



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO DE QUÍMICA
-INSTITUTO DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“EFECTO DE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE DENGUE
SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES SUPRESORES DE LA
RESPUESTA INMUNE ANTIVIRAL”**

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS EN EL ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

PRESENTA:
M.C. TANIA ESTRADA JIMÉNEZ

DIRECTOR DE LA TESIS: DC LOURDES MILLÁN PÉREZ
ASESOR DE TESIS: DC JULIO REYES LEYVA.

NOVIEMBRE 2015

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIOR-IMSS), Metepec Atlixco, Puebla y en el Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP), Puebla, Pue; bajo la dirección del D. en C. Julio Roberto Reyes Leyva (CIBIOR-IMSS) y de la D. en C. Lourdes Millán Pérez Peña (Centro de Química-ICUAP).

La realización de esta Tesis fue financiada por:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Beca de doctorado-Número de registro 209881.
- Redes Temáticas: CA-147BUAP-SEP, 2012-2014
- Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por el Fondo de Investigación en Salud: FIS/IMSS/PROT/G11/927 (número de matrícula 98220625)

AGRADECIMIENTOS:

A mis asesores de tesis:

Lourdes Millán Pérez Peña. Por su dedicación y sus consejos, generosidad en la guía por el conocimiento a lo largo de la realización de esta tesis-

Julio Reyes Leyva: Por la confianza y el apoyo que siempre me brindo a través de su conocimiento y su acertada dirección para la culminación de este trabajo.

A mis revisores de tesis:

Verónica Vallejo, Lilian Flores, Gerardo Santos, Virginia Sedeño, Judith González, José Luis Montiel e Irma Herrera. Por su disposición y generosidad quienes siempre tuvieron aportaciones enriquecedoras para la realización de esta tesis.

A la Dra. Nora Rosas Murrieta Por su colaboración para la elaboración de este trabajo de tesis.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio especialmente a Rosario, Ángeles, Luis, Alberto, Carolina, José Luis, Jaqueline, Helen, Viviana. Que compartieron conmigo mis aciertos y destinos en el laboratorio y que me ayudaron a mantener una sonrisa y actitud positiva durante mi paso por el doctorado.

A la todo el equipo de apoyo técnico de laboratorio del CIBIOR.

A mi familia.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN	9
1 ANTECEDENTES GENERALES.....	14
1.1 Virus de dengue.....	14
1.2 Ciclo viral	17
1.3 Epidemiología.....	21
1.4 Cuadro clínico.....	23
1.5 Inmunopatogénesis del dengue.....	25
1.6 Respuesta inmune innata	28
1.6.1 IFN tipo I.....	30
1.6.2 Vía JAK-STAT.....	31
1.6.3 IFN tipo II.....	34
1.7 Regulación de la expresión de IFN	37
1.7.1 Proteínas SOCS-1 y SOCS-3	38
1.7.2 Proteína PIAS-1	42
2 ANTECEDENTES PARTICULARES.....	45
2.1 Evasión de la respuesta antiviral	45
2.2 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune del virus de dengue.....	47
3 JUSTIFICACIÓN.	49
4 HIPÓTESIS.....	49
5 OBJETIVO GENERAL.....	50
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
7 MATERIAL Y MÉTODOS:	51
7.1 Cultivo de las líneas celulares	51
7.2 Replicación viral.....	51
7.3 Titulación viral	52
7.4 Diferenciación e infección de las células U937	53
7.5 RT-PCR punto final.....	54
7.6 Análisis por densitometría de los productos de PCR	55
7.7 RT-PCR en Tiempo Real.....	56
7.7.1 Transcripción reversa	56
7.7.2 PCR en tiempo real	56

7.7.3	Validación de la PCR en Tiempo Real	58
7.8	Determinación de las proteínas por Western blot	59
7.8.1	Preparación de los extractos celulares totales	59
7.8.2	Determinación de la concentración de proteínas	59
7.8.3	Electroforesis.....	60
7.8.4	Electrotransferencia.....	61
7.8.5	Inmunorrevelado.....	61
7.8.6	Densitometría	63
7.9	Inmunofluorescencia	63
7.10	Silenciamiento de SOCS-1 y SOCS-3.....	64
8	RESULTADOS	66
8.1	Replicación viral.....	66
8.1.1	Infección de los macrófagos humanos U937.....	68
8.2	Efecto del tratamiento con IFN-a sobre el título viral en macrófagos U937 infectados	70
8.3	Análisis de las proteínas STAT1 y STAT2 de la vía JAK-STAT.....	72
8.4	Determinación de la localización celular de STAT1-p	75
8.5	Determinación del mensajero de genes con actividad antiviral activados por la vía JAK-STAT	77
8.6	Determinación de las proteínas PIAS-1, SOCS-1 y SOCS-3	82
8.6.1	RT-PCR Semicuantitativo	82
8.6.2	RT-PCR en Tiempo Real	84
8.7	Determinación de la presencia de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3.....	92
8.8	Silenciamiento de SOCS-1 y SOCS-3.....	96
9	DISCUSIÓN	101
10	CONCLUSIONES	106
11	BIBLIOGRAFIA.....	108
12	ANEXOS.....	126
12.1	ANEXO 1 Gráficas densitometría STATs.....	126

ABREVIATURAS.

DENV	Virus de dengue
DH	Dengue hemorrágico
FD	Fiebre por dengue
GAS	Sitio de señalización activado por interferón gamma
HCV	Virus de la hepatitis C
HSV	Herpes virus
IAV	Virus de influenza A
IFN	Interferón
IFNAR	Receptor de interferón alpha
IFNGR	Receptor de interferón gamma
IkB	Inhibidor de NF-kB
IRF	Factor de respuesta a IFN
ISG	Genes estimulados por interferón
ISGF	Factor genético estimulado por interferón
ISRE	Elementos de respuesta estimulados por interferón
JAK	Cinasa de Janus
JEV	Virus de la encefalitis Japonesa
MIP-1	Proteína inflamatoria de macrófagos-1
MDA	Proteína activada por mitógenos
MxA	Gen de resistencia a mixovirus A
NF-kB	Factor Nuclear kB

NS	Proteína no estructural
OAS	2', 5'-Oligoadenilato sintetasa
PIAS	Proteína inhibidora específica de STAT
PMAP	Patrones moleculares asociados a patógenos
RE	Retículo endoplásmico
RIG	Gen inducible por ácido retinoico
RRP	Receptores de reconocimiento de PMAP
RSV	Virus sincitial respiratorio
RTG	Red de transgolgi
SCHD	Síndrome de choque por dengue
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
SOCS	Supresor de la señalización de citocinas
TBEV	Virus de la Encefalitis transmitida por garrapatas
TDR	Red de enfermedades tropicales
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TRAF	Factor asociado a TNF
WNV	Virus del este del Nilo

RESUMEN

Uno de los mecanismos descritos como parte de la respuesta antiviral desarrollada por el virus de dengue es la inhibición de la activación de la respuesta mediada por interferón (IFN) tipo I para favorecer su replicación, a través de sus proteínas no estructurales (NS2, NS4 y NS5), sin embargo el tratamiento con IFN- α , previo a la infección, reduce la capacidad replicativa del virus de dengue, no obstante, no logra una inhibición completa, como se ha reportado en es estudios *in vitro*, lo cual sugiere la participación de diversos mecanismos de evasión de la respuesta antiviral; como la inducción de la expresión de reguladores negativos de la vía JAK-STAT del IFN tipo I, tales como las proteínas SOCS-1 y SOCS-3, las cuales se han visto involucradas en la fisiopatogenia de otras infecciones virales. En el presente trabajo se observo que la infección con el virus de dengue inhibe la fosforilación de la proteína STAT2 y la translocación nuclear de STAT1 fosforilada y que estos efectos son revertidos cuando la infección ocurre posterior al pretratamiento con IFN- α . Asi mismo, se observó la disminución de la activación de respuesta inducida por la vía JAK-STAT del IFN-tipo I a través de la disminución de la expresión del ARNm de las proteínas de respuesta antiviral OAS y MXA durante la infección con el virus de dengue. Al igual que otros autores, no se observo el abatimiento total de replicación viral con el pretratamiento con IFN- α . No obstante, se observó que la infección con el virus de dengue indujo la transcripción y producción de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3, principalmente SOCS-1 cuyos incrementos fueron más altos a los niveles mostrados por la proteína SOCS-3, la cual mostro incrementos a tiempos similares al incremento en el título viral. Por su parte el incremento de SOCS-1 fue observado a tiempos tempranos postinfección sugiriendo su participación como mecanismo adicional de evasión de la respuesta antiviral y de la activación de la respuesta mediada por la vía JAK-STAT del IFN- α y del IFN- γ , este último mostró una disminución en la expresión de su ARNm durante la infección con el virus de dengue y el silenciamiento de la proteína SOCS-1 muestra incremento de la expresión de IFN- γ y disminución de la replicación viral. Estos resultados sugieren que la infección con el virus de dengue inhibe la traslocación nuclear de STAT1 fosforilado e induce la transcripción de SOCS-1 y SOCS-3 como parte de los mecanismos de respuesta antiviral.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una entidad nosológica de etiología viral, que puede ocasionar cuadros clínicos de curso autolimitado, con la resolución de sus síntomas y signos sin complicaciones en un período de 2 a 7 días. Sin embargo, también pueden evolucionar a cuadros graves de la enfermedad, en los cuales se presenta fuga plasmática, sangrado o ambos; denominándose a esta forma, de acuerdo a la clasificación de la OMS de 1997, como: fiebre hemorrágica por dengue (FHD), que puede llevar a la presencia de choque (Síndrome de Choque por dengue, SCHD) e incrementa el riesgo de muerte del paciente (OMS, 1997; Weaver y Vasilakis, 2009; Schmidt, 2010; Rothman, 2003; Kurane, 2007).

El dengue severo se caracteriza por daños en el sistema circulatorio y disfunción hepática, los cuales se han asociado con la exacerbación de la respuesta inmune inducida por la infección o como consecuencia de la presencia del virus (Tan y Bujang, 2013; Butthep et al., 2012; Costa et al., 2013).

El incremento en el nivel de citocinas proinflamatorias puede estar dado por múltiples causas, entre las cuales destacan los mecanismos celulares desencadenados ante una infección viral, también reconocidos como respuesta inmune innata y caracterizados por la producción de IFN tipo I (Randall y Goodbourn, 2008).

La expresión de IFN, citocinas proinflamatorias y moléculas coestimuladoras que llevan a la activación de la respuesta inmune adaptativa dirigida a la eliminación del virus es desencadenada a partir del reconocimiento del virus del dengue a través de diversos receptores, principalmente TLR 3, TLR 7 y TLR 8, RIG1 y MDA5, los cuales mediante el reconocimiento de estructuras víricas, desencadenan la señalización a través de proteínas adaptadoras que llevan a la activación de factores de transcripción, tales como NF- κ B; a vías de señalización como JNK y MAPKs, y a factores de respuesta a IFN (IRFs) (Ubol et al., 2010).

El papel del IFN tipo I es crucial en la respuesta antiviral induciendo la activación de la transcripción de múltiples genes estimulados por IFN (ISGs), entre los cuales se encuentran genes que codifican para proteínas con actividad antiviral específica; además de citocinas y quimiocinas que propician un ambiente proinflamatorio. Por otra parte, el IFN tipo II activa genes de respuesta a IFN- γ que llevan a la expresión de citocinas, proinflamatorias y antiinflamatorias, además de la activación de la respuesta celular tipo Th2 y de células NK (Espada-Murao y Morita, 2011).

La activación de las vías de respuesta a IFNs es a través de su reconocimiento mediante receptores específicos en la superficie celular. Los IFNs tipo I son reconocidos por sus receptores IFNAR, en el dominio extracelular; mientras que sus subunidades I y II interaccionan con las proteínas JAK1 y Tyk2, las cuales vía su actividad tirosina-cinasa fosforilan residuos específicos del dominio citoplasmático del receptor. Esta modificación por fosforilación ocasiona que se transforme en el sitio de reclutamiento de los factores de transcripción citoplasmáticos STAT 1 y 2, los cuales son fosforilados por las proteínas JAKs. Dicha fosforilación permite que se combinen con el factor de regulación IRF9, formando el factor de transcripción heterotrimérico ISGF3 que migra al núcleo en donde se une a elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) favoreciendo la transcripción de cientos de genes ISG, (Baum y Garcia-Sastre, 2010).

Por su parte, el IFN tipo II es reconocido por el receptor heterodimérico IFNGR, el cual, a través de sus subunidades R1 y R2, reclutan a las cinasas inactivas JAK1 y JAK2, favoreciendo su autoactivación y constituyendo un sitio de unión para STAT1. Las moléculas STAT1 fosforiladas forman homodímeros que entran al núcleo y activan sitios de unión específicos a IFN- γ (GAS), con la subsecuente inducción de la transcripción de genes inducibles por IFN- γ (Darnell et al., 1994).

La expresión de genes inducibles por IFN- α o IFN- γ , se encuentra fisiológicamente regulada, para evitar una respuesta desproporcionada que cause daño al organismo. Se han identificado diversas familias de inhibidores o reguladores negativos de las señales inducidas por los IFNs, las cuales están involucradas en la regulación de la respuesta antiviral y actúan de forma distinta en diferentes puntos de la vía JAK-STAT (Si-Tahar et al., 2009) como son:

1. Las fosfatasas SHP2, cuya actividad enzimática inactivan a las proteínas STAT 1 y STAT2 fosforiladas (Qu, 2000; Liu y Qu, 2011).

2. La familia de proteínas inhibidoras de STAT (PIAS), como PIAS-1, que se une a la proteína STAT fosforilada, con lo que evitan la formación de ISGF3. Así también se ha reportado que puede inhibir a otros factores de transcripción y a promotores de STAT1 y NF-kB mediante su unión al promotor (Liu y Shuai, 2008).

3. La familia de proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS), principalmente SOCS-1 y SOCS-3, las cuales inhiben la vía de señalización JAK-STAT mediante sus tres dominios estructurales: contienen una región inhibidora de cinasas (KIR) que funciona como pseudosustrato para inhibir la actividad cinasa de las proteínas JAK. Además, estas proteínas compiten con el reclutamiento de STAT en su dominio de unión a JAK y mediante su la caja SOCS promueven la ubiquitización de las proteínas JAK y STAT para su degradación proteasomal (Kile et al., 2002; Wormald y Hilton, 2004; Akhtar y Benveniste, 2011).

