia de partículas de DENV-1 en invaginaciones de membrana y vesículas con cubierta electrodensa, mientras que las partículas de DENV-2 se hallaron principalmente asociadas a zonas de membrana y vesículas de gran tamaño carentes de cubierta (Figuras 20 y 21). Llamativamente, los ensayos de inhibición del rendimiento viral y de internalización por centros infecciosos, los cuales permiten cuantificar la producción o internalización de partículas virales infectivas, demostraron que el tratamiento con los inhibidores farmacológicos de la vía de clatrina aumentan la entrada de DENV-2 (Figura 11 B y C). Este efecto incrementador de la entrada ha sido previamente descrito para otros virus y ligandos fisiológicos (Spoden *et al.*, 2008). Si bien no existe una explicación definitiva a este fenómeno, algunos autores sugieren que existiría una regulación cruzada de los distintos mecanismos endocíticos y al bloquear una vía endocítica determinada la célula intentaría equilibrar esta falta aumentando la tasa endocítica por medio de las restantes rutas de internalización (Damke *et al.*, 1995).

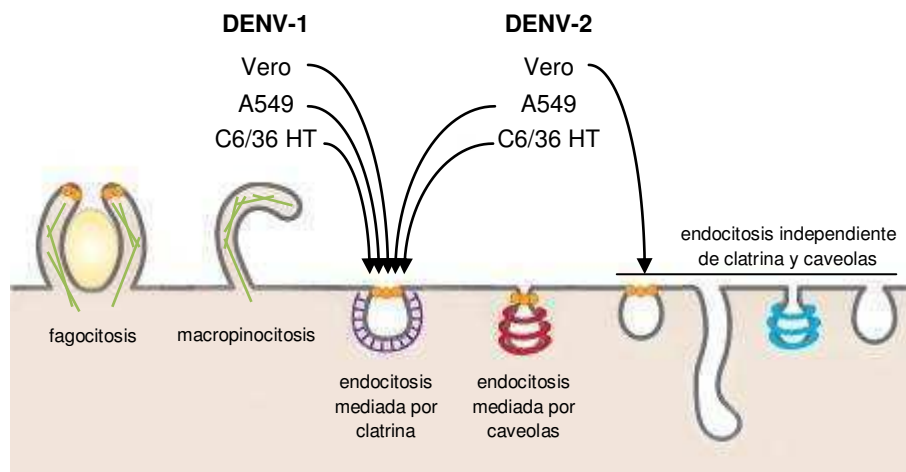


Figura 44. Mecanismos endocíticos utilizados por DENV para infectar cultivos celulares de distinto origen

Las observaciones por microscopía electrónica de la entrada de DENV-2 no sólo nos permitieron descartar a la vía de clatrina como la ruta de internalización mayoritaria de este virus en células Vero, sino que además demostraron que las partículas virales se encontraban

asociadas a proyecciones de la membrana plasmática similares a pseudopodios o filopodios. Es interesante señalar que estas proyecciones de membrana fueron visualizadas en muestras de células Vero infectadas y fijadas a los pocos minutos p.i. (Figura 21), pero no se encontraron presentes en células Vero sin infectar o en células infectadas y fijadas luego de 2,5 h p.i. (Talarico, 2008). En concordancia con estas observaciones, recientemente se ha reportado la observación de proyecciones citoplasmáticas en células Vero infectadas con DENV-2 luego de 30 min p.i. por medio de la técnica de microscopía electrónica de transmisión (Zargar *et al.*, 2010). Esto indicaría que los filopodios serían inducidos por el contacto con el virus muy tempranamente durante la infección, probablemente como resultado de su interacción con receptores de membrana.

Estas observaciones nos condujeron a analizar la participación de los procesos de macropinocitosis/fagocitosis en la entrada de este patógeno. Al utilizar los compuestos despolimerizantes de fibras de actina citochalasina D y latrunculina A, y el agente estabilizante de microfilamentos jasplakinolide, encontramos que los mismos no ejercieron efecto inhibitorio sobre la internalización o infección de DENV-2 en células Vero (Figuras 17 y 18). Esto nos permite descartar la participación de la macropinocitosis o fagocitosis como responsables de la internalización del virus y además sugiere que la formación de estas estructuras similares a filopodios no sería un requisito fundamental para la internalización de las partículas de DENV-2 a esta línea celular. Sin embargo, estas proyecciones podrían estar implicadas en la entrada productiva del virus en otras líneas celulares, como lo demuestra un trabajo realizado en células HMEC-1, una línea derivada de endotelio vascular (Zamudio-Meza *et al.*, 2009). Mediante la utilización de la técnica de videomicrografía secuencial y los mismos agentes despolimerizantes de fibras de actina que utilizamos en nuestra investigación, estos autores demostraron que la unión de las partículas de DENV-2 a la superficie celular induce la formación de filopodios dependientes de la activación de GTPasas de la familia Rho. Estos investigadores observaron partículas de DENV-2 desplazándose sobre los filopodios hasta alcanzar el cuerpo de la célula, desde donde ocurriría la internalización viral. A diferencia de lo observado en nuestro trabajo, la formación de filopodios en células HMEC-1 resultó ser un requisito para la entrada productiva del virus.

Además de DENV, otros virus de familias tan diversas como retrovirus, papilomavirus y poxvirus son capaces de moverse lateralmente sobre proyecciones de la membrana plasmática en una instancia previa a su internalización (Burckhardt y Greber, 2009). Sin embargo, el hecho que estos movimientos laterales o “*surfing*” de membrana constituyan un prerrequisito para la

entrada productiva parece no depender de la identidad del virus sino de características propias de la célula a infectar. Lehmann *et al.* (2005) demostraron que la interferencia en el *surfing* tiene un moderado o nulo efecto inhibitorio sobre la infección de VSV y del virus de la leucemia murina en fibroblastos, en donde los virus tienen acceso relativamente fácil al cuerpo celular. Por el contrario, la inhibición en el *surfing* afecta significativamente la internalización de estos virus en células epiteliales polarizadas, las cuales se encuentran cubiertas por microvellosidades. Este trabajo postula que los movimientos virales sobre proyecciones de membrana facilitarían a los virus el acceso a sitios óptimos de internalización, lo que es fundamental en ciertas células cuya morfología característica restringe el acceso a las zonas del cuerpo celular de activa endocitosis. Este no sería el caso de la infección de DENV-2 en células Vero, una línea celular con morfología típicamente fibroblástica.

En contraparte, una publicación reciente implica al proceso de macropinocitosis en la entrada de distintos serotipos de DENV a células hepáticas HepG2 (Suksanpaisan *et al.*, 2009). Este trabajo sugiere que DENV utilizaría la vía de clatrina como ruta de internalización mayoritaria y la macropinocitosis como una vía secundaria. Sin embargo, los autores arriban a esta conclusión mediante el uso de inhibidores químicos, entre ellos el amiloride. En un ensayo de centros infecciosos estos autores observaron que el tratamiento durante la infección viral con amiloride 3 mM reduce la multiplicación de DENV-2 en un 60 %. Notablemente, este valor se asemeja al 56 % de reducción en la infectividad viral remanente que surge de la interpolación de nuestros valores de inactivación en el ensayo de actividad virucida de este compuesto (Figura 17 A). Esto nos hace pensar en la posibilidad de que la inhibición observada por Suksanjpaisan *et al.* (2009) se deba a un efecto directo de la droga sobre las partículas virales más que a la acción de la misma sobre los procesos celulares.

Además de ser crucial para los procesos de fagocitosis y macropinocitosis, la dinámica de polimerización y despolimerización de los microfilamentos de actina juega distintos roles en otras vías endocíticas. Se ha postulado que la actina cortical serviría como andamiaje para el reclutamiento y organización de la maquinaria endocítica, ayudaría al proceso de deformación de la membrana y aportaría la fuerza necesaria durante el proceso de fisión de la vesícula naciente (Qualmann *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que en el caso de la endocitosis dependiente de clatrina, la actina no representaría un factor imprescindible para el proceso endocítico y su participación parecería depender del tipo celular o de las condiciones utilizadas para crecer el cultivo (Fujimoto *et al.*, 2000). Estas últimas observaciones permiten explicar nuestros resultados variables acerca de la dependencia del citoesqueleto de actina en

la entrada dependiente de clatrina de DENV. Mientras que la presencia de citochalasin A durante la infección viral no inhibe la multiplicación de DENV-1 en células Vero (Figura 17 C), este agente despolimerizante ejerce un marcado efecto inhibitorio sobre la infección de DENV-2 en células de mosquito (Figura 31 C y D), al igual que ha sido demostrado en células ECV304 (Wang *et al.*, 2010), otra línea en la que el virus es internalizado por medio de la vía dependiente de clatrina (Peng *et al.*, 2009).

Durante el proceso de caracterización de la entrada de DENV-1 y DENV-2 tuvimos especial cuidado al utilizar las drogas nistatina y metil- β -ciclodextrina, las cuales son herramientas comúnmente utilizadas para perturbar las vías endocíticas dependientes de caveolas/*lipid-rafts*. Se ha demostrado que al utilizarse en concentraciones altas, estos agentes pueden afectar otras vías endocíticas de manera inespecífica, incluyendo la vía de clatrina. Por ejemplo, Rodal *et al.* (1999) demostraron que al tratar líneas celulares muy diversas con metil- β -ciclodextrina en una concentración de 10 mM, la internalización de transferrina se ve reducida en más de un 50 %. Por lo tanto, en este trabajo evitamos exponer las células a concentraciones excesivamente altas de las drogas, pero al mismo tiempo nos aseguramos de inhibir las vías dependientes de *lipid-rafts*, como lo demostraron los ensayos de internalización de toxina colérica (Figuras 13 E, 24 B y 28 B). Estas condiciones experimentales finamente ajustadas nos permitieron concluir que la entrada infectiva de DENV en células Vero, C6/36 HT y A549 ocurre independientemente de la integridad de los *lipid-rafts* de membrana.

En aparente contradicción, Reyes del Valle *et al.* (2005) y Lee *et al.* (2008) reportaron que los *lipid-rafts* serían necesarios para la infección de DENV-2 en monocitos humanos y células de neuroblastoma de ratón, respectivamente. En su trabajo de entrada a monocitos humanos Reyes del Valle *et al.* (2005) realizaron el tratamiento de las células con concentraciones de metil- β -ciclodextrina de hasta 15 mM. Por lo tanto, en base a lo expuesto por Rodal *et al.* (1999), inferir en esas condiciones una dependencia de *lipid-rafts* sería precipitado ya que, aunque al momento no se conoce el mecanismo utilizado por DENV-2 para infectar monocitos humanos, la inhibición podría ser debida a una alteración generalizada de varias rutas endocíticas. Por otra parte, mientras que en el trabajo en células de neuroblastoma de ratón Lee *et al.* (2008) utilizaron concentraciones más bajas de esta droga (hasta 3 mM), hay que tener en cuenta que en este caso la adición del compuesto se realizó junto con el inóculo viral. Durante el desarrollo del presente trabajo experimental determinamos que las drogas nistatina y metil- β -ciclodextrina ejercen un efecto inactivante muy severo por contacto

directo con las partículas de DENV (Figura 13 A), lo que no ha sido tenido en cuenta en el mencionado trabajo de Lee *et al.* (2008).