En este último contexto, se ha encontrado que la evasión de la respuesta antiviral dependiente de la inhibición de la vía JAK-STAT por las proteínas SOCS-1 y SOCS-3 ocurre en varias infecciones

virales, tales como Influenza y Hepatitis C (Pothlichet et al., 2008; Qashqari et al., 2013; Moorman et al., 2009).

Diversos estudios han mostrado evidencia de que el virus del dengue puede inhibir la respuesta innata para favorecer su replicación en la célula hospedera. Así se ha reportado que proteínas no estructurales del virus, tales como NS4B y NS5, están involucradas en la inhibición de la vía JAK/STAT aparentemente disminuyendo la fosforilación de STAT1 y la expresión de la proteína STAT2 (Rothman, 2010). Sin embargo, los mecanismos por los cuales se altera esta respuesta antiviral durante la infección por dengue aún no han sido completamente esclarecidos.

1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1 *Virus de dengue.*

El virus de dengue (DENV) es miembro de la familia de los flavivirus, del género *Flaviviridae*, se han definido cuatro serotipos: DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4, los cuales han emergido a partir de cepas silvestres en los bosques del sudeste de Asia (Wang et al., 2000).

La partícula viral del DENV tiene un diámetro de 40-60 nanómetros (nm). La parte externa está formada por la envoltura viral que deriva de la bicapa lipídica de la célula hospedera (Alcaraz-Estrada et al., 2010, Smith et al., 2011). En la parte interna se encuentra la nucleocápside viral que tiene simetría icosaédrica y que protege al material genético del virus (Figura 1 A).

El genoma viral es un ARN de cadena sencilla, de sentido positivo no fragmentado, compuesto de aproximadamente 10,700 nucleótidos y codifica una poliproteína precursora de 3411 aminoácidos que da lugar a tres proteínas estructurales: la proteína C de la cápside, la proteína precursora de membrana prM y la proteína de superficie E, y a siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5; las cuales se encuentran involucradas en la replicación del virus y se les ha asociado con los mecanismos de evasión de la respuesta inmune antiviral de la célula hospedera (Bäck y Lundkvist, 2013, Weaver y Vasilakis, 2009) (Figura 1 A y B).

La estructura del virus de dengue se ha determinado mediante microscopía crioelectrónica y mediante mapas de densidad electrónica de estructuras proteicas conocidas, permitiendo establecer la conformación de su proteína estructural (E) (Zhang et al., 2003).

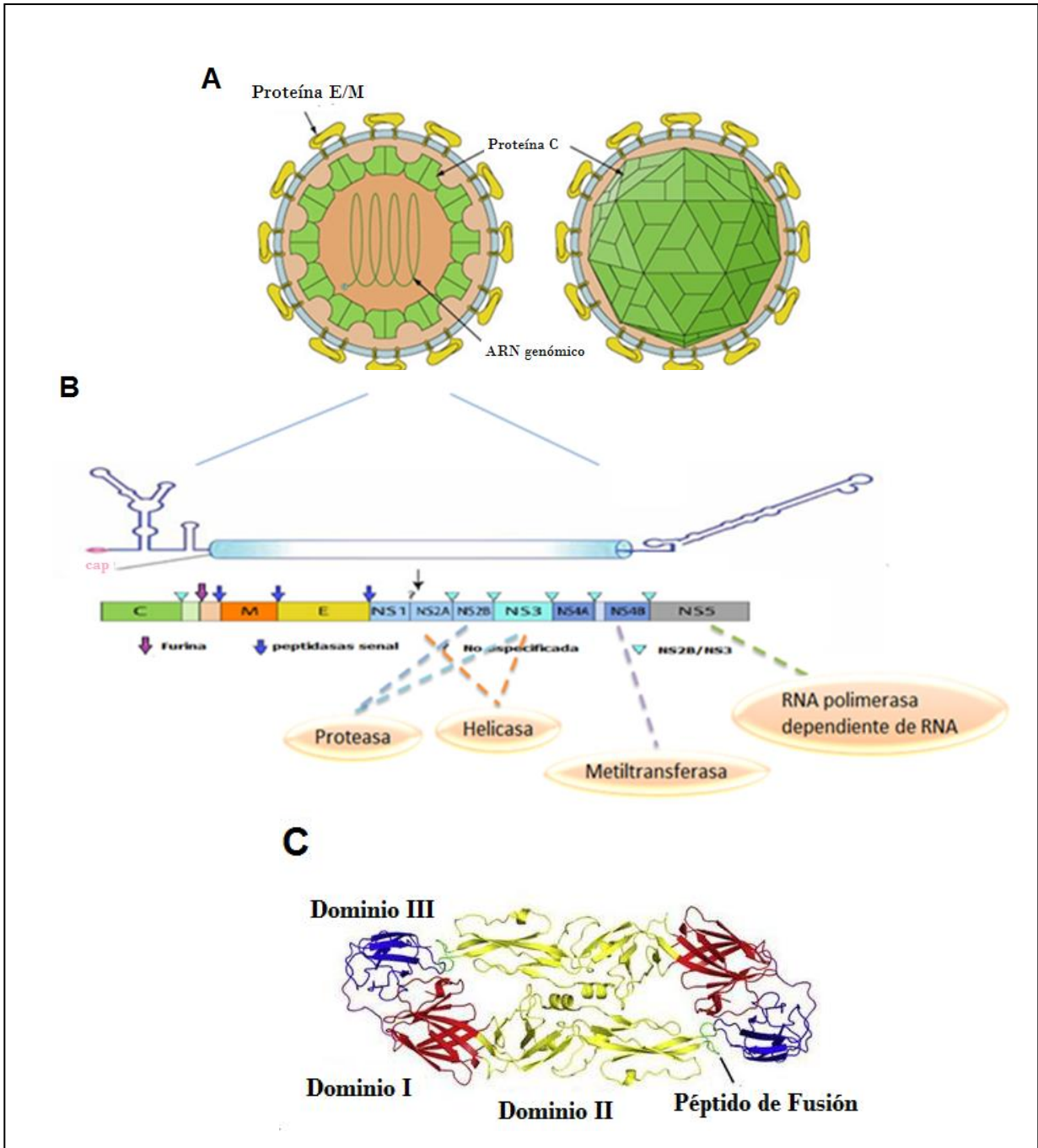


Figura 1. Esquemática del virus del dengue. *A.* Representación de la composición del virus de dengue. *B.* ARN genómico del virus de dengue y su traducción a la poliproteína, la cual contiene las proteínas estructurales y no estructurales (NS) virales. *C.* Esquema en listón de la proteína E viral unida a prM; a la derecha se muestra de arriba hacia abajo la conformación secundaria de prM y la representación de la proteína E y el péptido de fusión. (Imagen modificada de Li et al., 2008).

La proteína E ha sido estudiada por sus propiedades antigénicas, como un posible blanco de vacunas experimentales, de esta manera, se ha observado que los niveles de glicosilación y la posición de los glicanos ligados a nitrógeno (N-glicosilación) de la proteína E pueden afectar sus propiedades antigénicas, ya que esta proteína puede estar glicosilada en dos sitios potenciales: Asn 67 y 153, dos asparginas conservadas en la mayoría de los flavivirus; de estos sitios, el primero es único para DENVs (Wang et al., 1999; Heinz et al., 2003). También se sabe que el patrón de glicosilación es diferente según el serotipo de DENV e incluso entre diferentes cepas, así como de las células en las que se propaga el virus (Johnson et al., 1994, Navarro-Sánchez et al., 2003).

La proteína E, además de ser el principal elemento antigénico del virus, constituye el factor de unión del virus a su célula blanco, por lo cual es indispensable analizar su organización. Esta proteína se encuentra dispuesta formando dímeros con la proteína prM, lo cual genera estructuras tipo espiga heterodiméricas conformadas de tres dímeros prM-E. La estructura general del virus supone el establecimiento de 60 espigas triméricas en la superficie de la partícula.

Cada heterodímero se encuentra asociado con una porción transmembranal de la proteína E y de prM, representando una espiral antiparalela E-E ó prM-prM que atraviesan la membrana viral dos veces, de manera que el carboxilo terminal de cada proteína se encuentra en el exterior de la membrana viral (Wang et al., 1999, Hung et al., 1999), de tal forma que los dominios I y II de la proteína E, que albergan el péptido de fusión, se encuentran ordenados en su punta distal, región que está cubierta por una proteína prM y el dominio III de la proteína E se encuentra libre en la superficie y es capaz de ejercer la unión al receptor (Wang et al., 1999). (Figura 1 C)

1.2 Ciclo viral

La proteína E puede unirse con diversas estructuras en la superficie de las membranas celulares, y a pesar que hasta la fecha se han descrito diversos sitios potenciales de unión de varias glicoproteínas, no se reconoce un receptor específico para el virus del dengue. Entre los posibles receptores blanco para el virus de dengue, se encuentran el heparán sulfato, DC-SIGN en las células dendríticas, CD14 y el receptor a manosa (Chen et al., 1997; Miller et al., 2008; Tassaneetrithep et al., 2003); también se ha sugerido la lectina tipo C humana CLEC5A como receptor de DENV, en macrófagos (Chen et al., 2008, Watson et al., 2011).

La infección viral requiere de la entrada del virus de dengue a la célula, vía endocitosis, seguido de la liberación de la núcleo-cápside al citoplasma, debido a la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal. Se reconoce que la disminución del pH intraendosomal induce la trimerización de la proteína E y la exposición de una porción hidrófoba, llamada péptido de fusión, el cual se encuentra oculto en la partícula viral en su estado de madurez y que en este ambiente ácido interactúa con la membrana endosomal e inicia el proceso de fusión de las membranas. Se sugiere que la presencia de colesterol en la membrana blanco facilita el proceso de fusión, aunque no es indispensable (Lu et al., 1999; Watson et al., 2011; Smith et al., 1999).

Después de la internalización y la fusión de membranas, la nucleocápside viral es liberada en el citoplasma con lo cual se libera el genoma viral (Heinz et al., 2003). Debido a que el genoma viral es ARN de sentido positivo, puede ser empleado para la traducción en una única poliproteína que, posteriormente, es escindida en 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales (NS) virales (Figura 2).

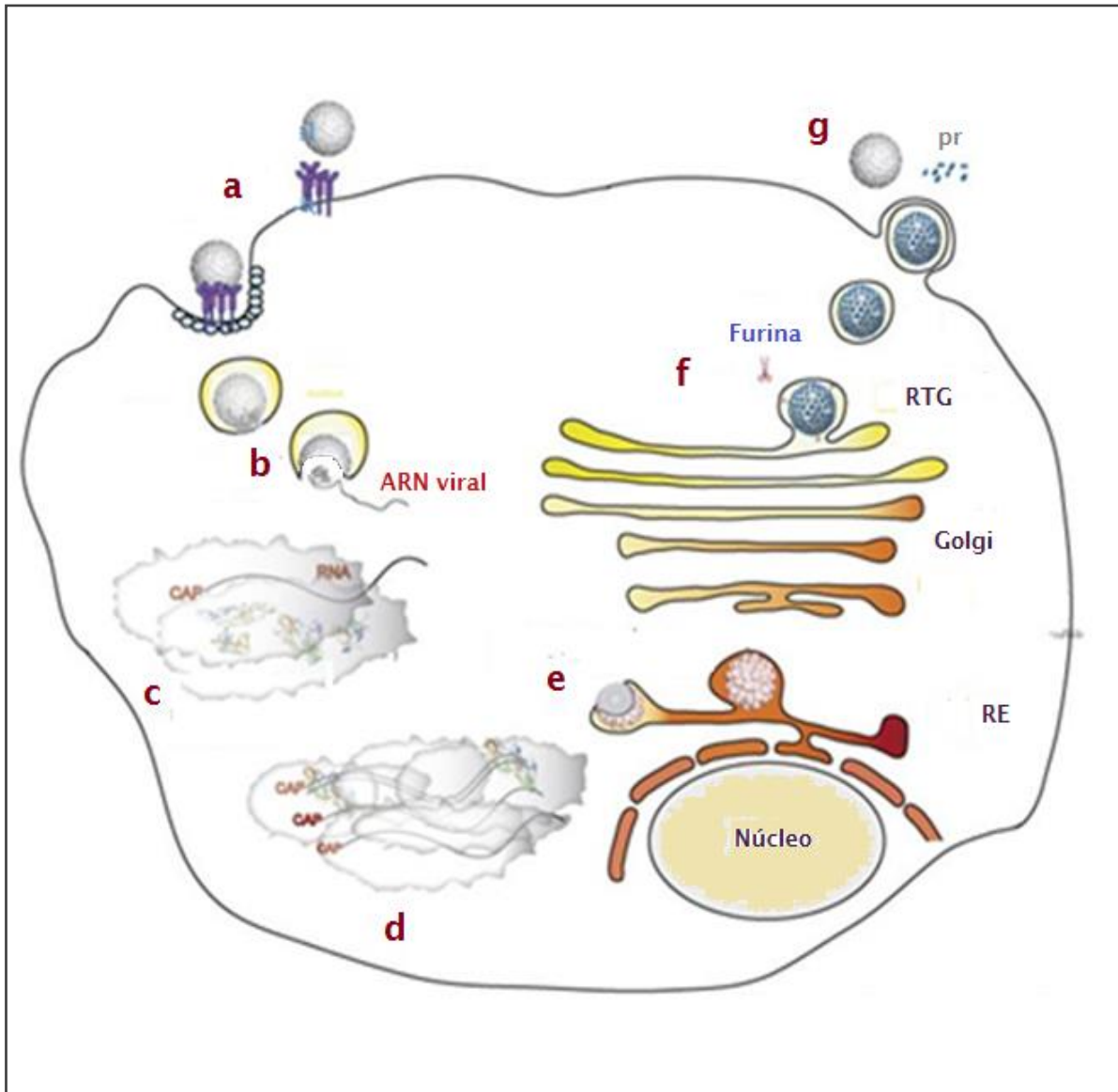


Figura 2. Ciclo viral del dengue. **a.** Entrada del virus por endocitosis. **b.** Liberación del ARN genómico a través de la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal. **c.** Traducción del ARN viral en poliproteína. **d.** Replicación del ARN viral. **e.** Ensamblaje del virus. **f.** Maduración de la partícula viral. **g.** Liberación de la partícula viral. (Imagen modificada de Rodenhuis-Zybert et al., 2011)

La hebra de ARN genómico puede ser replicada mediante la síntesis de un intermediario de cadena negativa, que sirve como molde para la nueva cadena positiva de ARN viral. Múltiples rondas de traducción producen altos niveles de proteínas virales que junto con el ARN viral se ensamblan formando los viriones (Clyde et al., 2006). La infección con DENV induce alteraciones en las membranas intracelulares formando paquetes de vesículas en el citosol o estructuras de membrana lisa, donde se acumula el complejo de replicación viral y la inducción de estructuras de la membrana pueden servir como un andamio para el anclaje del complejo de replicación viral (Mackenzie et al., 1996, Welsch et al., 2009), (Figura 2).

Las regiones C-terminales de las proteínas C, prM y E contienen aminoácidos hidrófobos que sirven como secuencias señal para la inserción del resto de la proteína en la membrana del retículo endoplásmico (RE) (Salonen et al., 2005). Las proteínas NS son escindidas por la proteasa señal del RE, con lo cual se forma la proteasa viral NS2B y su cofactor NS3 (Lobigs, 1993; Yamshchikov y Compans, 1993; Pethel et al., 1992). El complejo viral serina-proteasa (NS3-NS2B) es necesario para el procesamiento de la poliproteína a través de su extremo N-terminal, dentro de la región citoplasmática de la membrana del RE rugoso separa las uniones entre las proteínas no estructurales NS1 del resto de las NSs y NS2A-NS2B, NS3-NS2B, NS3-NS4A, NS4B y NS5; y en la región citoplasmática las uniones entre el sitio interno de C y NS2A, NS3, NS4A (Bazan y Fletterick, 1989; Welsch et al., 2009)

El extremo C-terminal de la proteína NS3, tiene tres propiedades enzimáticas: “ARN- trifosfatasa” 5’ (RTP), “nucleótido trifosfatasa” (NTPasa) y “helicasa”. Además, NS3 forma un complejo con NS5 y ayuda en la replicación viral a través del desenrollamiento del ARN y la desfosforilación previa a su emparejamiento con el extremo 5'. Las proteínas NS restantes son escindidas por la

actividad serina-proteasa viral NS3, que requiere NS2B, como cofactor para la actividad catalítica (Miller et al., 2006). Sin embargo, las modificaciones postraduccionales de las proteínas NS4A-4B son mediadas por la peptidasa señal de la célula huésped (Preugschat y Strauss, 1991).

La proteína NS1 es una glicoproteína con dos sitios de glicosilación que se sintetiza en el RE, existe brevemente como monómero hidrófilo y posteriormente se lleva a cabo su dimerización, después de la cual NS1 incrementa su hidrofobidad y entra al aparato de Golgi (Winkler et al., 1989). El papel de NS1 en la replicación del virus es desconocido, pero se cree que facilita la infección viral y la patogénesis del DENV (Libraty et al., 2002). NS1 es además secretada a partir de células infectadas (sNS1) y se ha demostrado que es inmunológicamente importante (Avirutnan et al., 2010; Schlesinger et al., 1987).

Por su parte, las pequeñas proteínas hidrófobas NS2A, NS4A y NS4B están menos caracterizadas. Se sugiere que debido a su naturaleza hidrofóbica se localizan asociadas a las membranas y colocalizadas con las proteínas virales y del ARN viral, durante la replicación y ensamblaje del virión; se cree que la formación de las estructuras de la membrana citoplasmática inducidas por DENV se deben a la disposición de la proteína NS4A (Welsch et al., 2009).

La proteína NS5, de aproximadamente 103 kDa, tiene tres dominios funcionales: en el N-terminal, el dominio con actividad de S-adenosil metionina metiltransferasa (MTasa), las secuencias de localización nuclear y el dominio con actividad de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN, en la región C-terminal. La MTasa abarca los residuos de aminoácidos 1 a 239 y es responsable de las metilaciones en el N-7 de la guanina y en el O-2' de la ribosa, necesarias para el arreglo del genoma del DENV. Por su parte, la estructura del cap del ARN viral es reconocida por la maquinaria de traducción de la célula hospedera. La secuencia de localización nuclear (residuos 320 a 405)

interactúa con la NS3 viral, la cual mediante su actividad helicasa, es reconocida por factores celulares permitiendo el transporte de proteínas al núcleo. El dominio de la polimerasa viral, dependiente de ARN de NS5 (residuos 273 a 900), es responsable de la síntesis de nuevos genomas de ARN viral (Welsch et al., 2009).

Una vez armadas las nuevas partículas virales, en la red transgolgi la proteasa celular furina escinde la porción pr de la proteína prM liberando a la proteína M en una forma madura (Stadler et al., 1997) (Figura 2). No se sabe el papel que funge prM durante el ensamblaje viral, pero se le ha asociado con la reorganización y control de la fusión prematura de las proteínas E, que podrían ocasionarse durante la disminución de pH en el paso por la red transgolgi antes de ser liberadas al medio extracelular (Guirakhoo et al., 1991, Guirakhoo et al., 1992, Zhang et al., 2003).

1.3 Epidemiología

El número de casos reportados de dengue se ha incrementado dramáticamente desde 1980, (Gubler, 2002; Thomas et al., 2003) y las principales causas de este gran aumento se asocian a la rápida urbanización no planificada, aunada a la baja calidad de vida, la falta de control y vigilancia de vectores, y a programas deficientes de salud pública; por su parte, los viajes internacionales contribuyen a la distribución del virus y la adaptación a nuevas regiones y nuevas condiciones ambientales de los vectores (Guzmán, 2002). El papel que juega el cambio climático es controversial y no se sabe cómo influye en la propagación de mosquitos e indirectamente en los diferentes serotipos del virus de dengue (Guzmán, 2002; Thomas et al., 2003; Tun-Lin et al., 2000).

Se reconoce que los cuatro serotipos del virus de dengue pueden encontrarse en todo el mundo y más de 100 países son endémicos, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más del 50% de la población mundial vive en áreas de riesgo de contraer la enfermedad y 50% vive en áreas endémicas (WHO, 2014; WHO, 2012, OPS, 2010; Gubler, 2011). La epidemiología mundial del dengue varía, pero se estima que ocurren aproximadamente de 50 a 200 millones de casos de infecciones por dengue al año, 500 mil presentan dengue severo (FHD) y más de 20 mil muertes asociadas a dengue, representando aproximadamente el 2.5% de mortalidad (Gubler, 2002; Shepard, 2011, WHO 2014).

De 2001 a 2007 más de 30 países de las Américas notificaron un total de 4, 332,731 casos de dengue. El número de casos de fiebre hemorrágica por dengue (FHD) en el mismo período fue de 106. En 2010 se notificaron 1.6 millones de casos y 49 mil de ellos fueron de dengue grave. Los países de América central notifican el 12.5% de dengue de todo el continente y México constituye el 14% de los casos reportados (WHO, 2014).

La incidencia de dengue en México muestra variaciones anuales con brotes epidémicos de diferentes magnitudes (Narro-Robles y Gómez-Dante, 1995; CENAVE, 2011). En los últimos 10 años se han presentado 3 picos de incremento en la tasa de incidencia de dengue, en 2007, 2009 y 2013, con más de 52 mil casos al año (SINAVE/CENAVECE, 2005; SINAVE/CENAVECE, 2013; SINAVE, 2014). Los principales estados endémicos de dengue se ubican en la región sureste, pacífico y Golfo de México, con persistencia en las siguientes entidades federativas: Baja California Sur, Colima, Guerrero, Campeche, Veracruz, Michoacán, Oaxaca y Yucatán (SINAVE, 2014).

1.4 Cuadro clínico

La infección con el virus de dengue puede cursar de forma asintomática o tener diferentes cuadros clínicos, los cuales varían en gravedad, desde una enfermedad febril aguda indiferenciada, reconocida como fiebre por dengue clásico (FD), hasta condiciones que ponen en peligro la vida del paciente, como son el dengue hemorrágico o fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y/o Síndrome de Choque por Dengue (SCHD), de acuerdo a la clasificación de la OMS de 1997 (WHO 2014, Gibbons y Vaughn, 2002).

La Fiebre hemorrágica por dengue fue categorizada en grados del I al IV, pero en 2009 la clasificación de 1997 fue simplificada por el Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR) de la OMS y se agruparon los casos de Fiebre hemorrágica por dengue (DH) y Síndrome de Choque por Dengue (SCHD), como dengue severo o grupo C, para evitar diagnósticos falso-negativos entre FHD y SCHD, sin embargo, sigue siendo oficial la clasificación previa de FD, FHD y SCHD (WHO 2009).

El periodo de incubación de la enfermedad es aproximadamente de 3 a 15 días. Generalmente, los signos y síntomas de dengue inician con una aparición repentina de fiebre alta. Durante la fase febril, la deshidratación puede provocar trastornos neurológicos y convulsiones febriles en niños pequeños (WHO 2012). En este sentido, durante la fiebre por dengue (FD) se presentan: escalofríos, dolor de cabeza, dolor retro-ocular, malestar general (cuerpo cortado), mialgias, artralgias y, en un alto porcentaje de los casos, se puede presentar náusea o vómito (90%). Esto es seguido por un dolor penetrante de músculos, articulaciones y huesos, lo cual le dio el nombre de “fiebre quebrantahuesos”. Aunado a esto, y como característica principal, se presenta el cuadro febril

fluctuante. En un 60% de los casos, 1 a 3 días posteriores al cese de la fiebre, se presenta un exantema maculopapular que por lo general comienza en el tronco, antes de extenderse periféricamente y dura de 2-7 días. Este cuadro es autolimitado y con una duración de siete días (Bäck y Lundkvist, 2013).

Los síntomas tempranos de la fiebre por dengue y el dengue hemorrágico son indistinguibles, el único signo de inicio del dengue hemorrágico (DH) es el vómito severo y la aparición de manifestaciones hemorrágicas, que van desde un “rash” cutáneo en la cara y extremidades hasta la extravasación de plasma, que resulta de un aumento de la permeabilidad vascular y trombocitopenia (menor a 100, 000 plaquetas/mm³) (Tsai et al., 1991). La pérdida de plasma se caracteriza por hemoconcentración (aumento del hematocrito de 20%) y el desarrollo de ascitis o derrame pleural. Se puede distinguir el inicio del cuadro de síndrome de choque por dengue, del dengue hemorrágico, por la presencia de compromiso cardiovascular, el cual ocurre cuando la extravasación plasmática en los espacios intersticiales lleva al estado de choque. El síndrome hemorrágico por dengue es fatal con una tasa de mortalidad alta, mayor al 20%; sin embargo, en lugares con suficientes recursos y experiencia clínica, la mortalidad puede disminuir a menos del 1% (WHO, 2012). Los signos de alarma para el síndrome de choque por dengue incluyen un rápido decremento del hematocrito, dolor abdominal intenso, vómito persistente y la disminución a valores imperceptibles de la presión sanguínea (WHO, 2009).

El diagnóstico clínico de dengue hemorrágico se basa en la presencia de 4 principales manifestaciones clínicas: 1) fiebre sostenida por 2 a 7 días; 2) tendencia a la hemorragia, prueba del torniquete positiva, petequias o epistaxis; 3) trombocitopenia (conteo plaquetario $\leq 100 \times 10^9/l$) y 4) evidencia de fuga plasmática, manifestada como hemoconcentración, un incremento en el

hematocrito $\geq 20\%$, de acuerdo a la edad, sexo y población), derrame pleural y/o ascitis. La severidad de la fiebre hemorrágica por dengue es categorizada en 4 grados: grado I, sin sangrado, pero con prueba del torniquete positiva; grado II con diátesis hemorrágica clínica, como petequias, epistaxis y hematemesis; grado III, manifestaciones de falla circulatoria, con incremento en la frecuencia y fuerza del pulso con disminución de la presión arterial (hipotensión), piel fría, sudoración e inquietud y grado IV, choque profundo con pulso y presión sanguínea indetectable (Rahim y Sikder, 2005).

Por su parte, el diagnóstico de laboratorio se realiza mediante el aislamiento del virus por cultivo, detección del genoma viral por PCR de especímenes clínicos (como suero en estado febril temprano) o por pruebas serológicas tales como: el incremento en la prueba de inhibición de la hemaglutinación en suero de pacientes en etapa aguda o convaleciente o a través de la prueba positiva a IgM/IgG específicas para dengue por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) y la presencia de la proteína viral NS1 (Chuansumrit, 2010).

1.5 Inmunopatogénesis del dengue

Hasta el momento no se ha descrito completamente la patogénesis del dengue grave, debido quizás al hecho de que existen múltiples factores de riesgo para el desarrollo del cuadro grave de dengue, tales como la edad, los antecedentes genéticos del huésped (LaFleur et al., 2002; Stephens et al., 2002; Sierra et al., 2007; Garcia et al., 2011; Chaturvedi et al., 2006), el serotipo (Vu et al., 2010; Thai et al., 2012) y el genotipo viral (Rico-Hesse et al., 1997; Leitmeyer et al., 1999); además, se debe considerar la infección secundaria por un serotipo heterólogo (Laoprasopwattan et al., 2007). Asimismo, el serotipo y el genotipo del virus también pueden influir en la imagen sintomática de la enfermedad y el resultado. Estas observaciones se basan inicialmente en hallazgos epidemiológicos,

pero los resultados de laboratorio y los datos experimentales reportados a la fecha han contribuido al reconocimiento de la virulencia del virus de dengue, como un factor de riesgo importante.

El reconocimiento del virus por parte de la célula hospedera se produce inmediatamente después de la entrada de éste. Se admite como cierto que los principales receptores de reconocimiento a patógenos median la detección del virus: los receptores tipo Toll extracelulares (TLR 2) y endosomales (TLR 3, 7 y 8), así como los receptores citoplasmáticos de la familia DExD/H de ARN helicasas, RIG-1 (gen inducible por ácido retinoico) y MDA5 (Gen-5 asociado a la diferenciación de melanoma). La unión virus-receptor activa a factores de regulación de IFN (IRFs) y al factor nuclear kappa B (NF-kB), lo cual desencadena cascadas de señalización que activan la producción de IFN- α/β y citocinas proinflamatorias, estimulando, a su vez, la maduración de células dendríticas y, en su conjunto, una respuesta antiviral (Chang et al., 2012; Sariol et al., 2011).