Este efecto inactivante ejercido por drogas que interactúan con el colesterol ya ha sido previamente reportado para otro virus miembro de la familia *Flaviviridae*, el virus de la hepatitis C (Aizaki *et al.*, 2008). Este trabajo reveló que la remoción del colesterol de la membrana de los viriones no afecta la adsorción de los mismos a la célula pero reduce su internalización. En el caso de DENV queda pendiente establecer cuál es el proceso del ciclo de replicación que se ve obstaculizado por el tratamiento con estas drogas, lo que será revelado por futuras investigaciones. Por supuesto, el hecho de encontrar diferencias entre la metodología empleada por otros investigadores y nosotros, no excluye la posibilidad de la participación de *lipid-rafts* para la internalización de DENV en otros sistemas celulares.

Otros estudios detallados publicados en los últimos años han permitido detectar la posibilidad de la utilización de vías alternativas para un mismo virus, tal cual sería la situación con DENV-2 en distintos sistemas celulares. Este comportamiento se ha descrito para influenza (Sieczkarski y Whittaker, 2002b; Rust *et al.*, 2004), HSV-1 (Clement *et al.*, 2006; Rosenthal *et al.*, 1989), SV40 (Damm *et al.*, 2005; Pelkmans *et al.*, 2001), HIV-1 (Maréchal *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 1987; Vidricaire y Tremblay, 2007) y adenovirus humanos (Amstutz *et al.*, 2008; Meier *et al.*, 2002). Más interesante aún, en algunos casos de virus que utilizan vías endocíticas no clásicas, como influenza y LCMV, se ha observado que ésta opera paralelamente con la endocitosis dependiente de clatrina, siendo ambas rutas o una mayormente que la otra la vía infectiva de internalización (Quirin *et al.*, 2008; Rust *et al.*, 2004). Este podría ser el caso de DENV-2, dado que durante nuestras observaciones por microscopía electrónica de la entrada viral en células Vero encontramos esporádicamente partículas virales dentro de vesículas recubiertas (Figura 21 H). El uso de rutas alternativas de entrada en la misma o diferentes células puede representar una ventaja para el virus al incrementar las posibilidades de una penetración productiva y expandir el rango de células a ser infectadas. Puede haber diferencias en la abundancia o actividad de las vías endocíticas discutidas en este trabajo entre distintos tipos de células, y tales diferencias pueden influir sobre la ruta preferida de entrada para un virus. Justamente, el tropismo celular de amplio espectro de DENV puede estar relacionado a la posibilidad aquí planteada de explotar rutas opcionales de internalización celular. Es interesante señalar en este punto que como se muestra en la Tabla I, distintos receptores virales han sido identificados para un mismo serotipo de DENV en líneas celulares

de diferente origen y que en contrapartida, distintos serotipos virales utilizarían receptores alternativos en un mismo sistema celular.

Al momento desconocemos las bases bioquímicas que determinan que en células Vero DENV-1 y DENV-2 tomen rutas de internalización alternativas, sin embargo es muy probable que este hecho esté relacionado con la utilización de receptores diferentes. Aún no ha sido realizado un estudio comparativo de los receptores de DENV-1 y DENV-2 en células Vero, pero trabajos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación sugieren que en este sistema celular el heparán sulfato sería importante para la infección de DENV-2, mientras DENV-1 se uniría a un receptor de naturaleza proteica (Chen *et al.*, 1997; Marianneau *et al.*, 1996). En este sentido, la presencia de heparina durante la primera hora de infección de DENV-1 y DENV-2 demostró un efecto diferencial sobre estos virus, ejerciendo efecto inhibitorio únicamente frente a DENV-2 (Figura 22). Además es de destacar que un estudio en el cual se analizó la vía endocítica utilizada por el proteoglicano heparán sulfato, se determinó que éste es internalizado por una ruta independiente de clatrina, caveolas y *lipid-rafts*, dependiente de dinamina, al igual que hemos demostrado en este trabajo para la entrada de DENV-2 en células Vero (Payne *et al.*, 2007). Sin embargo, el transporte intracelular descrito por nosotros para DENV (discutido más adelante) parece diferir de la ruta recorrida por el heparán sulfato. Estos autores han reportado la incorporación del proteoglicano en vesículas positivas para flotilina-1 a los 10 min post-internalización y un transporte directo hacia endosomas tardíos (Payne *et al.*, 2007).

El conocimiento del modo de entrada de DENV a la célula huésped permitirá explorar las posibilidades de este paso del ciclo de multiplicación como blanco antiviral. Estudios preliminares con polisacáridos sulfatados, que ejercen su acción antiviral a nivel de la entrada del virus, mostraron que existe una susceptibilidad variable según el tipo celular y el serotipo viral (Lin *et al.*, 2002; Talarico *et al.*, 2005; Talarico y Damonte, 2007; Talarico *et al.*, 2007). Estos trabajos sugirieron por primera vez que los distintos serotipos de DENV podrían presentar características diferenciales en el modo de entrada a células Vero. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se ajustan a estas observaciones iniciales, ya que demostramos que DENV-1 y DENV-2 difieren notablemente en su vía de entrada infectiva en dicho sistema celular. Sería interesante determinar si la eliminación del heparán sulfato de la superficie de células Vero es capaz de inducir un redireccionamiento de DENV-2 desde la vía de internalización no clásica hacia la vía dependiente de clatrina.

Variables que influyen sobre el mecanismo de internalización utilizado

Los resultados expuestos en este estudio muestran claramente que el serotipo viral es una variable que influye sobre el modo de internalización utilizado por DENV. Sin embargo, mientras que nuestra caracterización del mecanismo de entrada de DENV-2 en células Vero indica que este virus es mayormente internalizado por endocitosis independiente de clatrina, un reporte reciente demostró mediante la técnica de seguimiento de partículas virales fluorescentes individuales, que en células de mono BS-C-1 este virus es incorporado por la ruta clatrina-dependiente (van der Schaar *et al.*, 2008). Estos autores demostraron que luego de unirse a la membrana plasmática, las partículas de DENV-2 se mueven lateralmente de manera aleatoria hasta detenerse en zonas de la membrana donde el enrejado de clatrina se encuentra pre-ensamblado en su lado citoplasmático. Las partículas virales internalizadas colocalizan con la proteína clatrina durante unos segundos hasta que ocurre el desensamblado de la cubierta (van der Schaar *et al.*, 2008). Por otra parte, mediante el uso de pequeños ARN interferentes otros autores han sugerido la necesidad de una vía de clatrina funcional para la infección de células hepáticas humanas Huh7 y HepG2 con DENV-2 (Ang *et al.*, 2010), al igual que ha sido demostrado en células HeLa (Krishnan *et al.*, 2007) y ECV304 (Peng *et al.*, 2009). Los resultados expuestos en estos reportes y nuestro análisis de la entrada de DENV-2 en células Vero, indicaría que DENV-2 podría utilizar vías de entrada alternativas en distintas líneas celulares.

En este sentido, al extender nuestra investigación del mecanismo de entrada de DENV a otros sistemas celulares, encontramos que DENV-2 utiliza en células humanas A549 y en células de mosquito C6/36 HT un mecanismo de entrada clásico dependiente de clatrina y dinamina, al igual que el serotipo DENV-1 (Figura 44). El primer indicio de que la entrada de estos virus en células de mosquito ocurría por endocitosis, surgió a partir del tratamiento con cloruro de amonio, agente inhibidor de la acidificación endosomal. Este compuesto redujo la infección de ambos serotipos de DENV en células C6/36 HT, como lo demostraron los ensayos de inhibición del rendimiento viral y de inmunofluorescencia indirecta (Figuras 27 y 33). Esta conclusión difiere claramente del único reporte previo encontrado en la bibliografía sobre la entrada de DENV a células de mosquito que indica que la entrada de DENV-2 tiene lugar por fusión directa con la membrana plasmática (Hase *et al.*, 1989). Si bien en este trabajo los autores manejaron el mismo sistema celular y cepa viral que los utilizados por nosotros en este estudio, las conclusiones divergentes pueden deberse a que estos investigadores limitaron su análisis a observaciones por microscopía electrónica. Nosotros abordamos el estudio desde un

punto de vista bioquímico y molecular, y lo complementamos con un análisis ultraestructural que reveló claramente la presencia de partículas virales dentro de vesículas con cubierta electrodensa (Figura 32). Nuestra conclusión sobre la dependencia de la vía de clatrina para la entrada infectiva de DENV-2 a células de mosquito fue corroborada posteriormente por una publicación de otro grupo de investigación (Mosso *et al.*, 2008).

Una vez establecido que la célula hospedadora puede ser una variable que influye sobre el modo de entrada de DENV-2 nos propusimos determinar a continuación si posibles diferencias entre distintas cepas dentro de un serotipo viral constituirían también un factor determinante sobre la ruta endocítica a tomar. Claras evidencias experimentales reportadas en la bibliografía indican que las variaciones encontradas entre diferentes cepas virales pueden afectar la ruta de internalización de ciertos virus, como es el caso de vaccinia o rotavirus (Chang *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010). Al evaluar el efecto de clorpromazina, droga inhibidora de la endocitosis por clatrina, encontramos que ésta ejerció el mismo efecto inhibitorio frente a aislamientos clínicos de DENV-1 y la cepa de referencia HW, mientras que no tuvo efecto sobre aislamientos clínicos o las cepas de referencia de DENV-2 NGC y 16681 (Figura 23 A). Estos resultados indican que la forma de entrada diferencial en células Vero en cuanto a la dependencia de clatrina sería una característica propia de los serotipos DENV-1 y DENV-2 compartida por distintas cepas y no un rasgo atribuible a una cepa en particular. Estas observaciones coinciden con los resultados de resistencia antiviral a los polisacáridos del serotipo DENV-1 frente a la cepa de referencia HW y aislamientos clínicos de reciente circulación en nuestro país (Talarico, 2008), y la susceptibilidad compartida frente a estos compuestos tanto de las cepas de referencia NGC y 16681 como a aislamientos clínicos de DENV-2 (Talarico y Damonte, 2007).

Es interesante señalar en este punto que en la naturaleza, DENV se mantiene por ciclos continuos de transmisión que implican el pasaje alternativo del virus entre mosquitos *Aedes* y humanos. Durante el transcurso de este trabajo experimental todos nuestros ensayos fueron realizados con virus propagado en células de mosquito. Sin embargo, antecedentes encontrados en la bibliografía sugieren que el pasaje sucesivo de distintos serotipos de DENV en líneas celulares de mamífero modifica su afinidad por el heparán sulfato (Añez, *et al.* 2009; Lee, *et al.* 2006). Ante el comportamiento natural del virus y los resultados obtenidos en este estudio que sugieren una relación entre afinidad por heparán sulfato y la utilización de una vía endocítica en particular, cabe preguntarse si el pasaje del virus para su proliferación en

diferentes tipos celulares puede también influir sobre el modo de entrada del mismo a su célula huésped.

Tránsito intracelular y escape del genoma al citoplasma celular: destinos diferentes según la cepa viral

El primer estudio de la participación de distintos miembros de la familia de Rab GTPasas en el tráfico intracelular de las partículas de DENV reveló que en células HeLa DENV-2 NGC requiere de un Rab5 funcional pero no de Rab7 para generar una infección productiva (Krishnan *et al.*, 2007). Por este motivo, los autores del trabajo postularon que la penetración viral ocurriría a nivel de los endosomas tempranos (Krishnan *et al.*, 2007). Sin embargo, en una publicación posterior se demostró que en células BS-C-1, las partículas de DENV-2 PR159 S1 son transportadas primeramente a endosomas tempranos decorados con Rab5 y luego a endosomas tardíos positivos para Rab7, desde donde ocurre la penetración viral con un tiempo promedio de 10-13 min post-internalización (van der Schaar *et al.*, 2008). De manera similar, se demostró la colocalización de partículas virales de DENV-2 16681 con lisosomas luego de 15-30 min de iniciada la internalización viral en células de mosquito C6/36 HT (Mosso *et al.*, 2008). En todos estos sistemas celulares la internalización de las partículas virales ocurre por la vía de clatrina, por lo que se postuló que las discrepancias encontradas eran atribuibles a características distintivas de cada cepa viral (van der Schaar *et al.*, 2008).

En el presente trabajo de tesis demostramos que la entrada de DENV-2 a células Vero sucede a través de una vía no clásica, independientemente de la cepa analizada, mientras que la entrada de distintas cepas de DENV-1 tiene lugar por la vía de clatrina clásica. Por lo tanto, nos propusimos estudiar el camino intracelular recorrido por las partículas virales de las cepas de referencia DENV-1 HW, DENV-2 NGC y DENV-2 16681 en células Vero, a fin de establecer si las diferencias encontradas en la endocitosis viral también se verían reflejadas a nivel de la ruta intracelular recorrida por estas partículas virales. Por otra parte, nos interesó analizar si las diferencias, atribuidas en la bibliografía a las distintas cepas de DENV-2, se mantendrían también dentro de un mismo sistema celular.

En primer lugar determinamos el tiempo medio de fusión de los tres virus. Varios trabajos han reportado que el tiempo medio de fusión de un virus puede ser utilizado como un indicador indirecto de en qué organela de la vía endocítica está ocurriendo la penetración viral

(Johannsdottir *et al.*, 2009; Quirin *et al.*, 2008;). Los virus que fusionan en endosomas tempranos lo hacen muy rápidamente, mientras que los que fusionan en endosomas tardíos demoran unos minutos más en alcanzar esta organela y por lo tanto presentan un tiempo medio de penetración mayor. Encontramos que DENV-1 HW y las dos cepas de DENV-2 presentaron el mismo tiempo medio de fusión, el que resultó ser idéntico al exhibido por JUNV, un virus que penetra en células Vero en endosomas tardíos con dependencia de Rab7 (Martínez *et al.*, 2009) (Figura 35). Esto indicaría que en células Vero DENV fusionaría tardíamente a lo largo de su recorrido endocítico, independientemente de la cepa o del serotipo viral. Los tiempos medios de fusión determinados por nosotros en este trabajo fueron muy similares a los reportados por van der Schaar *et al.* (2008) para DENV-2 PR159 S1 y Zaitseva *et al.* (2010) para DENV-2 TH-36.

Mientras que los ligandos incorporados por la vía de clatrina, como es el caso de DENV-1 HW en células Vero, siguen una ruta intracelular que los conduce primeramente hacia endosomas tempranos, aún no es clara la ruta recorrida por las moléculas incorporadas por vías no clásicas. Por ejemplo, el virus Ebola el cual es internalizado por una ruta independiente de clatrina, caveolas y dinamina similar a la macropinocitosis, requiere un transporte mediado por Rab5 y Rab7 (Saeed *et al.*, 2010) mientras que LCMV que también es internalizado por una vía novedosa independiente de clatrina y caveolas parece pasar por alto los endosomas tempranos para ser transportado directamente hacia endosomas tardíos (Quirin *et al.*, 2008). Nuestro análisis de la participación de Rab5 GTPasa en la entrada de DENV, sugiere que se requiere de la función de esta proteína para que las partículas virales sean incorporadas en compartimentos endosomales (Figura 39). La expresión de la versión dominante negativa de Rab5 reduce notablemente la infección de DENV-1 y DENV-2, lo que demuestra el requerimiento del transporte hacia endosomas tempranos de ambos virus para que ocurra una infección productiva (Figura 37). Estos resultados coinciden con la propuesta de varios autores que sugiere que prácticamente todas las vías endocíticas convergerían en endosomas tempranos, desde donde los ligandos son clasificados para su destino final (Jovic *et al.*, 2010). La ruta recorrida por ciertos virus como LCMV representaría una excepción a esta regla.

Al continuar nuestro estudio sobre el transporte de las partículas de DENV encontramos que en concordancia con lo reportado por Krishnan *et al.* (2007), la expresión de la versión dominante negativa de Rab7 no tiene efecto inhibitorio sobre la multiplicación de DENV-2 NGC (Figura 40). Esto indica que en células Vero el virus no requiere de un transporte hasta endosomas tardíos para que ocurra la penetración viral, lo que fue corroborado por la falta de

efecto de la droga wortmanina sobre la liberación de la proteína de cápside viral al citoplasma celular (Figura 41). Esta falta de requerimiento de transporte de DENV-2 NGC hacia endosomas tardíos, sumado a la cinética de penetración tardía exhibida por este virus nos condujo a especular acerca de la posible participación de los endosomas de reciclaje en la penetración viral. La expresión de Rab22 wt y su mutante redujeron la multiplicación de DENV-2 NGC y DENV-1 HW, mientras que no tuvieron efecto frente a DENV-2 16681, la única cepa analizada por nosotros que presentó una infección dependiente de Rab7 (Figura 42). Esto indicaría que mientras que DENV-2 16681 seguiría la ruta degradativa clásica, es decir desde endosomas tempranos hacia endosomas tardíos en un transporte dependiente de Rab7 y PI3-K, DENV-1 HW y DENV-2 NGC seguirían la ruta de reciclaje lenta, en un transporte desde endosomas tempranos hacia endosomas de reciclaje perinucleares mediado por Rab22 (Figura 45). Esta ruta de reciclaje lenta es independiente de PI3-K, como lo demuestra un reporte reciente (van Dam *et al.*, 2002) y la falta de efecto de la droga wortmanina sobre la liberación de la proteína de cápside de DENV-2 NGC al citoplasma celular (Figura 41). Asimismo, el moderado efecto inhibitorio frente a DENV-1 HW y DENV-2 NGC exhibido por la expresión de la versión dominante negativa de Rab11 aporta otro indicio en favor de esta hipótesis. Esta GTPasa participa en el último tramo de la ruta de reciclaje lenta, regulando el transporte desde los endosomas de reciclaje perinucleares hacia la membrana plasmática (Figura 45). La alteración de la función de esta proteína no afecta la tasa de internalización de la proteína transferrina pero provoca una redistribución de los endosomas de reciclaje, haciendo que los mismos pasen a estar dispersos por todo el citoplasma celular (Ullrich *et al.*, 1996). Por lo tanto, el modesto efecto inhibitorio observado por nosotros frente a DENV-1 HW y DENV-2 NGC podría deberse a un efecto indirecto causado por la expresión de esta proteína mutante sobre la localización de los endosomas de reciclaje.

Como se mencionó en la Introducción, los endosomas tempranos tienen una estructura compleja, compuesta por regiones de finas extensiones tubulares (de 60-90 nm de diámetro) y grandes cuerpos vacuolares (de 200-1000 nm de diámetro) (Gruenberg, 2001). Las moléculas destinadas a reciclaje se concentran en las extensiones tubulares, mientras que las proteínas destinadas a degradación permanecen asociadas al cuerpo vacuolar. En este sentido no es sorprendente que existan en la bibliografía muy pocos ejemplos acerca del recorrido de partículas virales a través de los endosomas de reciclaje. La mayoría de los virus se encuentran dentro del rango de tamaño de 60-150 nm de diámetro, por lo que son demasiado grandes para entrar a las extensiones tubulares. Estos acaban acumulándose en el cuerpo

vacuolar desde donde son transportados hacia la vía degradativa (Mercer *et al.*, 2010). En concordancia, los únicos reportes de virus en los que estaría implicada la vía de reciclaje lenta pertenecen a la familia *Polyomaviridae*, cuyo diámetro es de aproximadamente 45 nm (Mannová y Forstová, 2003) y *Picornaviridae*, cuyas cápside virales poseen un diámetro de 20-30 nm (Johns *et al.*, 2009). Coincidentemente con nuestras observaciones por microscopía electrónica (Figuras 20, 21, 32 y 34), se ha reportado que las partículas de DENV poseen un diámetro de entre 40 y 50 nm (Ko *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1970), por lo que no existiría impedimento físico para su incorporación en las extensiones tubulares de los endosomas tempranos y su consecuente transferencia hacia endosomas de reciclaje.

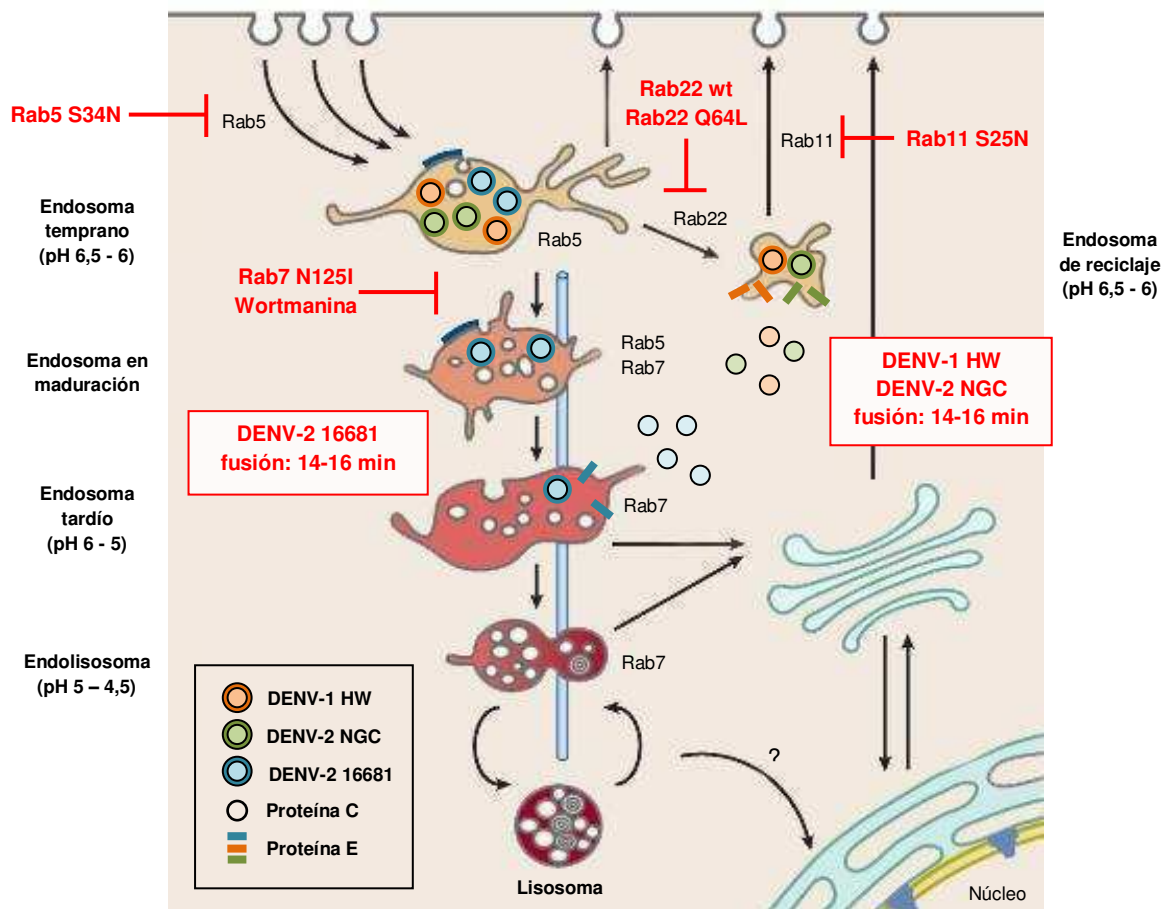


Figura 45. Tránsito intracelular de DENV-1 HW, DENV-2 NGC y DENV-2 16681 en células Vero. Rab: Ras-related protein in brain.