Aunque no se conocen los mecanismos exactos detrás del dengue hemorrágico y el síndrome de choque por dengue, se sugiere que las células infectadas y las células endoteliales activadas producen un exceso de TNF α y óxido nítrico, lo cual contribuye al aumento de la permeabilidad de la pared vascular (Carr et al., 2003; Espina et al., 2003; Charnsilpa et al., 2005; Neves-Souza et al., 2005). La coincidencia de las manifestaciones graves de la enfermedad con la reducción del control de la fiebre y del virus, sugieren que los síntomas pueden ser una consecuencia de la respuesta inmunológica contra el virus, en lugar de que sean inducidos por la citopatología del virus. Por su parte, el incremento de citocinas se asocia con las infecciones secundarias y la inmunopatogénesis implicadas en el dengue severo. Sin embargo, no se ha descrito completamente cómo estas citocinas causan un mal funcionamiento de las células endoteliales vasculares, permitiendo la pérdida de plasma. En todo caso, se sugiere que la respuesta de tipo Th1 está ligada a la recuperación de la infección aguda, mientras que una respuesta de tipo Th2 está asociada con la exacerbación de la infección y la mala evolución de la enfermedad (Mosmann y Sad, 1996).

La regulación de la respuesta Th1 y Th2 está mediada principalmente por la IL-10 y por IFN- γ , respectivamente (Mosmann y Sad 1996). Además, los macrófagos activados reclutan CD4 y producen el factor citotóxico humano (HCF), que a su vez induce una cascada de citocinas que puede conducir a una respuesta de tipo Th1 o de tipo Th2. Los niveles de HCF pueden estar elevados en los casos de dengue grave, mientras que los auto-anticuerpos anti-HCF protegen contra la enfermedad grave (Basu y Chaturvedi 2008). A medida que la gravedad de la enfermedad aumenta, se presentan los cambios para una respuesta de tipo Th2, que se caracterizan por la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13. La infección con dengue, principalmente, puede provocar una respuesta inmune humoral e inducir una mayor expresión de citocinas relacionadas con la respuesta Th2 (Basu y Chaturvedi, 2008).

La inmunopatogénesis del dengue tiene en gran medida correlación con las concentraciones de citocinas y los eventos clínicos. La trombocitopenia se acompaña de la pérdida de plasma y de la coagulación desregulada, lo cual puede ser debido al efecto indirecto de la infección por el virus de dengue, a través del ambiente de expresión de diversas citocinas y quimiocinas en respuesta a la infección, las cuales se han observado que incrementan con la presencia de dengue hemorrágico, tanto en análisis *in vivo* como *in vitro*: IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- β , TGF- β , IL-8, MIP-1, MCP-1 y RANTES (Chaturvedi et al., 2006). En este contexto, se han asociado los incrementos de TNF- α , IL-6 e IL-8 (Chen et al., 2007; Nguyen et al., 2004; Lin et al., 2006; Chaturvedi et al., 1999; Chaturvedi et al., 2000) con la desregulación de la coagulación y fibrinólisis en el dengue, fenómenos que contribuyen al incremento de la permeabilidad de la pared vascular (Lei et al., 2001; Martina et al., 2009). Por otra parte, la secreción de TNF- α por las células infectadas activadas, promueve el aumento de la permeabilidad endotelial y aumenta la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales (Green et al., 1999; Kallmann, 2000; Javaid et al., 2003), mientras que el aumento de los niveles de IL-10 se asocia con la reducción en el número de plaquetas, y con la alteración de su función (Anderson et al., 1997; Green et al., 1999 b; Lee et al., 2013).

1.6 Respuesta inmune innata

Durante la infección viral existe una respuesta por parte de las células que es inmediata y relativamente inespecífica, cuyo objetivo es eliminar al agente patógeno antes de que se establezca la infección y generar señales de alerta, para activar a las células de respuesta específica del sistema inmunológico. Por su parte, la activación de esta respuesta inmune es iniciada a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs), a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRPs). Los principales PMAPs generados durante la infección viral son los ácidos nucleicos virales: ARN o ADN, los cuales son reconocidos por diversos RRP, entre los cuales encontramos a los receptores tipo Toll o TLRs (por sus siglas en inglés) y varios RRP citosólicos, entre ellos los receptores de ARN helicasas como RIG y MDA5 (Kawai et al., 2011).

La familia de receptores tipo Toll está conformada por 10 miembros (TLR1 a TLR10), cada uno de los cuales es capaz de detectar patrones moleculares asociados a patógenos específicos: TLR3, TLR7/8 y TLR9 son los principales sensores de patógenos virales y pueden detectar ARN de doble cadena (ds), de cadena sencilla (ss) y también ARN y ADN con motivos CpG respectivamente (Alexopoulou et al., 2001; Heil et al., 2004; Hemmi et al.2000). Estos últimos TLRs se encuentran localizados en los endosomas de células fagocíticas, como macrófagos y células dendríticas y, por tanto, la detección de PMAPs, ocurre después de la entrada de la partícula viral a la célula, al igual que el reconocimiento de los ácidos nucleicos virales que se lleva a cabo en el citosol (Loo y Gale, 2011). La detección de ADN exógeno, dentro de la célula, inicia la activación de distintas cascadas de señalización que incluyen la activación de IRF-3 y de NF- κ B, lo cual resulta en la transcripción de IFN- β , quimiocinas y citocinas proinflamatorias (Unterholzner et al., 2013). (Figura 3)

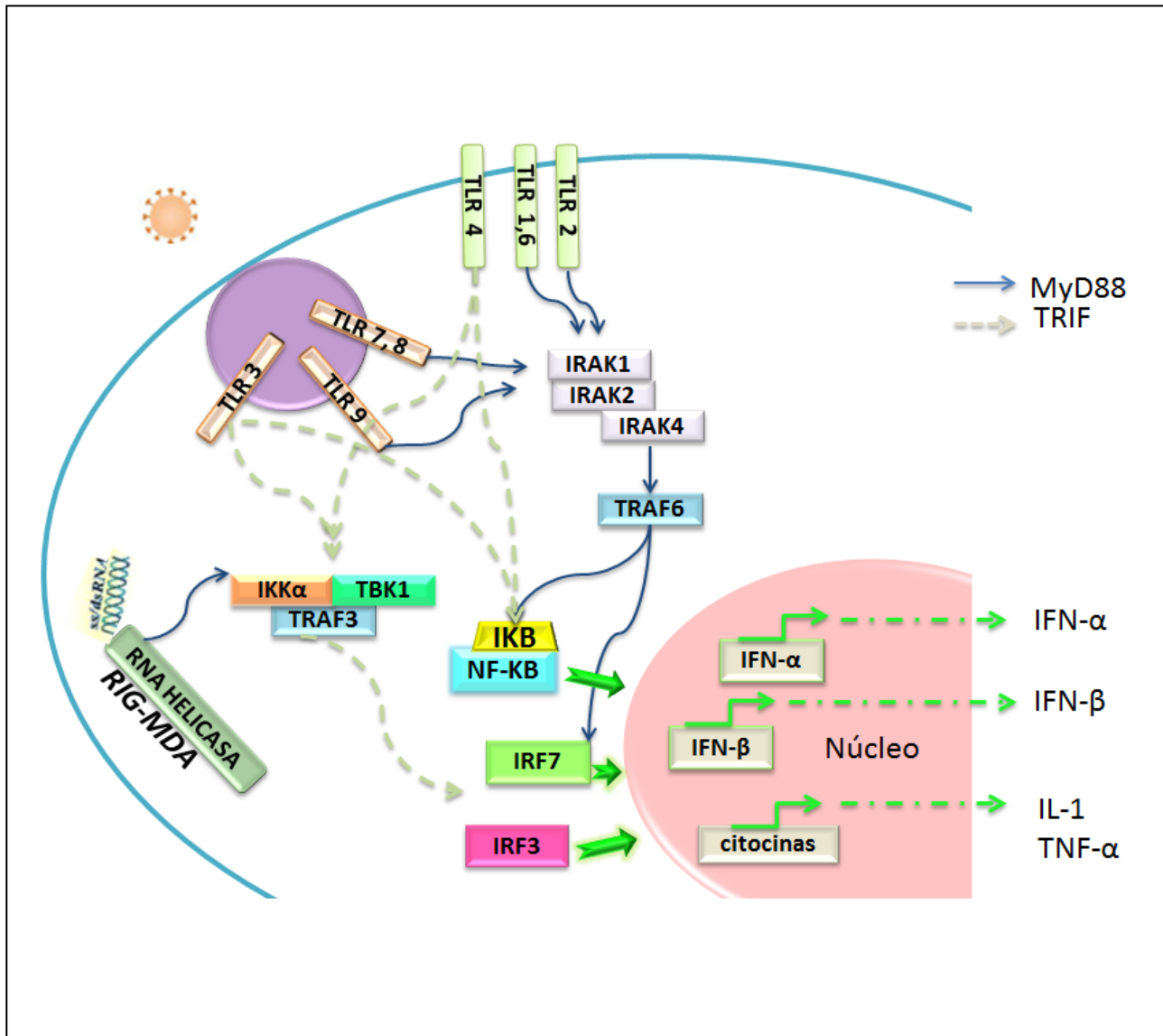


Figura 3. Reconocimiento de las partículas virales. La detección del ARN o ADN viral, a través de los receptores tipo toll (TLRs) y las RNA-helicasa RIG y MDA inicia la activación de distintas cascadas de señalización que llevan a la activación de IRF-3, IRF-7 y de NF-κB, mismos que entran a núcleo e inducen la transcripción de genes de respuesta antiviral, IFNs, quimiocinas y citocinas. (Imagen elaborada para esta tesis).

Por otro lado, MDA5 y RIG favorecen la vía de señalización de IFN- β 1 mediante la activación del activador del promotor de IFN beta-1 (IPS1) presente en la membrana mitocondrial; subsecuentemente, el factor 3 asociado al receptor de TNF (TRAF3) activa la cinasa de unión a TANK (TBK1) y a la cinasa α inhibidora de NF- $\kappa\beta$ (IKK α). Por su parte, TBK1 e IKK α fosforilan a los factores reguladores de la transcripción de Interferón (IRF): IRF-3 e IRF-7, los cuales entran al núcleo donde se unen a elementos de respuesta a IFN (ISREs), lo que da como resultado final la expresión de IFN tipo-I y múltiples genes estimulados por IFN (ISGs), entre los cuales se encuentran: RIG-1, MDA5, TLRs, 2'5'-OAS, PKR, factores de transcripción como STAT1, STAT2, IRF3 y miembros de las proteínas Mx (Hollidge, 2011).

En general, el reconocimiento de PMAPs, por los RRP, resulta en la activación de diversas cascadas de señalización, que finalmente llevan a limitar la infección a través de la producción de interferones (IFNs), citocinas proinflamatorias y quimiocinas.

1.6.1 IFN tipo I

La regulación de IFN tipo I, es a través de una familia multifuncional de proteínas inmunoreguladoras, como los factores de respuesta a IFN: IRF3 e IRF7, los cuales juegan un rol esencial en la respuesta de IFN- α/β para la eliminación de la infección viral. IRF3 posee un sitio restringido específico de unión a DNA, e interactúa con CBP, mientras que IRF7 tiene un amplio sitio de unión a DNA, el cual contribuye a incrementar la expresión de IFN. Ambos, IRF3 e IRF7, tienen la capacidad de activar promotores de respuesta a interferón en núcleo y la expresión de ISRE, al unísono que la expresión de IFN tipo I (Figura 3), manteniendo la cinética temporal de la

secreción de IRF3; sin embargo, esta respuesta es variable de persona a persona (Bustos-Arriaga et al., 2011).

La inducción del IFN tipo I también involucra a la proteína adaptadora STING (estimulador de genes de IFN), que se encuentra en el retículo endoplásmico y en las membranas asociadas a mitocondrias (Ishikawa y Barber, 2008; Ishikawa et al., 2009; Sun et al., 2009; Zhong et al., 2008). El extremo N-terminal de STING alberga cuatro regiones transmembranales, mientras que su región C-terminal se localiza en el citosol y recluta a IRF3 y TBK1 (TANK-binding kinase 1), promoviendo su fosforilación (Tanaka y Chen, 2012). El reconocimiento de ADNds lleva además a la activación de NF- κ B (Ferguson et al., 2012; Unterholzner et al., 2010). De igual modo las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) juegan un rol importante en la respuesta transcripcional y postranscripcional y han sido implicadas en la respuesta al ADN intracelular (Symons et al., 2006; Patel et al., 2011). (Figura 3)

1.6.2 Vía JAK-STAT

Una vez secretado el IFN tipo I, este es reconocido por los receptores en la superficie celular IFNAR1 e IFNAR2 en la célula blanco y, a través de sus subunidades intracitoplasmáticas I y II del receptor, se une a las proteínas tirosin-cinasa de la familia Janus cinasa (JAKs): JAK1 y Tyk2, respectivamente (Baum y Garcia Sastre, 2010). Esta unión activa la fosforilación de residuos de tirosina específicos del dominio citoplasmático del receptor, convirtiéndose en el sitio de reclutamiento de las proteínas que son miembros de la familia de factores de transcripción, los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) citoplasmáticos: STAT 1 y STAT2,

los cuales son fosforilados por las proteínas JAKs, en su tirosina de la región carboxilo terminal, dando origen a las formas activas fosforiladas de estas proteínas (STAT1-p y STAT2-p)

La activación de las proteínas STAT1-p y STAT2-p, permite la formación de heterodímeros entre ellas y su unión con una tercera proteína, IRF9 o p48, esto le permite separarse del receptor y migrar al núcleo (Decker et al., 1997; Bluysen et al., 1996). (Figura 4)

La unión de estas tres proteínas: IRF-9, STAT1 y STAT2, conforman el factor de transcripción multimérico ISGF3, el cual puede entrar al núcleo y unirse directamente, a través del IRF9 a promotores de genes estimulados con IFN (ISGs) (Veals et al., 1993). Por su parte, los ISGs contienen elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE), que sirven como sitios de unión para los miembros de la familia IRF; la unión de IRF-9 a los ISRE es por reconocimiento de la secuencia 5'-TTCNNTTT-3' (Levi y García-Sastre, 2001). A su vez, STAT 1 puede estimular a los ISRE a través de la interacción con el motivo TTT, cercano a la terminal 3' de las secuencias conservadas de los promotores de ISGs tipo I/III (5'-AGTTTCNNTTTCNC/T-3'), (Au-Yeung et al., 2013). (Figura 4)

Dentro de las proteínas codificadas por los genes inducidos por IFN, se encuentran varias proteínas con actividad antiviral, tales como: la proteína cinasa activada por ARN de doble cadena (PKR), la 2,5-oligoadenilato sintetasa (OAS) y las proteínas Mx, mismas que pueden inhibir la replicación viral por diversos mecanismos. Así, PKR ante el reconocimiento de ARNds se activa mediante su dimerización y autofosforilación, y también mediante la fosforilación de diferentes factores como el factor de inicio de la traducción eIF-2, inhibiendo la síntesis proteica (Levi y García Sastre, 2001; William, 1999), además de estar involucrada en la inducción de apoptosis de la célula infectada (Yeung et al., 1999). (Figura 4).