Al momento desconocemos el mecanismo y los factores celulares y/o virales que hacen que DENV-2 NGC y DENV-1 HW sean incorporados a la vía de reciclaje lenta mientras que

DENV-2 16681 tome la vía degradativa. Estudios de seguimiento de moléculas fluorescentes individuales en células vivas demostraron que los ligandos destinados a degradación (como LDL o EGF) y los destinados a reciclaje (transferrina) son diferencialmente incorporados dentro de distintas poblaciones de endosomas tempranos (Lakadamyali *et al.*, 2003). El LDL y EGF se asocian preferencialmente a endosomas que se mueven velozmente sobre microtúbulos hacia la zona perinuclear y que maduran rápidamente adquiriendo marcadores de endosomas tardíos. Por su parte, la transferrina es incorporada indistintamente a dos poblaciones de endosomas tempranos, los rápidos y otros más estáticos que permanecen mayor tiempo en la zona periférica y maduran lentamente. Estos autores postulan por lo tanto la existencia de un mecanismo de clasificación de ligandos que operaría con anterioridad al endosoma temprano, probablemente en la membrana plasmática, haciendo que los ligandos sean preferencialmente incorporados en las distintas poblaciones endosomales (Lakadamyali *et al.*, 2003). En este mismo trabajo se demostró que el virus influenza, el cual fusiona en endosomas tardíos con dependencia de Rab7, es rápidamente incorporado en la subpoblación de endosomas tempranos rápidos, como un ligando destinado a degradación (Lakadamyali *et al.*, 2003). Si bien, la correlación entre el destino final de un ligando (en términos de degradación o reciclaje) y su incorporación a endosomas tempranos rápidos o lentos aún no puede ser aplicada en términos generales, el seguimiento de partículas individuales de DENV-2 PR159 S1 demostró que éste es incorporado indistintamente en endosomas rápidos y lentos, es decir, tiene el mismo comportamiento de un ligando destinado a reciclaje (van der Schaar *et al.*, 2008). Sin embargo, la cepa de DENV-2 analizada en el trabajo de van der Schaar demostró fusionar en endosomas tardíos. Estos antecedentes y los resultados expuestos por nosotros en el presente trabajo permiten plantear la interesante hipótesis de que todas las cepas de DENV tendrían el potencial de ser transportadas hacia endosomas de reciclaje, pero la intervención de ciertos factores virales/celulares que aún desconocemos harían que algunas cepas sean dirigidas preferencialmente hacia los endosomas tardíos. Esta hipótesis surge del hecho que luego de su internalización, la ruta intracelular que sigue por defecto cualquier ligando es la vía de reciclaje, y su incorporación a la vía degradativa requiere de un proceso activo de marcación y selección, como por ejemplo la monoubiquitinación (Maxfield y McGraw, 2004). A diferencia del virus influenza, el virus dengue se comporta como un ligando no etiquetado para la vía degradativa, lo que sugiere que el proceso activo de selección y redireccionamiento operaría a nivel de los endosomas tempranos, probablemente evitando la acumulación de las partículas virales en las extensiones tubulares.

En concordancia con nuestros resultados que demuestran que a pesar de la falta de efecto inhibitorio del dominante negativo de Rab7 DENV sigue una ruta intracelular que lo conduce más allá de los endosomas tempranos, recientemente se demostró el requerimiento de la presencia de lípidos aniónicos para la fusión de DENV (Zaitseva *et al.*, 2010). El agregado de fosfatidilserina y bis(monoacilglicerol)fosfato a la composición de liposomas permitió la fusión de DENV-2 y DENV-4 en este sistema libre de células, mientras que la adición exógena de ambos lípidos a cultivos celulares produjo un incremento notable en la tasa de fusión viral. Dado que el bis(monoacilglicerol)fosfato es un lípido que se encuentra únicamente en los endosomas tardíos (Kobayashi *et al.*, 2002), los autores del trabajo concluyeron que la fusión de DENV ocurre en estos compartimentos endosomales y no en los endosomas tempranos carentes de lípidos ácidos. Nuestros resultados no son contradictorios con este reporte, ya que antecedentes bibliográficos revelan que si bien los endosomas de reciclaje no contienen bis(monoacilglicerol)fosfato, se encuentran enriquecidos en fosfatidilserina (Gagescu *et al.*, 2000) lípido aniónico que también facilita la penetración de DENV (Zaitseva *et al.*, 2010).

En este sentido, es interesante tener en cuenta que Kirshnan *et al.* (2007) revelaron que un pH cercano a 6,4 es suficiente para disparar la fusión de DENV-2 NGC. Esto sugiere que el ambiente de los endosomas de reciclaje, con un pH moderadamente ácido y una composición lipídica que incluye fosfatidilserina, provee un ambiente óptimo para la fusión de DENV, al igual que los endosomas tardíos. Desde el punto de vista funcional, el transporte de las partículas de DENV hacia endosomas de reciclaje o endosomas tardíos tiene un gran valor práctico, ya que estas organelas se encuentran ubicadas en la región perinuclear. La penetración viral en estos puntos estratégicos posicionaría al genoma en las inmediaciones de su sitio de replicación, las membranas derivadas del retículo endoplasmático.

Estudios recientes reportan una capacidad diferencial entre cepas de DENV de inducir la respuesta de interferón (Umareddy *et al.*, 2008). Un estudio *in vitro* destinado a analizar el rol de las moléculas TLR (*toll like receptors*), importantes receptores de reconocimiento de patógenos, en la identificación inmunológica de DENV tempranamente durante la infección, reveló que TLR-3 se activa fuertemente con la presencia del virus (Tsai *et al.*, 2009). Esta señalización mediada por TLR-3 es considerada como la respuesta más importante para la producción de interferón tipo I luego de la exposición de estructuras de ARN de doble cadena. Estos receptores se encuentran, dependiendo del tipo celular, en la superficie de la célula o en compartimentos endosomales cuya identidad aún no ha sido claramente dilucidada. Se ha demostrado que el reconocimiento de DENV-2 por TLR-3 ocurre en células monocíticas en

compartimentos endosomales y que se requiere del pH ácido endosomal disparador de la fusión viral para que ocurra dicho reconocimiento. Nuestros resultados que describen diferencias en el sitio de fusión según la cepa viral podrían estar directamente relacionados con las reportadas diferencias entre cepas en la activación de TLR-3 y consecuentemente la producción de interferón y citoquinas (Tsai *et al.*, 2009), factores fundamentales para entender la patogenia viral.

Consideraciones finales

A pesar de la creciente incidencia de DENV como patógeno humano al presente no existen vacunas o quimioterapia antiviral para la prevención o tratamiento de esta virosis.

Los antecedentes de nuestro laboratorio que documentan el comportamiento antiviral diferencial de DENV, dependiente de factores virales y celulares, frente a una clase de compuestos dirigidos a la entrada del virus, junto con el hallazgo aquí reportado de las vías de entrada alternativas a ser utilizadas para la internalización, tienen importantes implicancias en lo que respecta al diseño de agentes quimioterapéuticos que tengan como objetivo bloquear los pasos iniciales de la infección viral, ya que los mismos deberán estar dirigidos contra factores o mecanismos comunes utilizados por el virus en las distintas rutas endocíticas. Debe tenerse presente que, por la posibilidad cierta de infecciones secuenciales con diferentes serotipos de DENV que co-circulan en la población de una misma región geográfica, cualquier agente antiviral con perspectivas de uso terapéutico debe ser efectivo contra los cuatro serotipos virales. En este marco, las investigaciones presentadas en este trabajo proveen una nueva perspectiva para entender el complejo mecanismo de entrada a la célula de DENV y así encarar el desarrollo racional de agentes antivirales dirigidos a este blanco de acción para la prevención y tratamiento de esta enfermedad de creciente reemergencia global.

Bibliografía

- Aizaki, H.; Morikawa, K.; Fukasawa, M.; Hara, H.; Inoue, Y.; Tani, H.; Saito, K.; Nishijima, M.; Hanada, K.; Matsuura, Y.; Lai, M. M.; Miyamura, T.; Wakita, T.; Suzuki, T. (2008) Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol.* **82**: 5715-5724.
- Akhtar, J.; Shukla, D. (2009) Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* **276** :7228-7236.
- Almeida, A. P.; Baptista, S. S.; Sousa, C. A.; Novo, M. T.; Ramos, H. C.; Panella, N. A.; Godsey, M.; Simões, M. J.; Anselmo, M. L.; Komar, N.; Mitchell, C. J.; Ribeiro, H. (2005) Bioecology and vectorial capacity of *Aedes albopictus* (Diptera: *Culicidae*) in Macao, China, in relation to dengue virus transmission. *J Med Entomol.* **42**: 419-428.
- Álvarez, D. E.; De Lella Ezcurra, A. L.; Fucito, S.; Gamarnik, A. V. (2005a) Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* **339**: 200-212.
- Álvarez, D. E.; Lodeiro, M. F.; Ludueña, S. J.; Pietrasanta, L. I.; Gamarnik, A. V. (2005b) Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol.* **79**: 6631-6643.
- Amstutz, B.; Gastaldelli, M.; Kälin, S.; Imelli, N.; Boucke, K.; Wandeler, E.; Mercer, J.; Hemmi, S.; Greber, U. F. (2008) Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *EMBO J.* **27**: 956-969.
- 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, A. P.; Ng, M. M.; Chu, J. J. (2010) Small interference RNA profiling reveals the essential role of human membrane trafficking genes in mediating the infectious entry of dengue virus. *Viol J.* **7**: 24.
- Añez, G.; Men, R.; Eckels, K. H.; Lai, C. J. (2009) Passage of dengue virus type 4 vaccine candidates in fetal rhesus lung cells selects heparin-sensitive variants that result in loss of infectivity and immunogenicity in rhesus macaques. *J Virol.* **83**: 10384-10394.
- Avilés, G.; Paz, M. V.; Rangeon, G.; Ranaivoarisoa, M. Y.; Verzeri, N.; Roginski, S.; Baroni, P.; Enria, D. (2003) Laboratory surveillance of dengue in Argentina, 1995-2001. *Emerg Infect Dis.* **9**: 738-742.
- Avilés, G.; Rangeon, G.; Baroni, P.; Paz, V.; Monteros, M.; Sartini, J. L.; Enria, D. (2000) Outbreak of Dengue-2 virus in Salta, Argentina, 1988. *Medicina (B Aires).* **60**: 875-879.

- Avilés, G.; Rangeón, G.; Vorndam, V.; Briones, A.; Baroni, P.; Enria, D.; Sabattini, M. S. (1999) Dengue reemergence in Argentina. *Emerg Infect Dis.* **5**: 575-578.
- Babbey, C. M.; Ahktar, N.; Wang, E.; Chen, C. C.; Grant, B. D.; Dunn, K. W. (2006) Rab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* **17**: 3156–3175.
- Balsitis, S. J.; Coloma, J.; Castro, G.; Alava, A.; Flores, D.; McKerrow, J. H.; Beatty, P. R.; Harris, E. (2009) Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg.* **80**: 416-424.
- Barrero, P. R. y Mistchenko, A. S. (2004) Complete genome sequencing of dengue virus type 1 isolated in Buenos Aires, Argentina. *Virus Res* **101**: 135-145.
- Bartelma, G. y Padmanabhan, R. (2002) Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. *Virology* **299**: 122-132.
- Beer, C.; Andersen, D. S.; Rojek, A.; Pedersen, L. (2005) Caveola-dependent endocytic entry of amphotropic murine leukemia virus. *J Virol.* **79**: 10776-10787.
- 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. y Lamaze, C. (2007) Clathrin-coated pits: vive la différence? *Traffic* **8**: 970-982.
- 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.
- Bielefeldt-Ohmann, H. (1998) Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes. *Virus Res.* **57**: 63-79.
- Bielefeldt-Ohmann, H.; Meyer, M.; Fitzpatrick, D. R.; Mackenzie, J. S. (2001) Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res.* **73**: 81-89.
- Bishop, N. E. (1997) An update on non-clathrin-coated endocytosis. *Med Virol* **7**: 199-209.
- Blanchard, E.; Belouzard, S.; Goueslain, L.; Wakita, T.; Dubuisson, J.; Wychowski, C.; Rouillé, Y. (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* **80**: 6964-6972.
- Brabec, M.; Blaas, D.; Fuchs, R. (2006) Wortmannin delays transfer of human rhinovirus serotype 2 to late endocytic compartments. *Biochem Biophys Res Commun.* **348**: 741-749.