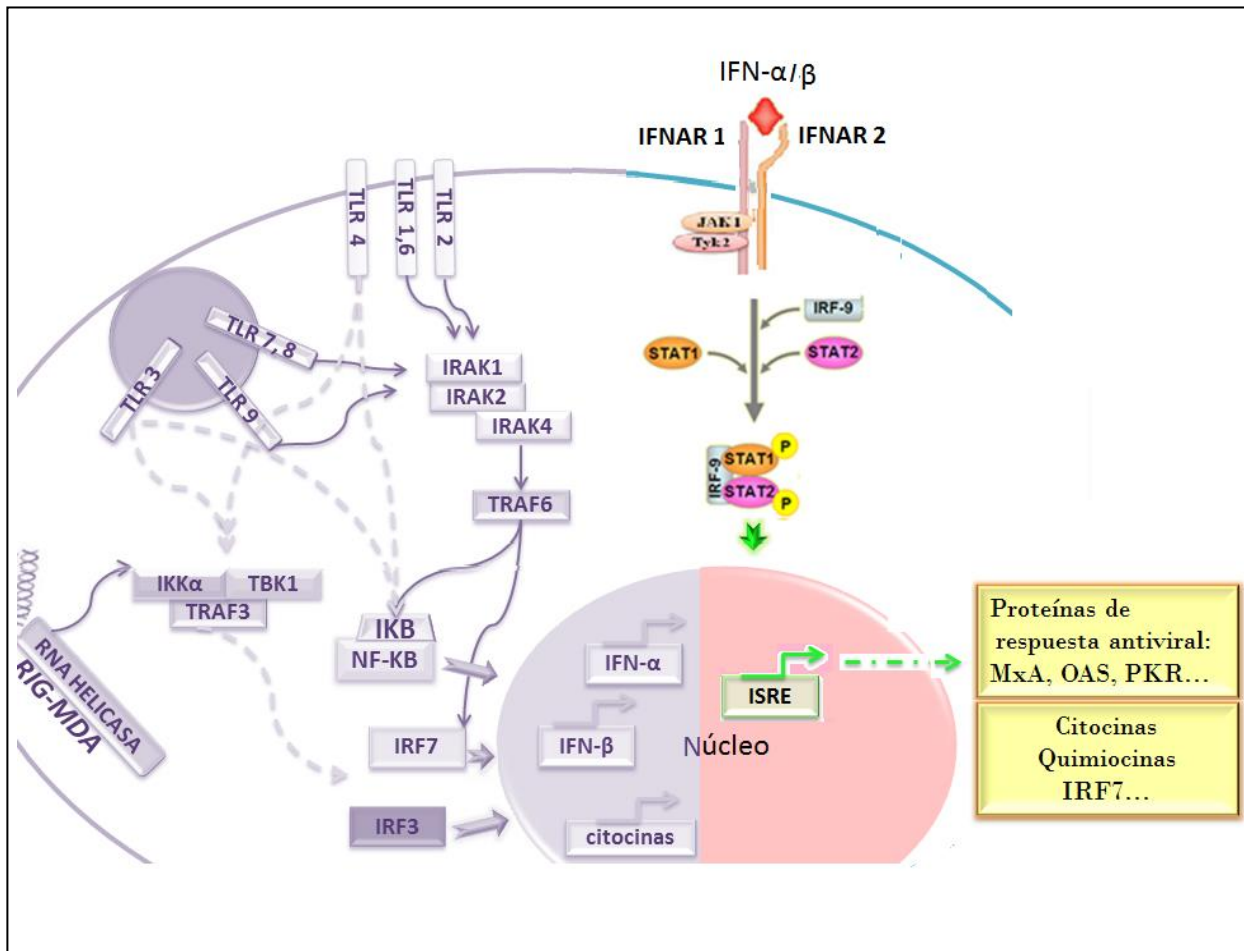


Figura 4. Cascada de señalización de la vía JAK-STAT. El reconocimiento del IFN-β por los receptores IFNAR permite la fosforilación de las proteínas JAK y Tyk que lleva a la activación por fosforilación de las proteínas STAT1 y STAT2, mismas que, al unirse con IRF-9, conforman el factor de transcripción ISGF3 que puede entrar al núcleo para la activación de genes de respuesta a IFN y la inducción de la transcripción de proteínas antivirales y citocinas proinflamatorias (Imagen realizada para esta tesis).

Por su parte, las proteínas OAS son inducidas por el IFN tipo I y, una vez activadas, catalizan la síntesis de 2,5- oligoadenilato, los cuales se unen a monómeros inactivos de la ARNasa-L, induciendo de esta manera su activación y dimerización, que le permite cortar el ARNm y el ARNr en el citoplasma de la célula, lo que conduce a una inhibición de la expresión de proteínas virales (Jacobs et al., 1996; Zhou et al., 1997).

Por otro lado, las proteínas Mx (proteínas de resistencia a Mixovirus), homólogas a las proteína dinamina, de localización citoplasmática (MxA) y nuclear (Mx1), inducidas por la señalización de IFN tipo I, interfieren con el tráfico y la actividad transcripcional de complejos de ribonucleoproteínas virales (Haller et al., 2007, Kochs et al., 2005, Xiao et al., 2013). La actividad antiviral de MxA es a través de la formación de anillos oligoméricos, alrededor de las estructuras tubulares de la nucleocápside, inhibiendo así la transcripción y la función replicativa (Haller y Kochs 2011, Gao et al., 2010).

1.6.3 IFN tipo II

La respuesta inmune desarrollada durante la infección viral lleva también a la activación de otras vías de regulación, además de las previamente descritas. De esa manera, las proteínas RIG-1 y MDA-5 sufren un cambio conformacional, inducido por el reconocimiento de PMAPs virales en su dominio C helicasa, exponiendo el dominio CARD, el cual interactúa con otras moléculas "río abajo" como la molécula de membrana mitocondrial, IPS-1, la cual activa vías de señalización de diversas moléculas como TRAF3, TRAF6 y miembros de la familia de las I κ B cinasas (IKK) TBK1, IKKa, IKKb e IKKe, entre otros factores celulares (Baum y García-Sastre, 2011). Esto lleva a la activación de factores de transcripción como IRF3, IRF7 y NF- κ B, los cuales tienen la capacidad de inducir diversas cascadas de señalización que pueden desembocar en la inducción de la transcripción de citocinas como los IFNs, tanto tipo I como de tipo II (Baber, 2011). El IFN- γ es secretado

principalmente por células T y "natural killer" (NK) (Billiau y Matthys, 2009, Schoenborn and Wilson, 2007), y en menor grado por macrófagos, células dendríticas y células B (Rayamajhi et al., 2010). La expresión de IFN- γ activa macrófagos e induce una respuesta MHC clase II para desarrollar una adecuada respuesta inmune de las células T CD4+, creando una respuesta específica celular e incrementando la respuesta proinflamatoria.

El IFN- γ es reconocido por los receptores específicos IFNGR, los cuales son expresados en diversas líneas celulares, tanto de origen linfoide (principalmente en los linfocitos T) como no linfoide, como las células epiteliales y hepatocitos (Rauch et al., 2013; Valente et al., 1992). IFNGR es un heterodímero, conformado por dos cadenas polipeptídicas IFNGR1 e IFNGR2. La unión de IFN- γ a su receptor induce la oligomerización del receptor y, mediante su activación por fosforilación, las regiones intracelulares del complejo IFNGR atraen a las cinasas inactivas JAK1 y JAK2, las cuales se activan mutuamente y fosforilan a IFNGR1, formando un sitio de unión para STAT1 en el receptor unido. Posteriormente, la molécula STAT1 es fosforilada por JAK2 en su sitio Y701 y S727 lo que provoca que se disocie del receptor formando homodímeros, los cuales migran al núcleo y activan sitios de unión específicos a IFN- γ (GAS), con la subsecuente inducción de la transcripción de genes inducibles por IFN- γ (Shultz et al., 2007; Kovarik et al., 1998). (Figura 5)

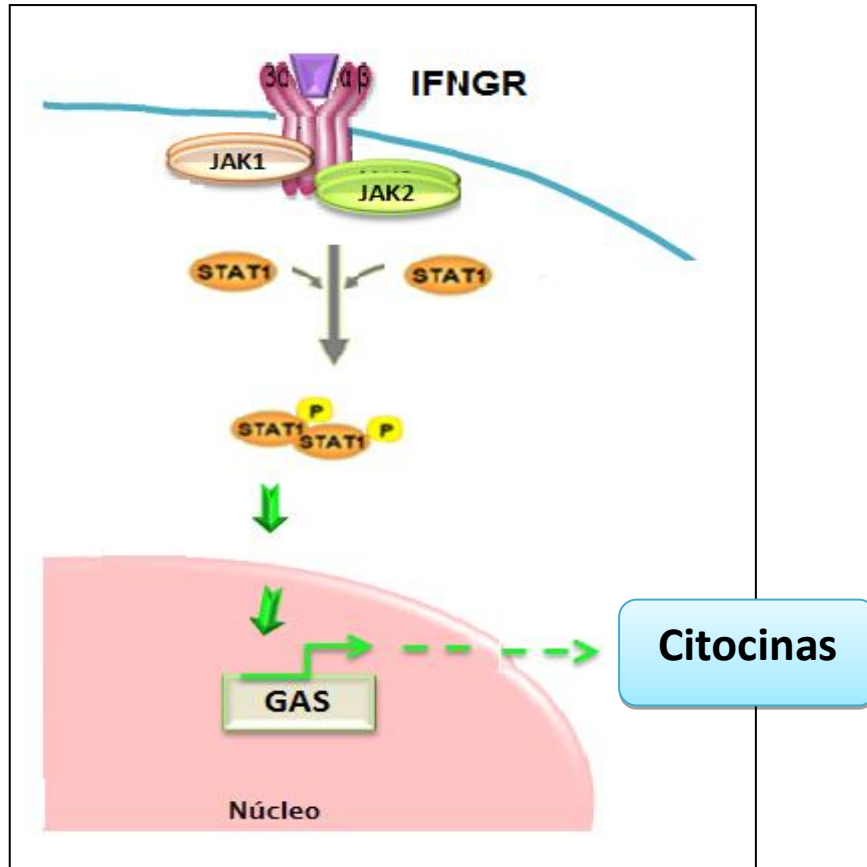


Figura 5. Vía de señalización del IFN- γ . A partir de la activación del receptor IFNGR se lleva a cabo la activación de STAT1 y su homodimerización, que permite su entrada al núcleo induciendo los promotores de genes de respuesta a IFN- γ (GAS) (Imagen elaborada para esta tesis).

1.7 Regulación de la expresión de IFN

La activación masiva de genes de respuesta a IFN se encuentra fisiológicamente regulada para evitar una respuesta desproporcionada que cause daño al organismo. En este sentido, se han identificado familias de inhibidores o reguladores negativos de las señales inducidas por citocinas, las cuales están involucradas en la regulación de la respuesta antiviral y que actúan de forma distinta en diferentes puntos de la vía JAK-STAT (Si-Tahar et al., 2009), como son:

1. La fosfatasa SHP2, que se expresan constitutivamente en varios tejidos y linajes celulares, están involucradas en la regulación de diferentes vías de señalización de factores de crecimiento y citocinas, puesto que desfosforilan a las proteínas STAT1 y STAT2 (Qu 2000, Liu y Qu 2000).

2. La familia de proteínas inhibidoras de STAT (PIAS), tales como PIAS-1 queha sido asociada a la inhibición de la vía JAK-STAT mediante su unión a la proteína STAT-p evitando así la formación de dímeros de unión al ADN. Además se ha demostrado que puede unirse a otros factores de transcripción y a promotores de STAT1 y NFkB (Liu y Shuai, 2008).

3. La familia de proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS) que se producen en respuesta al incremento de la expresión de las proteínas STAT, este evento induce una retroalimentación negativa que previene la síntesis prolongada de citocinas y, por ende, la inflamación crónica y la tumorigénesis (Kershaw et al., 2013), (Figura 6).

1.7.1 Proteínas SOCS-1 y SOCS-3

Existen ocho proteínas de la familia SOCS: SOCS-1 a SOCS-7 y la proteína CIS, las cuales se caracterizan estructuralmente por su dominio central SH2 que se une a JAK evitando su interacción con STAT; y por su caja SOCS que recluta a la ubiquitina ligasa E3 que sirve de eslabón de la culina 5, para catalizar el marcaje con ubiquitina de los intermediarios fosforilados que se unen a los dominios SH2 de SOCS, induciendo su degradación por vía proteasomal (Figura 6), (Babon et al., 2013; Zhang et al., 2001; Kamizono et al., 2001). Las proteínas SOCS1 y SOCS3 contienen además una región inhibidora de cinasas (KIR) que funciona como pseudosustrato de las proteínas JAK y hace de ellas los más potentes supresores de las señales mediadas por citocinas que, a diferencia del resto de las proteínas SOCS, pueden inhibir la señalización por acción directa sobre las cinasas JAK (Kile et al., 2002, Wormald y Hilton 2004, Akhtar y Benveniste 2011, Babon et al., 2013; Yasukawa et al., 1999; Sasaki et al., 1999) (Figura 6).