- Bright, N. A.; Gratian, M. J.; Luzio, J. P. (2005) Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr Biol.* **15**: 360-365.
- Bryant, J. E.; Calvert, A. E.; Mesesan, K.; Crabtree, M. B.; Volpe, K. E.; Silengo, S.; Kinney, R. M.; Huang, C. Y.; Miller, B. R.; Roehrig, J. T. (2007) Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth *in vitro* but not for growth in intrathoracically inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology* **366**: 415-423.
- Bubb, M.; Senderowicz, A.; Sausville, E.; Duncan, K., Korn, E. (1994) Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Bio. Chem.* **269**: 14869–14871.
- Bucci, C.; Parton, R. G.; Mather, I. H.; Stunnenberg, H.; Simons, K.; Hoflack, B.; Zerial, M. (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**: 715–728.
- Bulich, R. y Asakov, J. G. (1992) Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **73**: 2999-3003.
- Burckhardt, C. J. y Greber, U. F. (2009) Virus movements on the plasma membrane support infection and transmission between cells. *PLoS Pathog.* **5**: e1000621.
- Calisher, C. H. (1988) Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family *Flaviviridae*) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. *Acta Virol.* **32**: 469-478.
- Calisher, C. H.; Karabatsos, N.; Dalrymple, J. M.; Shope, R. E.; Porterfield, J. S.; Westaway, E. G.; Brandt, W. E. (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol.* **70**: 37-43.
- Cao-Lormeau, V. M. (2009) Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virol J.* **6**: 35.
- Castilla, V.; Mersich, S. E.; Candurra, N. A.; Damonte, E. B. (1994) The entry of Junín virus into Vero cells. *Arch. Virol.* **136**: 363-374.
- Cauchi, M. R.; Henchal, E. A.; Wright, P. J. (1991) The sensitivity of cell-associated dengue virus proteins to trypsin and the detection of trypsin-resistant fragments of the nonstructural glycoprotein NS1. *Virology* **180**: 659-667.
- Chandran, K.; Sullivan, N. J.; Felbor, U.; Whelan, S. P.; Cunningham, J. M. (2005) Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**: 1643–1645.

- Chang, S. J.; Chang, Y. X.; Izmailyan, R.; Tang, Y. L.; Chang, W. (2010) Vaccinia virus A25 and A26 proteins are fusion suppressors for mature virions and determine strain-specific virus entry pathways into HeLa, CHO-K1, and L cells. *J Virol.* **84**: 8422-8432.
- Chareonsirisuthigul, T.; Kalayanarooj, S.; Ubol, S. (2007) Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* **88**: 365-375.
- Chee, H. Y. y AbuBakar, S. (2004) Identification of a 48kDa tubulin or tubulin-like C6/36 mosquito cells protein that binds dengue virus 2 using mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* **320**: 11-17.
- Chen, Y.; Maguire, T.; Hileman, R. E.; Fromm, J. R.; Esko, J. D.; Linhardt, R. J.; Marks, R. M. (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* **3**: 866-871.
- Chen, Y. C.; Wang, S. Y.; King, C. C. (1999) Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol.* **73**: 2650-2657.
- Christoforidis, S.; Miaczynska, M.; Ashman, K.; Wilm, M.; Zhao, L.; Yip, S. C.; Waterfield, M. D.; Backer, J. M.; Zerial, M. (1999) Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* **1**: 249-252.
- Chu, J. J. H.; Leong, P. W. H.; Ng, M. L. (2006). Analysis of the endocytic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells. *Virology* **349**: 463-475.
- Chu, J. J. y Ng, M. L. (2004) Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol.* **78**: 10543-10555.
- Clement, C.; Tiwari, V.; Scanlan, P. M.; Valyi-Nagy, T.; Yue, B. Y.; Shukla, D. (2006) A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol.* **25**: 1009-1021.
- Clyde, K.; Kyle, J. L.; Harris, E. (2006) Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.* **80**: 11418-11431.
- Codran, A.; Royer, C.; Jaeck, D.; Bastien-Valle, M.; Baumert, T. F.; Kieny, M. P.; Pereira, C. A.; Martin, J. P. (2006) Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Gen Virol.* **87**: 2583-2593.
- Conner, S. D. y Schmid, S. L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**: 37-44.

- Coyne, C. B. y Bergelson, J. M. (2006) Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* **124**: 119-131.
- Crabtree, M. B.; Kinney, R. M.; Miller, B. R. (2005) Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. *Arch Virol.* **150**: 771-786.
- Dahlberg, J. E. (1974) Quantitative electron microscopic analysis of the penetration of VSV into L cells. *Virology* **58**: 250-262.
- Dales S. (1973) Early events in cell-animal virus interactions. *Bacteriol Rev.* **37**: 103-135.
- Damke, H.; Baba, T.; van der Blik, A. M.; Schmid, S. L. (1995) Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol.* **131**: 69-80.
- Damke, H.; Baba, T.; Warnock, D. E.; Schmid, S. L. (1994) Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* **127**: 915-934.
- Damm, E. M.; Pelkmans, L.; Kartenbeck, J.; Mezzacasa, A.; Kurzchalia, T.; Helenius, A. (2005) Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.***168**: 477–88.
- Damonte, E. B.; Pujol, C. A.; Coto, C. E. (2004) Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Adv Vir Res* **63**: 239-285.
- Dautry-Varsat A. (1986) Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie.* **68**: 375-381.
- Denizot, F. y Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**: 271-277.
- DeTulleo, L. y Kirchhausen, T. (1998) The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J.* **17**: 4585–4593.
- Diaz-Griffero, F.; Jackson, A. P.; Brojatsch, J. (2005) Cellular uptake of avian leukosis virus subgroup B is mediated by clathrin. *Virology* **337**: 45–54.
- Doherty, G. J. y McMahon, H. T. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* **78**: 857-902.
- Eash, S.; Querbes, W.; Atwood, W. J. (2004) Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol.* **78**: 11583-11590.
- Effler, P. V.; Pang, L.; Kitsutani, P.; Vorndam, V.; Nakata, M, Ayers, T.; Elm, J.; Tom, T.; Reiter, P.; Rigau-Perez, J. G.; Hayes, J. M.; Mills, K.; Napier, M.; Clark, G. G.; Gubler, D. J.;

- Hawaii Dengue Outbreak Investigation Team. (2005) Dengue fever, Hawaii, 2001–2002. *Emerg Infect Dis* **11**: 742–749.
- Egloff, M. P.; Benarroch, D.; Selisko, B.; Romette, J. L.; Canard, B. (2002) An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* **21**: 2757-2768.
- Ehrlich, M.; Boll, W.; Van Oijen, A.; Hariharan, R.; Chandran, K.; Nibert, M.L.; Kirchhausen T. (2004) Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell.* **118**: 591-605.
- Esko, J. D. y Selleck, S. B. (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem.* **71**: 435-471.
- Falgout, B. y Markoff, L. (1995) Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* **69**: 7232-7243.
- Feng, Y.; Press, B.; Wandinger-Ness A. (1995) Rab7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol.* **131**: 1435-1452.
- 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.
- Forzan, M.; Marsh, M.; Roy, P. (2007) Bluetongue virus entry into cells. *J. Virol.* **81**: 4819–4827.
- Fujimoto, L. M.; Roth, R.; Heuser, J. E.; Schmid, S. L. (2000) Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic* **1**: 161-171.
- Gagescu, R.; Demarex, N.; Parton, R. G.; Hunziker, W.; Huber, L. A.; Gruenberg, J. (2000) The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol Biol Cell.* **11**: 2775-2791.
- Germi, R.; Crance, J. M.; Garin, D.; Guimet, J.; Lortat-Jacob, H.; Ruigrok, R. W.; Zarski, J. P.; Drouet, E. (2002) Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* **292**: 162-168.
- Gerondopoulos, A.; Jackson, T.; Monaghan, P.; Doyle, N.; Roberts, L. O. (2010) Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *J Gen Virol.* **91**: 1428-1438.
- Ghigo, E. (2010) A dilemma for viruses and giant viruses: which endocytic pathway to use to enter cells? *Intervirology* **53**: 274-283.

- Gillooly, D. J.; Morrow, I. C.; Lindsay, M.; Gould, R.; Bryant, N. J.; Gaullier, J. M.; Parton, R. G.; Stenmark, H. (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* **19**: 4577-4588.
- Glebov, O. O.; Bright, N. A.; Nichols, B. J. (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* **8**: 46-54.
- Goncalvez, A. P.; Escalante, A. A.; Pujol, F. H.; Ludert, J. E.; Tovar, D.; Salas, R. A.; Liprandi, F. (2002) Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* **303**: 110-119.
- Gorvel, J. P.; Chavrier, P.; Zerial, M.; Gruenberg, J. (1991) rab5 controls early endosome fusion *in vitro*. *Cell* **64**: 915-925.
- Griffith, G.; Back, R.; Marsh, M. (1989) A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J Cell Biol.* **109**: 2703-2720.
- Grosshans, B. L.; Ortiz, D.; Novick, P. (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 11821-11827.
- Gruenberg J. (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 721-730.
- Gruenberg, A.; Woo, W. S.; Biedrzycka, A.; Wright, P. J. (1988) Partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of dengue virus type 2, New Guinea C and PUO-218 strains. *J. Gen. Virol.* **69**: 1391-1398.
- Grummer, B.; Grotha, S.; Greiser-Wilke, I. (2004) Bovine viral diarrhoea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* **51**: 427-432.
- Gubler, D. J. (2006) Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp.* **277**: 3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-253.
- Gubler, D. J. y Meltzer, M. (1999) Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res.* **53**: 35-70.
- Guirakhoo, F.; Hunt, A. R.; Lewis, J. G.; Roehrig, J. T. (1993) Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH. *Virology* **194**: 219-223.
- Gutiérrez, M.; Isa, P.; Sánchez-San Martín, C.; Pérez-Vargas, J.; Espinosa, R.; Arias, C. F.; López, S. (2010) Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* **84**: 9161-9169.
- Halstead, S. B. (1970) Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med.* **42**: 350-362.