Los transcritos de SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3 y CIS, se encuentran presentes a niveles indetectables en las células y son rápidamente inducidos por un amplio espectro de factores celulares, tanto *in vitro* como *in vivo*, tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IFN- γ , Epo, G-CSF, GM-CSF, Factor inhibidor de leucemia (LIF), prolactina y hormona de crecimiento. Por otro lado, en la mayoría de los casos, la estimulación por citocinas resulta en la inducción de varios miembros de la familia de SOCS, excepto de SOCS-3, la cual es específicamente inducida por citocinas tales como IL-6 (Krebs y Hilton, 2001), además, se ha visto que es altamente inducida por IL-10, aunque no es requerida para su regulación negativa (Lang et al., 2003; Yasukawa et al., 2003).

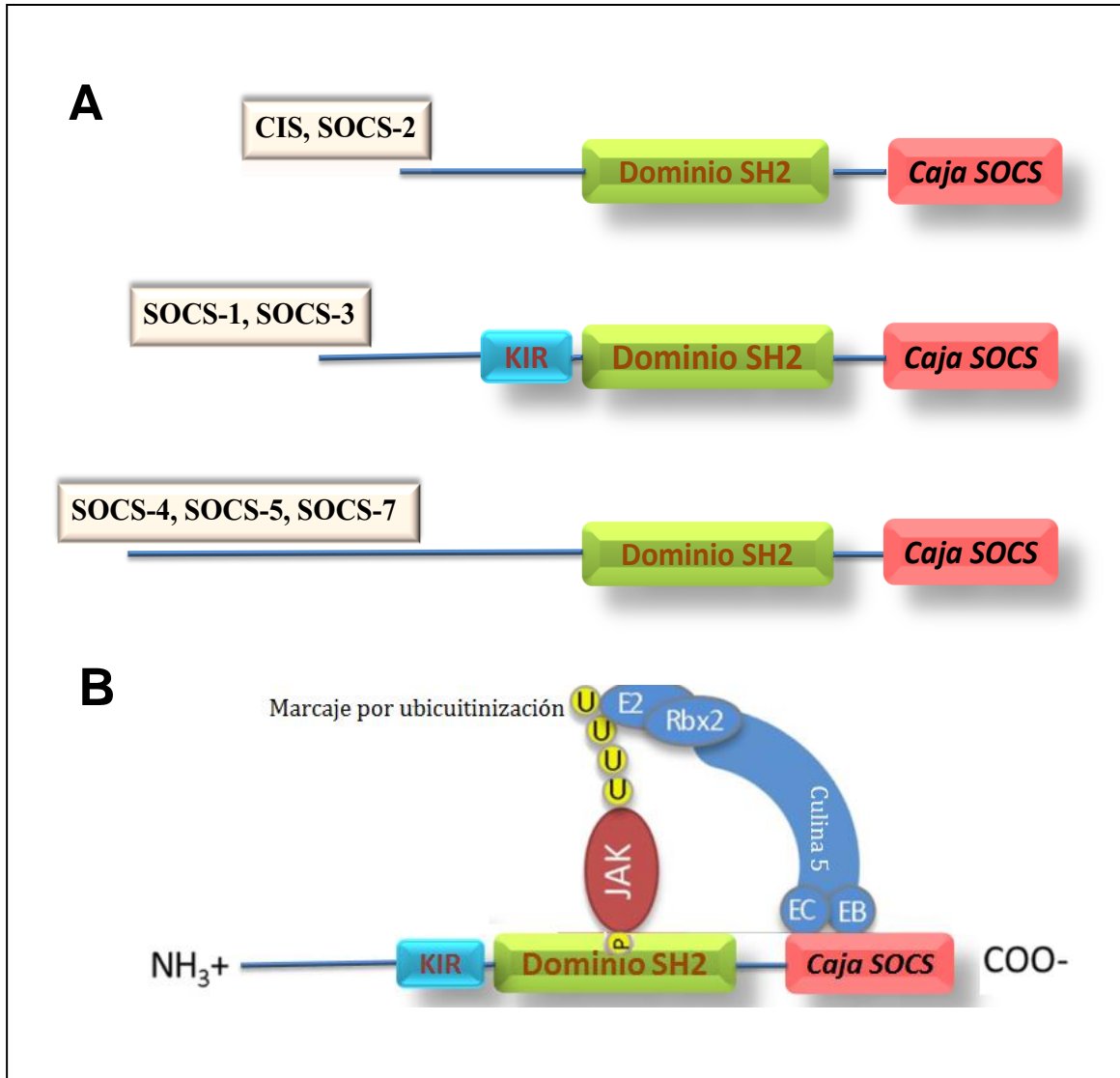


Figura 6. Esquema de la estructura de las proteínas SOCS. **A.** Características de las proteínas SOCS: se muestran su dominio SH2 y la caja SOCS en la región C-terminal para todas las proteínas SOCS; SOCS-1 y SOCS-3 poseen además un dominio KIR, finalmente, la región N-terminal varía en las diferentes proteínas SOCS, tiene una mayor longitud de SOCS-4 a SOCS7. **B.** Representación esquemática del marcaje por ubiquitinización de la caja SOCS, para la degradación proteasomal de la proteína JAK fosforilada (Imagen modificada de Nowoslawski et al., 2011).

Mediante ensayos de inhibición *in vitro*, y por medio de cristalografía, se ha demostrado que SOCS-3 se une a las proteínas JAK1, JAK2 y TYK2 a través del subdominio ESS (excedente de SH2), que es una extensión α -helicoidal del N-terminal del dominio SH2 (Babon et al., 2012, Kershaw et al., 2013).

Los mecanismos de acción de SOCS-1 son similares a los de la proteína SOCS-3, no sólo porque existe un alto grado de similitud en la secuencia del dominio KIR entre ambas proteínas, sino también en la secuencia de la superficie tridimensional que entra en contacto con las proteínas JAK (Babon et al., 2012). SOCS-1 puede unirse a las mismas proteínas JAK que SOCS-3, pero muestran diferente afinidad por los receptores de citocinas.

La inducción de las proteínas SOCS, por la activación de TLRs, es dependiente de MyD88, con excepción de TLR-3 y TLR-4 que utilizan una vía de inducción mediante el adaptador TRIF (Figura 7). Las proteínas SOCS no inhiben directamente la vía dependiente de la MAP cinasa y de NF- κ B, estas proteínas son capaces de inhibir la señalización autocrina secundaria de IFN- β , mediando de manera negativa a STAT-1 (Baetz, 2004).

Las proteínas STAT son blancos directos de las proteínas SOCS (Figura 7) (Alexander and Hilton, 2004; Yoshimura et al., 2007). SOCS-3 controla la cantidad y calidad de la activación de STAT, tanto ~~para~~ para STAT1 como STAT3, mediada por gp130 (El Kasmi et al., 2006). Por su parte, el promotor del gen SOCS-1, contiene sitios putativos de unión a STAT3 y STAT6, así como un motivo potencial a GAS, el cual media la unión con STAT1, siendo éste el principal elemento de regulación de SOCS-1 (Krebs 2000); por esto se considera que es un inhibidor importante de la activación de IFN- γ e IFN- α / β (Ilangumaran et al., 2003; Davey et al., 2006).

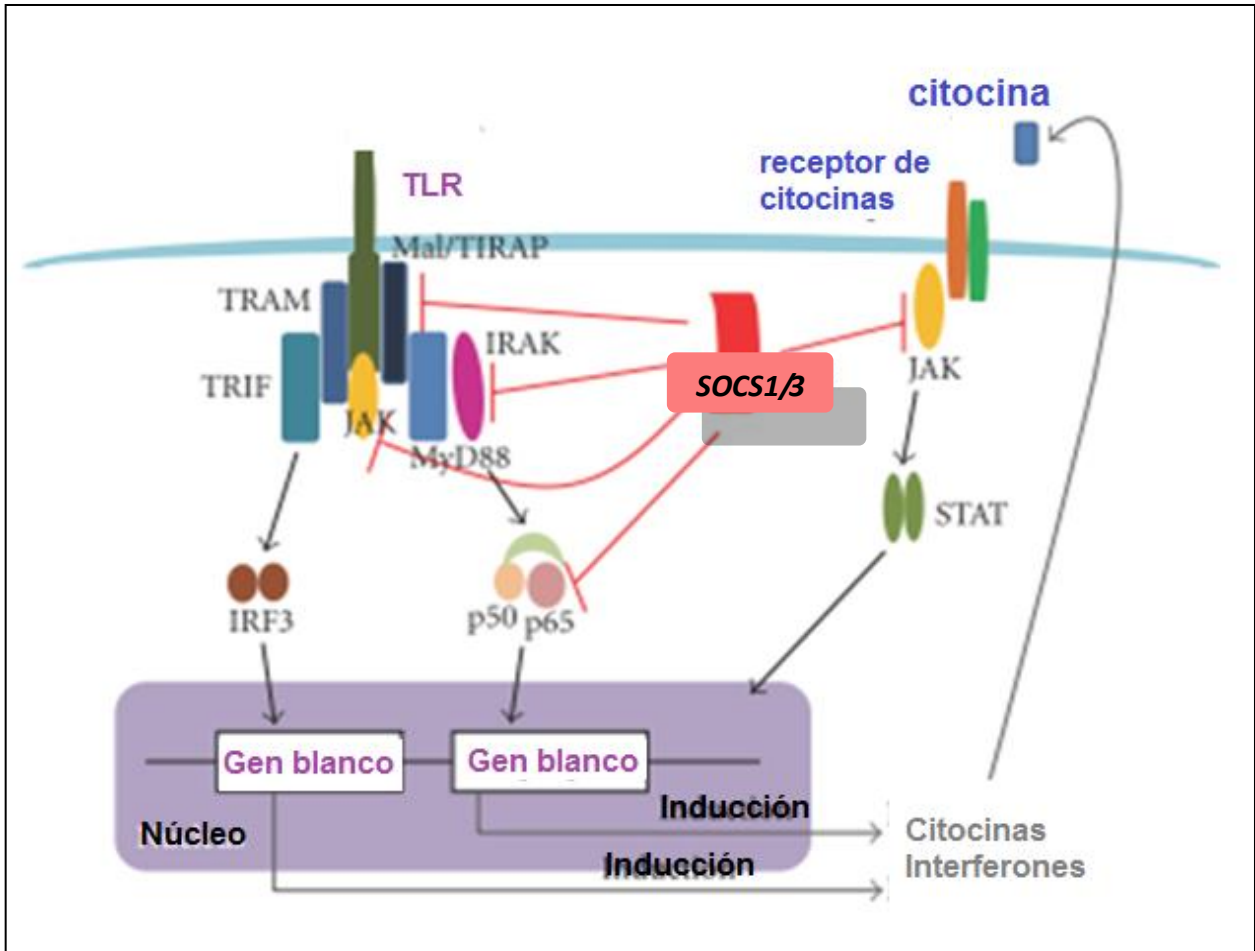


Figura 7. Mecanismos de regulación negativa de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3. Ambas, SOCS-1 y SOCS-3 inhiben la actividad de JAK a través de su dominio KIR, también por unión, a través del dominio SH2 se unen al receptor asociado a JAK suprimiendo su interacción con STAT e inhibiendo la cascada JAK-STAT. En especial, SOCS1, mediante su caja SOCS, induce la degradación proteasomal de Mal/TIRAP y la subunidad p65 de NFκB, además parece unirse a IRAK y modular su actividad (Imagen modificada de Fujimoto et al., 2010).

1.7.2 Proteína PIAS-1

La familia de proteínas inhibidoras de STAT (PIAS) está conformada por PIAS-1, PIAS3, PIASx α , PIASx β y PIASy. Mediante ensayos bioquímicos se ha demostrado que PIAS3 y PIASx interactúan con STAT3 y STAT4, respectivamente, mientras que PIAS-1 y PIASy interaccionan con STAT1. Además, PIAS-1 y PIAS3, regulan de forma negativa a STAT1 mediante el bloqueo de su unión al ADN. Por otra parte, PIASx y PIASy reprimen la actividad transcripcional STAT1 y STAT4, por reclutamiento de moléculas corepresoras como histonas desacetilasas (Furqan et al., 2013).

Las proteínas PIAS contienen varias regiones conservadas: el dominio en forma de anillo con similitud a dominios de dedos de zinc (RDL), el dominio SAF-A/B y PIAS (SAP) localizado en la región N-terminal de las proteínas PIAS, el cual puede reconocer y unirse a secuencias del ADN ricas en AT presentes en regiones de adhesión o andamios para la adhesión a la matriz nuclear (S-MAR). Asimismo, el dominio SAP, contiene un motivo LXXLL que medía la interacción entre receptores nucleares y sus correguladores. Otra región altamente conservada de las PIAS es el motivo Pro-Ile-Asn-Ile-Thr (PINIT), que parece estar involucrado en la retención nuclear de PIAS3. Una región conservada de todas las proteínas PIAS, excepto PIASy, es la región sumamente ácida AD, la cual tiene un motivo de interacción SUMO1 (SIM). Las regiones menos conservadas se encuentran en la región C-terminal de las proteínas PIAS, como una región rica en Ser/Thr, localizada en todas la proteínas PIAS a excepción de PIASy (Shuai, 2005; Long et al., 2003), (Figura 8).

Dentro de esta familia de proteínas, se ha observado que las proteínas PIAS-1 y PIAS3 tiene una función reguladora de la señalización de STAT. Estas proteínas pueden interactuar de manera

específica con STAT1 y STAT3, respectivamente, en respuesta a estímulos con IFNs o IL-6 (Shuai, 1999; Chung et al., 1997).

La interacción PIAS-1-STAT1 es dependiente de la fosforilación de STAT1, a través de la interacción directa de la región carboxilo terminal de PIAS-1, con el dominio terminal NH2 de STAT1. Mediante análisis mutacional de PIAS en levaduras, se caracterizó la interacción específica de PIAS-1 con la tirosina fosforilada de STAT1 dimérica. Por su parte, el N-terminal de PIAS-1 no interactúa con STAT1 y parece prevenir la unión de su C- terminal con el monómero STAT1 fosforilado (Liao et al., 2000). También, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), se determinó la afinidad de PIAS-1 con los promotores de genes blanco de STAT1 (Liu et al., 2004) y, a través de ensayos de deficiencia de metilación y de metilación simulada de PIAS-1, se encontró que la metilación de PIAS-1 es necesaria para la función represora de las enzimas proteína-arginina metiltransferasas (PRMT) durante la inducción, por el IFN, de la transcripción de PIAS-1 y su unión a promotores de genes blanco de STAT1 (Weber et al., 2009), (Figura 8).

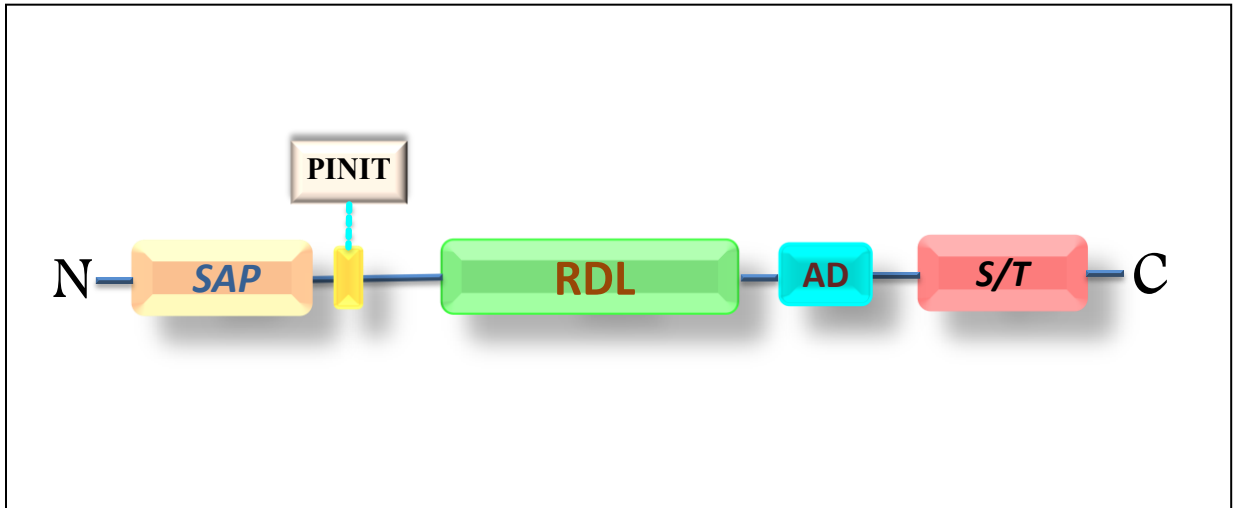


Figura 8. Representación esquemática de la proteína PIAS-1. Las regiones conservadas de las proteínas PIAS, incluyen el dominio RDL, que es un anillo parecido a dedos de zinc; el dominio SAP, de interacción con receptores nucleares, localizado en la región N terminal; el motivo PINIT, involucrado en la retención nuclear; una región sumamente ácida, AD, que contiene un motivo de interacción SUMO y una región Ser-Thr en la región C terminal. (Imagen realizada para esta tesis)

2 ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 *Evasión de la respuesta antiviral*

Durante una infección viral se activa la respuesta inmune innata, la cual tiene como uno de sus principales protagonistas al IFN tipo I, que es capaz de estimular la transcripción de cientos de genes de respuesta a IFN, entre ellos citocinas, quimiocinas y proteínas de respuesta antiviral, como OAS, MxA y PKR.

Se han identificado diferentes mecanismos que antagonizan la respuesta antiviral mediada por IFN, ya sea inhibiendo la expresión de genes, secuestrando componentes de la vía de señalización del IFN o mediante su marcaje para degradación por vía proteasomal (Versteeg y García-Sastre, 2010). Por ejemplo, varios poxvirus codifican un receptor soluble homólogo al receptor para IFN, mediante el cual se reduce la actividad biológica del IFN (Upton et al., 1992; Symons et al., 1995; Colamonici et al., 1995). Por su parte, la proteína E1A de los adenovirus, puede inhibir la señalización de IFNs a través de la disminución de los niveles de p48 y STAT1 (Leonard et al., 1996). El virus de la parainfluenza humana puede inducir la degradación de STAT2 (Nishio et al., 2001, Parisien et al., 2001), mientras que el virus de Sendai inhibe las vías de señalización de IFNs por interacción con STAT1 y la consecuente inhibición de su fosforilación (Garcin et al., 1999; Gotoh et al., 1999; Komatsu et al., 2000). Dentro de la familia de los flavivirus, el virus Langat, el virus de la encefalitis transmitido por garrapatas (TBEV) y el virus de la encefalitis japonesa, pueden inhibir la cascada de señalización JAK-STAT, por un mecanismo dependiente de sus proteínas no estructurales que bloquean la fosforilación de las proteínas STAT1 y JAK1 (Hollidge et al., 2011).

La sobreexpresión de SOCS-1 y SOCS-3 es un mecanismo de inhibición de la respuesta antiviral utilizado por diversos virus, como son: virus de la influenza A (IAV), virus sincitial respiratorio (RSV), virus de la hepatitis C (HCV) y virus del herpes simple (HSV) (Fujimoto y Naka, 2010; Zhao et al., 2007; Yoshimura et al., 2007).

Algunos flavivirus, como el virus del este del Nilo (WNV) y el TBEV (encefalitis transmitida por garrapatas), inducen el incremento de la expresión de SOCS-1 y SOCS-3, lo cual se ha asociado con la patogénesis de la encefalitis ocasionada por estos virus, ya que inhiben temporalmente la señalización de citocinas, favoreciendo la neurotoxicidad en ratones infectados (Best et al., 2005; Werme et al., 2008; Laurent-Rolle et al., 2010; Mansfield et al., 2010). Por otra parte, se ha encontrado en estudios *in vitro*, que el virus de la encefalitis japonesa (JEV) modula la vía JAK-STAT e inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias, a través de la regulación de la expresión tanto del transcrito como de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3 en macrófagos (Lin et al., 2006, Kundu et al., 2013).

En este contexto, otro ejemplo de flavivirus, es el virus de la hepatitis C (HCV). Mediante estudios *in vitro*, se asoció el incremento de los niveles de SOCS-1 y SOCS-3 con la inhibición de la respuesta a IFN tipo I y el incremento de la replicación del ARN viral (Bode et al., 2003; Persico et al., 2007; Moorman et al., 2009; Bode et al., 2007). Así también, mediante la inducción de la expresión del ARNm de SOCS-3 en células de hepatoma humano, se observó la inhibición de la fosforilación y la entrada a núcleo de STAT1; por tanto, se propuso que contrarrestaba la actividad antiviral del IFN (Huang et al., 2007). Asimismo, se ha observado que el incremento de ARNm de SOCS-1 y SOCS-3 en células mononucleares de pacientes infectados, se puede asociar a una mala

respuesta al tratamiento con IFN tipo I (Kawaguchi et al., 2004; Moorman et al., 2009; Bode et al., 2003; Imanaka et al., 2005; Persico et al., 2008; Kim et al., 2009; Sedeño et al., 2010).

En lo que concierne a infecciones ocasionadas por otros virus, también se ha observado la disminución de la expresión de IFN tipo I, asociada al incremento de la replicación viral mediante el empleo de diversos mecanismos, tales como: la inhibición de las proteínas de la vía y la unión directa a las proteínas STAT (por competencia o por degradación por vía proteasomal), en las cuales se ha observado asociación con la inducción de la transcripción de PIAS-1, SOCS-1 y SOCS-3 (Fujimoto y Naka, 2010 Nowoslawski y Benveniste, 2011; Yoshimura et al., 2007).

2.2 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune del virus de dengue

En la infección con el virus de dengue, durante la replicación viral, se produce un ARN de doble cadena, el cual puede ser detectado a través de los receptores TLR 3, TLR 7 y TLR 8 dentro del endosoma; a su vez, RIG-1 y MDA5 detectan el ARN de doble cadena en el citoplasma (Honda et al., 2006; Tsai et al., 2009; Loo et al., 2008, Conceicao et al., 2010). Este reconocimiento, como se menciona antes, desencadena la señalización que permite la activación de las cinasas JNK y MAPKs, así como de los factores de transcripción NF- κ B, IRF3 e IRF7, con lo cual se produce la activación de la transcripción de citocinas pro-inflamatorias y moléculas coestimuladoras, como IFN tipo I (Bonjardim et al., 2009; Takeda y Akira, 2001; Xagorari y Chlichlia, 2008). A su vez, RIG-1 y MDA-5, a través de la activación de IPS-1, IKKi, TRAF3 y la cinasa de unión a TANK (TBK)-1, ocasionan la activación a IRF3 (Ubol et al., 2010).

El virus de dengue, como otros virus, tiene mecanismos mediante los cuales logra infectar una célula y que parecen evitar la activación de los sistemas de reconocimiento de PMAPs. En primer lugar,

una vez dentro de la célula, el virus induce la formación de arreglos intracelulares como los paquetes vesiculares y complejos de replicación (den Boon et al., 2010), al interior de los cuales se concentran los componentes tanto del hospedero como virales requeridos para su replicación, como son las proteínas no estructurales en los paquetes vesiculares unidas al retículo endoplásmico (RE) que se comunican al citoplasma mediante poros, de tal forma que logran conformar un microambiente parcialmente aislado del citosol, evitando su interacción con los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), (Morrison et al., 2012).

Por otro lado, y a semejanza de otros virus, el DENV altera la respuesta innata de la célula, mediante la inhibición del IFN tipo I, esto se ha observado a través de varios estudios *in vitro* y con diferentes tipos celulares (Ho et al., 2005; Jones et al., 2005; Mazzon et al., 2009; Muñoz Jordan et al., 2003). La disminución del IFN tipo I se asoció a la disminución de la forma fosforilada de STAT1 y la proteína STAT2, en células A549 y K562, células dendríticas y células HepG2 infectadas con el virus; sin embargo, esta disminución varía de acuerdo a la línea celular evaluada (Muñoz-Jordan 2003, Jones et al., 2005, Mazzon et al., 2009, Ho et al., 2005, Umareddy et al., 2008). La inhibición de IFN I se observó también mediante la coexpresión individual, de preparados peptídicos de las proteínas no estructurales del virus: NS4B y NS4A y NS2A, en las líneas celulares A549 y Vero estimuladas con IFN- α . Se sugiere que estos péptidos inhibieron dos diferentes promotores de ISRE en respuesta a IFN- β (Muñoz-Jordan, 2003), y que la inhibición de IFN fue mayor con la coexpresión del complejo proteico NS2A/B unido a la proteasa viral (Muñoz-Jordan et al., 2005). Aunado a esto, se ha observado que la proteína NS5 puede unirse e inducir la degradación proteasomal de la proteína STAT2 (Jones et al., 2005; Ashour, et al., 2009; Mazzon et al., 2009; Ashour et al., 2010; Umareddy et al., 2008).

3 JUSTIFICACIÓN.

El dengue es una enfermedad de etiología viral que se caracteriza por cuadros clínicos de curso agudo, que pueden causar la muerte del paciente y cuya incidencia se ha incrementado en los últimos años. La OMS estima una incidencia anual de cerca de 200 millones de casos, con aproximadamente 500,000 casos de dengue severo que requieren de hospitalización con riesgo a desencadenar choque por dengue, del cual su tasa de mortalidad es de 1 a 2.5%. Hasta la fecha no se han logrado esclarecer las razones por las cuales la infección puede evolucionar a cuadros hemorrágicos, aunque una mala evolución clínica se ha relacionado con la desregulación de la respuesta inmune antiviral y la sobreproducción de citocinas proinflamatorias, lo cual modifica la permeabilidad vascular. A pesar de que diversos estudios han mostrado que existe un decremento de IFN tipo I asociado a la enfermedad, los mecanismos por los cuales se altera la respuesta antiviral, durante la infección por dengue, aún no han sido totalmente esclarecidos, por lo cual, todavía se requieren más estudios para entender los mecanismos de evasión de la respuesta antiviral con lo que el virus de dengue logra establecer una infección y desregular la respuesta inmune, el presente trabajo se enfoca en el análisis de los efectos del virus de dengue sobre la expresión de proteínas que regulan negativamente las señales inducidas por citocinas, las proteínas SOCS1, SOCS3 y PIAS1.

4 HIPÓTESIS

La infección con el virus de dengue induce la transcripción de SOCS-1, SOCS-3 y PIAS-1, cuyo incremento está asociado a la desregulación de las vías de señalización involucradas en la expresión de IFN- α y la respuesta inflamatoria relacionadas con cambios en la permeabilidad vascular y en la respuesta antiviral, con lo cual logra garantizar su replicación viral.

5 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la infección con el virus de dengue en la activación de la vía JAK-STAT y la expresión de proteínas de actividad antiviral, y en la expresión de proteínas supresores de las señales mediadas por citocinas (SOCS1, SOCS3 y PIAS1) y la participación del IFN- α en la replicación viral, como parte de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune antiviral en la línea celular de monocitos/macrófagos U937.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el efecto del tratamiento con IFN- α en la replicación viral.
2. Analizar la activación de la vía JAK-STAT en las células infectadas con el virus de dengue y en células previamente estimuladas con IFN- α , e identificar las modificaciones en la expresión de proteínas de las vías de señalización mediadas por IFN (STAT 1 y STAT 2), en su forma fosforilada y no fosforilada, así como de las proteínas antivirales producto final de la vía JAK-STAT (MxA y OAS).
3. Determinar los cambios en la expresión y en el nivel de transcripción de genes que codifican proteínas supresoras de la respuesta inmune (SOCS-1, SOCS-3, PIAS-1) en células infectadas con el virus de dengue, así como en células previamente estimuladas con IFN- α .
4. Analizar el efecto del silenciamiento del ARN mensajero de SOCS-1 y SOCS-3 sobre la replicación viral y la expresión de genes de respuesta antiviral.