- Halstead, S. B. (2006) Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica*. **20**: 407-415.
- Halstead, S. B. y O'Rourke, E. J. (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med*. **146**: 201-217.
- Hamel, E. (1996) Antimitotic natural products and their interactions with tubulin. *Med Res Rev*. **16**: 207–231.
- Hansen, C. G. y Nichols, B. J. (2009) Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci*. **122**: 1713-1721.
- Hase, T.; Summers, P. L.; Eckels, K. H. (1989) Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch Virol* **104**: 129-143.
- Heikkilä, O.; Susi, P.; Tevaluoto, T.; Härmä, H.; Marjomäki, V.; Hyypiä, T.; Kiljunen, S. (2010) Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by {beta}2-microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin. *J Virol*. **84**: 3666-3681.
- Helenius, A.; Kartenbeck, J.; Simons, K.; Fries, E. (1980) On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells. *J. Cell Biol*. **84**: 404–420.
- Henley, J. R.; Krueger, E. W.; Oswald, B. J.; McNiven, M. A. (1998). Dynamin mediated internalization of caveolae. *J. Cell Biol*. **141**: 85-99.
- Heuser, J. (1980) Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol*. **84**: 560-83.
- Hilgard, P. y Stockert, R. (2000) Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* **32**: 1069-1077.
- Huang, C. Y.; Lu, T. Y.; Bair, C. H.; Chang, Y. S.; Jwo, J. K.; Chang, W. (2008) A novel cellular protein, VPEF, facilitates vaccinia virus penetration into HeLa cells through fluid phase endocytosis. *J Virol*. **82**: 7988-7999.
- Huang, I. C.; Bosch, B. J.; Li, F.; Li, W.; Lee, K. H.; Ghiran, S.; Vasilieva, N.; Dermody, T. S.; Harrison, S. C.; Dormitzer, P. R.; Farzan, M.; Rottier, P. J.; Choe, H.; (2006) SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *J. Biol. Chem*. **281**: 3198–3203.
- Hung, S. L.; Lee, P. L.; Chen, H. W.; Chen, L. K.; Kao, C. L.; King, C. C. (1999) Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology* **257**: 156-167.
- International Committee on Taxonomy of Viruses Database Management (2006) 00.026.0.01.013 Dengue virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

- Ilangumaran, S. y Hoessli, D.C. (1988) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* **335**: 433-440.
- Ishak, R.; Tovey, D. G.; Howard, C. R. (1988) Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures. *J Gen Virol.* **69**: 325-335.
- Jessie, K.; Fong, M. Y.; Devi, S.; Lam, S. K.; Wong, K. T. (2004) Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *J Infect Dis.* **189**: 1411-1418.
- Jindadamrongwech, S.; Thepparit, C.; Smith, D. R. (2004) Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol.* **149**: 915-927.
- Johannsdottir, H. K.; 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.
- Johns, H. L.; Berryman, S.; Monaghan, P.; Belsham, G. J.; Jackson, T. (2009) A dominant-negative mutant of rab5 inhibits infection of cells by foot-and-mouth disease virus: implications for virus entry. *J Virol.* **83**: 6247-6256.
- Jordens, I.; Marsman, M.; Kuijl, C.; Neefjes, J. (2005) Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* **6**: 1070-1077.
- Jovic, M.; Sharma, M.; Rahajeng, J.; Caplan, S. (2010) The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol.* **25**: 99-112.
- Kauppi, M.; Simonsen, A.; Bremnes, B.; Vieira, A.; Callaghan, J.; Stenmark, H.; Olkkonen, V. M. (2002) The small GTPase Rab22 interacts with EEA1 and controls endosomal membrane trafficking. *J Cell Sci* **115**: 899-911.
- Kerr, M. C. y Teasdale, R. D. (2009) Defining macropinocytosis. *Traffic* **10**: 364-371.
- Kinney, R. M.; Butrapet, S.; Chang, G. J.; Tsuchiya, K. R.; Roehrig, J. T.; Bhamarapravati, N.; Gubler, D. J. (1997) Construction of infectious cDNA clones for dengue-2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* **230**: 300-308.
- Kirkham, M. y Parton, R. G. (2005) Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochem Biophys Acta* **1745**: 273-286.
- Ko, K. K.; Igarashi, A.; Fukai, K. (1979) Electron microscopic observations on *Aedes albopictus* cells infected with dengue viruses. *Arch Virol.* **62**: 41-52.
- Kobayashi, T.; Beuchat, M. H.; Chevallier, J.; Makino, A.; Mayran, N.; Escola, J. M.; Lebrand, C.; Cosson, P.; Kobayashi, T.; Gruenberg, J. (2002) Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem.* **277**: 32157-32164.

- Koivusalo, M.; Welch, C.; Hayashi, H.; Scott, C. C.; Kim, M.; Alexander, T.; Touret, N.; Hahn, K. M.; Grinstein, S. (2010) Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* **188**: 547-563.
- Kourí, G.; Guzmán, M. G.; Bravo, J. (1986) Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bull Pan Am Health Organ.* **20**: 24-30.
- Krishnan, M. N.; Sukumaran, B.; Pal, U.; Agaisse, H.; Murray, J. L.; Hodge, T. W.; Fikrig, E. (2007) Rab5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *J. Virol.* **81**: 4881-4885.
- Kuadkitkan, A.; Wikan, N.; Fongsaran, C.; Smith, D. R. (2010) Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology* **406**: 149-161.
- Kuhn, R. J.; Zhang, W.; Rossmann, M. G.; Pletnev, S. V.; Corver, J.; Lenches, E.; Jones, C. T.; Mukhopadhyay, S.; Chipman, P. R.; Strauss, E. G.; Baker, T. S.; Strauss, J. H. (2002) Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**: 717-725.
- Kuno, G.; Chang, G. J.; Tsuchiya, K. R.; Karabatsos, N.; Cropp, C. B. (1998) Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol.* **72**: 73-83.
- Laakkonen, J. P.; Mäkelä, A. R.; Kakkonen, E.; Turkki, P.; Kukkonen, S.; Peränen, J.; Ylä-Herttua, S.; Airene, K. J.; Oker-Blom, C.; Vihinen-Ranta, M.; Marjomäki, V. (2009) Clathrin-independent entry of baculovirus triggers uptake of *E. coli* in non-phagocytic human cells. *PLoS One* **4**: e5093.
- Lafourcade, C.; Sobo, K.; Kieffer-Jaquinod, S.; Garin, J.; van der Goot, F. G. (2008) Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One* **3**: e2758.
- Lakadamyali, M.; Rust, M. J.; Zhuang, X. (2006) Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* **124**: 997-1009.
- Lambrechts, L.; Scott, T. W.; Gubler, D. J. (2010) Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis.* **4**: e646.
- Langhorst, M. F.; Reuter, A.; Jaeger, F. A.; Wippich, F. M.; Luxenhofer, G.; Plattner, H.; Stuermer, C. A. (2008). Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1/flotillin-2. *Eur. J. Cell Biol.* **87**: 211-226.
- Lecot, S.; Belouzard, S.; Dubuisson, J.; Rouillé, Y. (2005) Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* **79**: 10826-10829.

- Lee, E.; Leang, S. K.; Davidson, A.; Lobigs, M. (2010) Both E protein glycans adversely affect dengue virus infectivity but are beneficial for virion release. *J Virol.* **84**: 5171-5180.
- Lee, C. J.; Lin, H. R.; Liao, C. L.; Lin, Y. L. (2008) Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J Virol.* **82**: 6470-6480.
- Lee, E.; Weir, R. C.; Dalgarno, L. (1997) Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. *Virology* **232**: 281-290.
- Lee, E.; Wright, P. J.; Davidson, A.; Lobigs, M. (2006) Virulence attenuation of Dengue virus due to augmented glycosaminoglycan-binding affinity and restriction in extraneural dissemination. *J Gen Virol.* **87**: 2791-2801.
- Lehmann, M. J.; Sherer, N. M.; Marks, C. B.; Pypaert, M.; Mothes, W. (2005) Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol.* **170**: 317-325.
- Levitzki, A.; Willingham, M.; Pastan, I. (1980) Evidence for participation in transglutaminase in receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 2707-2710.
- Li, H.; Clum, S.; You, S.; Ebner, K. E.; Padmanabhan, R. (1999) The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol.* **73**: 3108-3116.
- Lim, H. Y. y Ng, M. L. (1999) A different mode of entry by dengue-2 neutralisation escape mutant virus. *Arch Virol.* **144**: 989-995.
- Lin, Y. L.; Lei, H. Y.; Lin, Y. S.; Yeh, T. M.; Chen, S. H.; Liu, H. S. (2002) Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. *Antivir Res* **56**: 93-96.
- Lindenbach, B. D. y Rice, C. M. (2001) *Flaviridae*: the viruses and their replication. En: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds.), *Fundamental Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 589-639.
- Lindenbach, B. D. y Rice, C. M. (2003) Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* **59**: 23-61.
- Littaua, R.; Kurane, I.; Ennis, F. A. (1990) Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol.* **144**: 3183-3186.
- Long, G.; Pan, X.; Kormelink, R.; Vlak, J. M. (2006) Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* **80**: 8830-8833.
- Lozach, P. Y.; Burleigh, L.; Staropoli, I.; Navarro-Sanchez, E.; Harriague, J.; Virelizier, J. L.; Rey, F. A.; Desprès, P.; Arenzana-Seisdedos, F.; Amara, A. (2005) Dendritic cell-

- specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem.* **280**: 23698-23708.
- Lozach, P. Y.; Mancini, R.; Bitto, D.; Meier, R.; Oestereich, L.; Overby, A. K.; Pettersson, R. F.; Helenius, A. (2010) Entry of bunyaviruses into mammalian cells. *Cell Host Microbe.* **7**: 488-499.
- Luzio, J. P.; Parkinson, M. D.; Gray, S. R.; Bright, N. A. (2009) The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochem Soc Trans.* **37**: 1019-1021.
- Macia, E.; Ehrlich, M.; Massol, R.; Boucrot, E.; Brunner, C.; Kirchhausen, T. (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10**: 839-850.
- Macovei, A.; Radulescu, C.; Lazar, C.; Petrescu, S.; Durantel, D.; Dwek, R. A.; Zitzmann, N.; Nichita, N. B. (2010) Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J Virol.* **84**: 243-253.
- Magadan, J. G.; Barbieri, M. A.; Mesa, R.; Stahl, P. D.; Mayorga, L. S. (2006) Rab22a regulates the sorting of transferrin to recycling endosomes. *Mol Cell Biol* **26**: 2595–2614.
- Manna, D.; Aligo, J.; Xu, C.; Park, W. S.; Koc, H.; Do Heo, W.; Konan, K. V. (2010) Endocytic Rab proteins are required for hepatitis C virus replication complex formation. *Virology* **398**: 21-37.
- Mannová, P. y Forstová, J. (2003) Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J Virol.* **77**: 1672-81.
- Maréchal, V.; Prevost, M. C.; Petit, C.; Perret, E.; Heard, J. M.; Schwartz, O. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol.* **75**: 11166-11177.
- Marianneau, P.; Mégret, F.; Olivier, R.; Morens, D. M.; Deubel, V. (1996) Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *J Gen Virol.* **77**: 2547-2554.
- Marsh, M.; Bolzau, E.; Helenius, A. (1983) Penetration of Semliki Forest virus from acidic prelysosomal vacuoles. *Cell* **32**: 931-940.
- Marsh, M. y Helenius, A. (2006) Virus entry: open sesame. *Cell* **124**: 729-740.
- Martínez-Barragán, J. J. y del Angel, R. M. (2001) Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J Virol.* **75**: 7818-7827.
- Martinez, M. G.; Forlenza, M. B.; Candurra, N. A. (2009) Involvement of cellular proteins in Junín arenavirus entry. *Biotechnol J.* **4**: 866-870.

- Martinez, O. y Goud, B. (1998) Rab proteins. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1404**: 101-112.
- Masuh, E (2008) Re-emergence of dengue in Argentina: Historical development and future challenges. *Dengue Bulletin* **32**, 44-54.
- Matlin, K. S.; Reggio, H.; Helenius, A.; Simons, K. (1982) The pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J. Mol. Biol.* **156**: 609–631.
- Maxfield y McGraw (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**: 121-132.
- Mayor, S. y Pagano, R. E. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**: 603-612.
- Meertens, L.; Bertaux, C.; Dragic, T. (2006) Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J. Virol.* **80**: 11571–11578.
- Meier, O.; Boucke, K.; Hammer, S. V.; Keller, S.; Stidwill, R. P.; Hemmi, S.; Greber, U. F. (2002) Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol.* **158**: 1119-11131.
- Mercado-Curiel, R. F.; Black, W. C. 4th; Muñoz, M. de L. (2008) A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol.* **8**: 118.
- Mercado-Curiel, R. F.; Esquinca-Avilés, H. A.; Tovar, R.; Díaz-Badillo, A.; Camacho-Nuez, M.; Muñoz, M. de L. (2006) The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol.* **6**: 85.
- Mercer, J. y Helenius A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **25**: 531-535.
- Mercer, J.; Schelhaas, M.; Helenius, A. (2010) Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem.* **79**: 803-833.
- Mesa, R.; Salomón, C.; Roggero, M.; Stahl, P. D.; Mayorga, L. S. (2001) Rab22a affects the morphology and function of the endocytic pathway. *J Cell Sci.* **114**: 4041-4049.
- Miller, J. L.; de Wet, B. J.; Martinez-Pomares, L.; Radcliffe, C. M.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M.; Gordon, S. (2008) The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog.* **4**: e17.
- Miller, S. y Krijnse-Locker, J. (2008) Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol.* **6**: 363-374.
- Miller, S.; Kastner, S.; Krijnse-Locker, J.; Bühler, S.; Bartenschlager, R. (2006a) The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem.* **282**: 8873-8882.

- Miller, S.; Sparacio, S.; Bartenschlager, R. (2006b) Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem.* **281**: 8854-8863.
- Misinzo, G.; Delputte, P. L.; Lefebvre, D. J.; Nauwynck, H. J. (2009) Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion. *Virus Res.* **139**: 1-9.
- 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, S. C. (2003) A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 6986-6991.
- Modis, Y.; Ogata, S., Clements, D.; Harrison, S.C. (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* **427**: 313-319.
- Monath, T. P. (1988) Japanese encephalitis--a plague of the Orient. *N Engl J Med.* **319**: 641-643.
- Monath, T. P. (1994) Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 2395-2400.
- Mondotte, J. A.; Lozach, P. Y.; Amara, A.; Gamarnik, A. V. (2007) Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J Virol.* **81**: 7136-7148.
- Morales, M. A.; Lejona, S.; Acebal, S.; Uboldi, A.; Anchar, E.; Chumpitaz, A.; Tomisani, A.; García, J.; Fabbri, C.; Luppo, V.; Levis, S.; Enría, D. A. (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.
- Moreno-Altamirano, M. M.; Sánchez-García, F. J.; Muñoz, M. L. (2002) Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J Gen Virol.* **83**: 1123-1130.
- Morton, W.; Ayscough, K.; McLaughlin, P. (2000) Latrunculin alters the actin monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nat Cell Biol.* **2**: 376-378.
- Mosso, C.; Galván-Mendoza, I. J.; Ludert, J. E.; Del Angel, R. M. (2008) Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* **378**: 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.

- Muñoz, M. L.; Cisneros, A.; Cruz, J.; Das, P.; Tovar, R.; Ortega, A. (1998) Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol Lett.* **168**: 251-258.
- 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.
- Natiello, M.; Ritacco, V.; Morales, M. A.; Deodato, B.; Picollo, M.; Dinerstein, E.; Enria, D. (2008) Indigenous dengue fever, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis.* **14**: 1498-1499.
- Navarro-Sanchez, E.; Altmeyer, R.; Amara, A.; Schwartz, O.; Fieschi, F.; Virelizier, J. L.; 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**: 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.* **84**: 1737-1741.
- Neff, J. M.; Morris, L.; Gonzalez-Alcover, R.; Coleman, P. H.; Lyss, S. B.; Negrón, H. (1967) Dengue fever in a Puerto Rican community. *Am J Epidemiol.* **86**: 162-184.
- Ng, M. L. y Lau, L. C. (1988) Possible involvement of receptors in the entry of Kunjin virus into Vero cells. *Arch Virol.* **100**: 199-211.
- Nichols, B.J. y Lippincott-Schwartz, J. (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* **11**: 406-412.
- Nielsen, E.; Severin, F.; Backer, J. M.; Hyman, A. A.; Zerial, M. (1999) Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol* **1**: 376-382.
- Noisakran, S.; Gibbons, R. V.; Songprakhon, P.; Jairungsri, A.; Ajariyakhajorn, C.; Nisalak, A.; Jarman, R. G.; Malasit, P.; Chokeyphaibulkit, K.; Perng, G. C. (2009) Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* **40**: 253-262.
- Noisakran, S.; Onlamoon, N.; Songprakhon, P.; Hsiao, H-M.; Chokeyphaibulkit, K.; Perng, G. C. (2010) Cells in Dengue Virus Infection *In Vivo*. *Advances in Virology* **2010**: ID 164878.
- Nomaguchi, M.; Ackermann, M.; Yon, C.; You, S.; Padmanabhan, R. (2003) De novo synthesis of negative-strand RNA by Dengue virus RNA-dependent RNA polymerase *in vitro*: nucleotide, primer, and template parameters. *J Virol.* **77**: 8831-8842.

- Oh, P.; McIntosh, D. P.; Schnitzer, J. E. (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.
- Organización Mundial de la Salud (2009) Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. ISBN 978 92 4 154787 1.
- Paingankar, M. S.; Gokhale, M. D.; Deobagkar, D. N. (2010) Dengue-2-virus-interacting polypeptides involved in mosquito cell infection. *Arch Virol*. **155**: 1453-1461.
- Palmgren, M. G. (1992) Acridine Orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. *Anal. Biochem*. **192**: 316-321.
- Parte de Prensa N° 23 del Ministerio de Salud (2010) Situación de dengue en Argentina. [http://www.msal.gov.ar/archivos/Dengue%20parte%20de%20prensa%2030-05 2010.pdf](http://www.msal.gov.ar/archivos/Dengue%20parte%20de%20prensa%2030-05%202010.pdf)
- Parton, R. G. y Richards, A. A. (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* **4**: 724-738.
- Payne, C. K.; Jones, S. A.; Chen, C.; Zhuang, X. (2007) Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic* **8**: 389-401.
- Pelkmans, L. (2005) Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochem Biophys Acta* **1746**: 295-304.
- 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**: 473-483.
- Pelkmans, L.; Püntener, D.; Helenius, A. (2002) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**: 535-539.
- Peng, T.; Wang, J. L.; Chen, W.; Zhang, J. L.; Gao, N.; Chen, Z. T.; Xu, X. F.; Fan, D. Y.; 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**: 139-145.
- Pernet, O.; Pohl, C.; Ainouze, M.; Kweder, H.; Buckland, R. (2009) Nipah virus entry can occur by macropinocytosis. *Virology*. **395**: 298-311.
- Pietiäinen, V.; Marjomäki, V.; Upla, P.; Pelkmans, L.; Helenius, A.; Hyypiä, T. (2004) Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol Biol Cell*. **15**: 4911-2495.
- Piper, R. C. y Katzmann, D. J. (2007) Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **23**: 519-547.
- Pokidysheva, E.; Zhang, Y.; Battisti, A. J.; Bator-Kelly, C. M.; Chipman, P. R.; Xiao, C.; Gregorio, G. G.; Hendrickson, W. A.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G. (2006) Cryo-EM

- reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell* **124**: 485-493.
- Praefcke, G. J. y McMahon, H. T. (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**: 133-147.
- Press, B.; Feng, Y.; Hoflack, B.; Wandinger-Ness A. (1998) Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J Cell Biol.* **140**: 1075-1089.
- Proikas-Cezanne, T.; Gaugel, A.; Frickey, T.; Nordheim, A. (2006) Rab14 is part of the early endosomal clathrin-coated TGN microdomain. *FEBS Lett* **580**: 5241-5246.
- Qualmann, B.; Kessels, M. M.; Kelly, R. B. (2000) Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* **150**: F111-F116.
- Quirin, K.; Eschli, B.; Scheu, I.; Poort, L.; Kartenbeck, J.; Helenius, A. (2008) Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. *Virology* **378**: 21-33.
- Raghu, H.; Sharma-Walia, N.; Veetil, M. V.; Sadagopan, S.; Chandran, B. (2009) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *J Virol.* **83**: 4895-4911.
- Ramos-Castañeda, J.; Imbert, J. L.; Barrón, B. L.; Ramos, C. (1997) A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *J Neurovirol.* **3**: 435-440.
- Randolph, V. B. y Stollar, V. (1990) Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J Gen Virol.* **71**: 1845-1850.
- Reyes-Del Valle, J.; Chávez-Salinas, S.; Medina, F.; Del Angel, R. M. (2005) Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* **79**: 4557-4567.
- Rink, J.; Ghigo, E.; Kalaidzdis, Y.; Zerial, M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**: 735-749.
- Rodal, S. K.; 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**: 961-974.
- Rodenhuis-Zybert, I. A.; Wilschut, J.; Smit, J. M. (2010) Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.* **67**: 2773-2786.

- Rojek, J. M.; Perez, M.; Kunz, S. (2008) Cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol.* **82**: 1505-1517.
- Rosenthal, K. S.; Killius, J.; Hodnichak, C. M.; Venetta, T. M.; Gyurgyik, L.; Janiga, K. (1989) Mild acidic pH inhibition of the major pathway of herpes simplex virus entry into HEp-2 cells. *J. Gen. Virol.* **70**: 857-867.
- Roth y Porter (1964) Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Cell Biol.* **20**: 313-332.
- Rothwell, S. W.; Putnak, R.; La Russa, V. F. (1996) Dengue-2 virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigen-positive stromal cells. *Am J Trop Med Hyg.* **54**: 503-510.
- Rust, M. J.; Lakadamyali, M.; Zhang, F.; Zhuang, X. (2004) Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol.* **11**: 567-573.
- Sabharanjak, S.; Sharma, P.; Parton, R. G.; Mayor, S. (2002) GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Dev Cell.* **2**: 411-423.
- Saeed, M. F.; Kolokoltsov, A. A.; Albrecht, T.; Davey, R. A. (2010) Cellular Entry of Ebola Virus Involves Uptake by a Macropinocytosis-Like Mechanism and Subsequent Trafficking through Early and Late Endosomes. *PLoS Pathog.* **6**: e1001110.
- Sakoonwatanyoo, P.; Boonsanay, V.; Smith, D. R. (2006) Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein. *Intervirology.* **49**: 161-172.
- Salas-Benito, J. S. y del Angel R. M. (1997) Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J Virol.* **71**: 7246-7252.
- Salas-Benito, J.; Reyes-Del Valle, J.; Salas-Benito, M.; Ceballos-Olvera, I.; Mosso, C.; del Angel, R. M. (2007) Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein. *Am J Trop Med Hyg.* **77**: 283-290.
- Samsa, M. M.; Mondotte, J. A.; Iglesias, N. G.; Assunção-Miranda, I.; Barbosa-Lima, G.; Da Poian, A. T.; Bozza, P. T.; Gamarnik, A. V. (2009) Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* **5**: e1000632.
- 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* **168**: 155-163.

- Sánchez-San Martín, C.; López, T.; Arias, C. F.; López, S. (2004) Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol* **78**: 2310-2318.
- Sangiambut, S.; Keelapang, P.; Aaskov, J.; Puttikunt, C.; Kasinrerak, W.; Malasit, P.; Sittisombut, N. (2008) Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. *J. Gen. Virol.* **89**: 1254-1264.
- Seijo, A. (2009) Dengue 2009: cronología de una epidemia. *Arch Argent Pediatr.* **107**: 387-389.
- Seijo, A.; Romer, Y.; Espinosa, M.; Monroig, J.; Giamperetti, S.; Ameri, D.; Antonelli, L. G. (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.
- Sheff, D. R.; Daro, E. A.; Hull, M.; Mellman, I. (1999) The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Cell Biol* **145**: 123-139.
- Sieczkarski, S.B. y Whittaker, G.R. (2002a) Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* **83**: 1535-1545.
- Sieczkarski, S.B. y Whittaker, G.R. (2002b) Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **76**: 10455-10464.
- Sieczkarski, S. B. y Whittaker, G. R. (2003) Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic* **4**: 333-343.
- Simpson, J. C.; Griffiths, G.; Wessling-Resnick, M.; Fransen, J. A.; Bennett, H.; Jones, A. T. (2004) A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J Cell Sci* **117**: 6297-6311.
- Singh, I. y Helenius, A. (1992) Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J Virol* **66**: 7049-7058.
- Smith, T. J.; Brandt, W. E.; Swanson, J. L.; McCown, J. M.; Buescher, E. L. (1970) Physical and biological properties of dengue-2 virus and associated antigens. *J Virol.* **5**: 524-32.
- Spoden, G.; Freitag, K.; Husmann, 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* **3**: e3313.
- Stan RV. (2005) Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta.* **1746**: 334-348.
- Stein, B. S.; Gowda, S. D.; Lifson, J. D.; Penhallow, R. C.; Bensch, K. G.; Engleman, E. G. (1987) pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**:659-668.

- Steinhauer, D. A. y Holland, J. J. (1987) Rapid evolution of RNA viruses. *Annu Rev Microbiol.* **41**: 409-433.
- Stenmark, H.; Parton, R. G.; 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. y Heinz, F. X. (2006) Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol.* **87**: 2755-2766.
- Stone, M.; Jia, S.; Heo, W. D.; Meyer, T.; Konan, K. V. (2007) Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J Virol* **81**: 4551-4563.
- Stossel, T.P. (1989) From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmatic actin assembly. *J. Biol. Chem.* **264**: 18261–18264.
- Suksanpaisan, L.; Susantad, T.; Smith, D. R. (2009) Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *J Biomed Sci.* **16**: 17.
- Summers, P. L.; Cohen, W. H.; Ruiz, M. M.; Hase, T.; Eckels, K. H. (1989) Flaviviruses can mediate fusion from without in *Aedes albopictus* mosquito cell cultures. *Virus Res.* **12**: 383-932.
- Swanson, J. A. y Watts, C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* **5**: 424-428.
- Talarico, L. B. (2008) Caracterización de la actividad antiviral de polisacáridos sulfatados contra el virus dengue. Biblioteca Dr. Luis Federico Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, pp. 96-97.
- Talarico, L. B. y Damonte, E. B. (2007) Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. *Virology* **363**: 473-485.
- Talarico, L. B.; Duarte, M. E. R.; Zibetti, R. G. M.; Nosedá, M. D.; Damonte, E. B. (2007) An algal-derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection. *Planta Medica* **73**: 1464-1468.
- Talarico, L. B.; Pujol, C. A.; Zibetti, R. G. M.; Faría, P. C. S.; Nosedá, M. D.; Duarte, M. E. R.; Damonte, E. B. (2005) The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Res.* **66**: 103-110.
- Tan, B. H.; Fu, J.; Sugrue, R. J.; Yap, E. H.; Chan, Y. C.; Tan, Y.H. (1996) Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology* **216**: 317-325.
- Tassaneeritthep, B.; Burgess, T. H.; Granelli-Piperno, A.; Trumpfheller, C.; Finke, J.; Sun, W.; Eller, M. A.; Pattanapanyasat, K.; Sarasombath, S.; Birx, D. L.; Steinman, R. M.; Schlesinger, S.; Marovich, M. A. (2003) DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* **197**: 823-829.

- Thein, S.; Aung, M. M.; Shwe, T. N.; Aye, M.; Zaw, A.; Aye, K.; Aye, K. M.; Aaskov, J. (1997) Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* **56**: 566-572.
- Thepparit, C. y Smith, D. R. (2004) Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol.* **78**: 12647-12656.
- Tomori, O. (1999) Impact of yellow fever on the developing world. *Adv Virus Res.* **53**: 5-34.
- Torres, J. R. y Castro, J. (2007) The health and economic impact of dengue in Latin America. *Cad Saude Publica.* **23**: 23-31.
- Tsai, Y. T.; Chang, S. Y.; Lee, C. N.; Kao, C. L. (2009) Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell Microbiol.* **11**: 604-615.
- Uchil, P. D. y Mothes, W. (2009) HIV Entry Revisited. *Cell* **137**: 402-404.
- Ullrich, O.; Reinsch, S.; Urbé, S.; Zerial, M.; Parton, R. G. (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol.* **135**: 913-924.
- Umareddy, I.; Tang, K. F.; Vasudevan, S. G.; Devi, S.; Hibberd, M. L.; Gu, F. (2008) Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines. *J Gen Virol.* **89**: 3052-3062.
- Valle, R. P. y Falgout, B. (1998) Mutagenesis of the NS3 protease of dengue virus type 2. *J Virol.* **72**: 624-632.
- van Dam, E. M.; Ten Broeke, T.; Jansen, K.; Spijkers, P.; Stoorvogel, W. (2002) Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem.* **277**: 48876-48883.
- van der Schaar, H. M.; Rust, M. J.; Chen, C.; van der Ende-Metselaar, H.; Wilschut, J.; Zhuang, X.; Smit, J. M. (2008) Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathogens* **4**: e1000244.
- van der Schaar, H. M.; Rust, M. J.; Waarts, B. L.; van der Ende-Metselaar, H.; Kuhn, R. J.; Wilschut, J.; Zhuang, X.; Smit, J. M. (2007) Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J. Virol.* **81**: 12019-12028.
- Van Hamme, E.; Dewerchin, H. L.; Cornelissen, E.; Verhasselt, B.; Nauwynck, H. J. (2008) Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin. *J Gen Virol.* **89**: 2147-2156.
- Vanlandingham, P. A. & Ceresa, B. P. (2009) Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration. *J Biol Chem.* **284**: 12110-12124.

- Vendeville, A.; Ravallec, M.; Jousset, F. X.; Devise, M.; Mutuel, D.; López-Ferber, M.; Fournier, P.; Dupressoir, T.; Ogliastro, M. (2009) Dengue virus infectious pathway requires clathrin-mediated endocytosis followed by trafficking to the nucleus. *J Virol.* **83**: 4678-4689.
- Vezzani, D. y Carbajo, A. E. (2008) *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **103**: 66-74.
- Vidricaire, G. y Tremblay, M. J. (2007) A clathrin, caveolae, and dynamin-independent endocytic pathway requiring free membrane cholesterol drives HIV-1 internalization and infection in polarized trophoblastic cells. *J Mol Biol.* **368**: 1267-1283.
- Vonderheit, A. y Helenius, A. (2005) Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki Forest virus to late endosomes. *PLoS Biology* **3**: 1225-1238.
- Wang, W. K.; Lin, S. R.; Lee, C. M.; King, C. C.; Chang, S. C. (2002a) Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J Virol.* **76**: 4662-4665.
- Wang, L.H.; Rothberg, K.G.; Anderson, R.G. (1993) Miss-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* **123**: 1107-1117.
- Wang, W. K.; Sung, T. L.; Lee, C. N.; Lin, T. Y.; King, C. C. (2002b) Sequence diversity of the capsid gene and the nonstructural gene NS2B of dengue-3 virus in vivo. *Virology* **303**: 181-191.
- Wang, W. K.; Sung, T. L.; Tsai, Y. C.; Kao, C. L.; Chang, S. M.; King, C. C. (2002c) Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* **40**: 4472-4478.
- Wang, J. L.; Zhang, J. L.; Chen, W.; Xu, X. F.; Gao, N.; Fan, D. Y.; An, J. (2010) Roles of small GTPase Rac1 in the regulation of actin cytoskeleton during dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* **4**: pii: e809.
- Ward, E. S.; Martinez, C.; Vaccaro, C.; Zhou, J.; Tang, Q.; Ober, R. J. (2005) From sorting endosomes to exocytosis: association of Rab4 and Rab11 GTPases with the Fc receptor, FcRn, during recycling. *Mol Biol Cell.* **16**: 2028-2038.
- Wei, T.; Chen, H.; Ichiki-Uehara, T.; Hibino, H.; Omura, T. (2007) Entry of Rice dwarf virus into cultured cells of its insect vector involves clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* **81**: 7811-7815.
- Wei, H. Y.; Jiang, L. F.; Fang, D. Y.; Guo, H. Y. (2003) Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides. *J Gen Virol.* **84**: 3095-3098.

- Welsch, S.; Miller, S.; Romero-Brey, I.; Merz, A.; Bleck, C. K. E.; Walther, P.; Fuller, S. D.; Antony, C.; Krijnse-Locker, J.; Bartenschlager, R. (2009) Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microb* **5**: 365-375
- Wong, W. T.; Kraus, M. H.; Carlomagno, F.; Zelano, A.; Druck, T.; Croce, C. M.; Huebner, K.; Di Fiore, P. P. (1998) The human eps15 gene, encoding a tyrosine kinase substrate, is conserved in evolution and maps to 1p31-p32. *Oncogene* **9**: 1591-7.
- Woo, J. M.; 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, S. J.; Grouard-Vogel, G.; Sun, W.; Mascola, J. R.; Brachtel, E.; Putvatana, R.; Louder, M. K.; Filgueira, L.; Marovich, M. A.; Wong, H. K.; Blauvelt, A.; Murphy, G. S.; Robb, M. L.; Innes, B. L.; Birx, D. L.; Hayes, C. G.; Frankel, S. S. (2000) Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* **6**: 816-820.
- You, S.; Falgout, B.; Markoff, L.; Padmanabhan, R. (2001) *In vitro* RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *J Biol Chem.* **276**: 15581-15591.
- Yu, I. M.; Zhang, W.; Holdaway, H. A.; Li, L.; Kostyuchenko, V. A.; Chipman, P. R.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G.; Chen, J. (2008) Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* **319**: 1834-1837.
- Zaitseva, E.; Yang, S. T.; Melikov, K.; Pourmal, S.; Chernomordik, L. V. (2010) Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathog.* **6**: e1001131.
- Zamudio-Meza, H.; Castillo-Alvarez, A.; González-Bonilla, C.; Meza, I. (2009) Cross-talk between Rac1 and Cdc42 GTPases regulates formation of filopodia required for dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells. *J Gen Virol.* **90**: 2902-2911.
- Zargar, S.; Wani, T. A.; Jain, S. K. (2010) Morphological changes in vero cells postinfection with dengue virus type-2. *Microsc Res Tech.* En prensa DOI 10.1002/jemt.20908
- Zhang, W.; Chipman, P. R.; Corver, J.; Johnson, P. R.; Zhang, Y.; Mukhopadhyay, S.; Baker, T. S.; Strauss, J. H.; Rossmann, M. G.; Kuhn, R. J. (2003) Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol.* **10**: 907-912.

- Zhang, Y.; Zhang, W.; Ogata, S.; Clements, D.; Strauss, J. H.; Baker, T. S.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G. (2004) Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* **12**: 1607-1618.
- Zybert, I. A.; van der Ende-Metselaar, H.; Wilschut, J.; Smit, J. M. (2008) Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J Gen Virol.* **89**: 3047-3051.