7 MATERIAL Y MÉTODOS:

7.1 *Cultivo de las líneas celulares*

Las células C6/36 (ATCC N° CRL-1660), que corresponden a células de larva completa de mosquito *Aedes albopictus*, se cultivaron en medio MEM (Minimum Eagle's Medium) (GIBCO) suplementado con 2 mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 10 nM de NaHCO₃ y 10% de suero bovino fetal (SBF, el cual fue previamente inactivado por calor a 56°C durante 30 min) y fueron incubadas a 28°C.

La línea celular de fibroblastos, de riñón de hámster bebé (*Mesocricetus auratus*), BHK-21, (ATCC N° C CL-10) se cultivó en medio mínimo esencial MEM (GIBCO), enriquecido con 2 mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 10 nM de NaHCO₃ y 10% de SBF y se incubó a 37°C en un ambiente húmedo al 5% de CO₂.

Las células U937 (ATCC N° CRL-1593.2), que corresponden a monocitos provenientes de un linfoma histiocítico de origen humano, se replicaron como monocitos en suspensión, se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 2 mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 10 nM de NaHCO₃ y 10% de SBF. Las células se incubaron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C, realizando cambios de medio cada dos o tres días.

7.2 *Replicación viral.*

La replicación del virus de dengue tipo 2, cepa 16681, donado por el Dr. Alvaro Aguilar Setien del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, se llevó a cabo en la línea celular C6/36, en botellas de cultivo p25. Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 90%, se colocó el inóculo

viral, por 1 hora en incubación a 28°C, después de este tiempo se retiró el medio y se lavaron las células con solución de fosfatos para mamíferos (PBS, pH 7.4). A continuación, se agregó medio nuevo con 5% de SBF y se mantuvo en incubación durante 48 horas, después de este tiempo las células se desprendieron y lisaron por acción mecánica, mediante pases sucesivos a través de agujas de diferentes calibres (24 y 22). Los homogeneizados se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y los sobrenadantes se pasaron a través de un filtro de 0.22 µg, almacenándose a -20°C hasta su uso (no más de 1 mes).

Para asegurar que los resultados obtenidos se debieron a la replicación viral, se realizaron ensayos con virus inactivados, mediante la exposición a luz ultravioleta (UV) durante 30 minutos.

7.3 Titulación viral

Se evaluó la titulación viral a través de la técnica de formación de placas líticas en células BHK-21 y se confirmó la inactivación del virus por la exposición a la luz UV, a través de esta misma técnica, por inhibición de la capacidad de formar placas líticas en comparación al virus activo.

Las células BHK-21 se cultivaron en medio MEM suplementado con glutamina, NaHCO₃, antibiótico y SBF al 10% hasta llegar a una confluencia del 70%; se les agregó el sobrenadante con diluciones de 1x10² a 1x10⁸ del virus obtenido en las células C6/36, en el mismo medio de cultivo con 5% de SBF y se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo al 5% de CO₂.

Después de una hora de incubación, se retiró el sobrenadante, se lavaron las células con PBS y se agregó, a una proporción 1:1, medio MEM al 5% de SBF y agarosa al 0.7%, se incubaron en un

ambiente húmedo al 5% de CO₂ y se analizó el número de placas líticas a 24, 48 y 72 horas post-infección.

Para la cuantificación del número de placas líticas se retiró la agarosa y las células se fijaron con ácido tricloroacético al 10% por 10 minutos; pasado este tiempo se bañó con solución de cristal violeta al 1% por 10 minutos, después del cual se lavó con agua corriente y se dejó secar; los sitios donde se perdieron células por la acción del virus se observan como puntos sin teñir, mismos que son llamados placas líticas, éstas se contaron. El título viral se determinó por unidades formadoras de placa mediante la siguiente ecuación:

$$UFP/\mu l = \frac{\text{No de placas} \times \text{antilog dilución viral}}{\mu l \text{ de diluyente}}.$$

Donde UFP = Unidades formadoras de placas.

7.4 Diferenciación e infección de las células U937

Los monocitos U937 se diferenciaron a células adherentes “macrófagos” mediante el tratamiento con 10 ng/ml de forbol, 12-miristato, 13-acetato (PMA) en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 10 nM de NaHCO₃ y 5% de suero bovino fetal durante 24 horas. Después de este tiempo, se realizó el cambio de medio RPMI al 10% de suero bovino fetal y se incubaron 24 horas en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

Se realizó la infección con el virus de Dengue con el sobrenadante viral de las células C6/36 previamente titulado (1x10⁷ UFP/ml) a una MOI de 1 UFP/célula, en placas de 6 pozos con una concentración celular de 1x10⁶ células/pozo y en placas p100 con 8x10⁶ células/placa. Como control

negativo del efecto de la replicación viral, se utilizaron estas mismas condiciones, con el virus inactivado con luz UV, por 30 minutos.

Como control positivo de activación de la vía de IFN, se realizó la estimulación con IFN- α (1000UI/10⁶ células) durante 6 horas, para tener dos condiciones experimentales: un control de tratamiento (el cual se trató bajo las mismas condiciones, pero sin infección) y uno donde se agregó el virus de dengue.

De esta forma se manejaron 5 condiciones experimentales: **1.** Las células que fueron mantenidas bajo las mismas condiciones experimentales, pero que no recibieron ningún tratamiento o células Control (U937); **2.** Células infectadas con el virus de dengue (DENV); **3.** Células tratadas con IFN- α como control positivo (IFN); **4.** Células tratadas con IFN- α e infectadas con el virus de dengue (IFN+DENV); y **5.** Células tratadas con el virus inactivado con luz UV (DUV).

7.5 RT-PCR punto final

Para la realización de la técnica de RT-PCR de punto final, se utilizó la técnica de RT-PCR en un solo paso (Invitrogen Superscript One Step, 1226529), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron 50 ng de ARN total extraído mediante TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de los cultivos celulares, y se utilizaron iniciadores específicos.

Para la determinación de la replicación viral del virus de dengue se utilizaron los iniciadores para el virus de dengue 2 reportados por Lanciotti (Lanciotti et al 1992):

Iniciadores sentido 5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3' y antisentido 5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3', que amplifican un fragmento de 119 pb que corresponde a un fragmento del gen que codifica para la proteína C, de la capsida, del virus de dengue tipo 2. El

RT-PCR se realizó con el siguiente programa: RT 42° por 60 minutos, seguida 30 ciclos de amplificación, 94°C por 30 s, 55°C por 1 minuto, 72° por 2 minutos y un paso final a 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación fueron secuenciados y comparados contra las secuencias reportadas para virus de dengue en el GenBank.

Para la determinación de la expresión de PKR y MxA, mediante RT-PCR de punto final, se emplearon los iniciadores previamente reportados por Schindler et al, 1992 y Aebi et al, 1989, respectivamente (Schindler et al, 1992 y Aebi et al, 1989). Estas determinaciones se realizaron a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-infección, y se realizó bajo el siguiente programa: RT 42° por 60 minutos, seguida 30 ciclos de amplificación, 94°C por 30 s, 55°C por 1 minuto, 72 ° por 1 minuto y un paso final a 72°C por 5 minutos. Se determinó la expresión de las proteínas SOCS-1, SOCS-3 y PIAS-1, por PCR punto final con los iniciadores que se encuentran en la tabla 1. Se utilizó la ciclofilina como gen endógeno y se amplificó con el siguiente programa: RT 42° por 60 minutos más 30 ciclos de amplificación, 94°C por 30 s, 60°C por 1 minuto, 72 ° por 15 segundos y un paso final a 72°C por 5 minutos.

7.6 *Análisis por densitometría de los productos de PCR*

El nivel de transcripción de los genes de las proteínas supresoras de la vía JAK-STAT se determinó a través del análisis semicuantitativo de las amplificaciones obtenidas por RT-PCR de punto final, mediante el programa de procesamiento y análisis de imagen *ImageJ* (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, 2010). Para este análisis de la densidad de la banda del producto de PCR de cada gen (SOCS-1, SOCS-3 y PIAS-1), fue normalizada con su respectiva densidad de banda de su respectivo gen control (RNAsa P) a las 24, 48 y 72 horas post-infección, a partir del producto de PCR observado en un gel de agarosa al 1.5%.

7.7 RT-PCR en Tiempo Real

7.7.1 Transcripción reversa

Para realizar la RT-PCR en tiempo real, primero se llevó a cabo la purificación de ARN total celular mediante el empleo de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Fermentas), y se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm. A continuación el ARN obtenido se sometió a transcripción reversa, utilizando iniciadores de secuencia aleatoria incluidos en el kit de RT RevertAid H Minus Reverse Transcriptase kit (Fermentas), los tiempos de incubación para la reacción de RT fueron 25 °C por 10 min, 42 °C por 60 min y 70 °C por 10 min.

7.7.2 PCR en tiempo real

Una vez obtenido el ADN complementario (ADNc) se utilizó el Sistema comercial Maxima SYBR Green ROX qPCR (Fermentas), para la realización de la PCR en tiempo real, mediante el cual se hizo la cuantificación relativa de los niveles de transcripción de *MxA*, *OAS*, *IFN- γ* , *TNF- α* , así como de *SOCS-1*, *SOCS-3* y *PIAS-1*, de las diferentes condiciones experimentales para las células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA, utilizando iniciadores específicos (Tabla 1).

Para hacer la cuantificación relativa se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, que consiste en calcular el $\Delta\Delta C_T$, que es la diferencia entre el ΔC_T de los grupos a comparar ($\Delta C_T_{blanco} - \Delta C_T_{endógeno}$), y hacer la operación matemática $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Para esto se utilizaron genes de expresión constitutiva en la comparación. En este caso se utilizaron *HPRT* para la cuantificación de *MxA* y *OAS*. *RNAse P* para *SOCS-1*, *SOCS-3* y *PIAS-1*; β -actina para *IFN- α* , *TNF- α* e *IFN- γ* (Tabla 2).

Tabla 1. Iniciadores para PCR en tiempo real de los genes blanco

Gen	No de acceso NCBI	Secuencia de oligonucleótidos	Producto (pb)
MxA	NC 000021.9	S 5' -TCCAGCCACCATTTCCAAG-3' A 5' - CAACAAGTTAAATGGTATCACAGAGC -3'	69
OAS	NM 002534	S 5'-GGTGGAGTTCGATGTGCTG-3' A 5' - AGGTTTATAGCCGCCAGTCA -3'	64
SOCS-1	NM 3745.1	S 5'-CACGCACTTCCGCACATTCC-3' A 5' - TCCAGCAGCTCGAAGAGGCA -3'	300
SOCS-3	NM3955.3	S 5'-ACAATCTGCCTCAATCACTCTG 3' A 5' - TTGACTTGGATTGGGATTTTG-3'	129
PIAS-1	NM16166.1	S 5'-TGGGTTTGTCTGTCTGTGA -3' A 5'-GGGAGATAGGGAAGGACAGG-3'	344
IFN- α 2	ENST00000315719	S 5'-CTTGAAGGACAGACATGACTTTGGA-3' A 5'-GGATGGTTTCAGCCTTTTGGA-3'	74
TNF- α	NM214022	S 5'-TGGCCCCTTGAGCATCA-3' A 5'-CGGGCTTATCTGAGGTTTGAG-3'	67
IFN- γ	NM000619	S 5'-TCAGCTCTGCATCGTTTTGG-3' A 5'-GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA-3'	118

TABLA 2. Iniciadores para PCR en tiempo real de los genes endógenos

Gen	No de acceso NCBI	Secuencia de oligonucleótidos	Producto (pb)
HPRT	M26434.1	S 5'-CCTGGCGTCGTGATTAGTGATGATG-3' R 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCTGTC-3'	193
RNasa P	AK296196.1	S 5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3' R 5'-GAGCGGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'	64
B-actina	NM001101	S 5- TTCTACAATGAGCTGCGTGTG -3' R 5- ATCACAATGCCAGTGGTACG -3'	191

Se corroboró la eficiencia relativa óptima de los iniciadores, para cada gen se realizó una dilución seriada y se construyó una curva con el valor de los rangos de ΔC_t , para cada dilución, y se obtuvo la pendiente para cada caso. Después, se calculó la eficiencia mediante la fórmula $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$, cuando $E=100$ corresponde al 100% de eficiencia, que indica que en cada ciclo, la amplificación se duplica.

7.7.3 Validación de la PCR en Tiempo Real

Para la PCR en tiempo real, mediante el uso de SYBR Green, se requiere realizar una validación, que consiste en obtener un rango dinámico de la concentración de ARN total para cada PCR de cada gen de estudio contra su respectivo gen endógeno, efectuándolo con el ADNc obtenido de la respectiva reacción de RT. Dicho rango dinámico se define como el intervalo en el cual se obtiene un ΔC_T ($\Delta C_T = C_{T \text{ problema}} - C_{T \text{ endógeno}}$), muy cercano para las concentraciones específicas de ARN, en donde los valores de cada ΔC_T para cada concentración son muy similares de manera que, al graficar

el ΔC_T obtenido contra el log de la concentración de ARN utilizado, se tiene una tendencia lineal con un valor de $R \leq 0.03$.

Para la validación de la PCR en tiempo real con SYBR Green, se partió de concentraciones de ARN total de 25, 50, 100, 200, 400 y 800 nanogramos de cada condición experimental para cada gen.

7.8 *Determinación de las proteínas por Western blot*

7.8.1 Preparación de los extractos celulares totales

Los macrófagos cultivados y diferenciados, a partir de 8×10^6 monocitos en suspensión/placa (p100), correspondientes a los 5 grupos experimentales antes mencionados, se lavaron con solución salina de fosfatos (PBS, pH 7.4) y se recuperaron con ayuda de una espátula. A continuación las células se homogenizaron por pipeteo, se centrifugaron a 2,000 rpm por 10 minutos, y la pastilla celular se lisó con el amortiguador de lisis Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas, Thermo Scientific, UK), adicionando coctel de inhibidores de proteasas (P8340; Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA) y de fosfatasas (78440; Thermo Scientific, UK), siguiendo las indicaciones del fabricante, posteriormente, los homogeneizados se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.8.2 Determinación de la concentración de proteínas

Para cuantificar las proteínas de los extractos celulares, se utilizó el método de Bradford, 1976, (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent). Alícuotas de 10 a 20 μ l de los extractos celulares, se diluyeron en 980 o 990 μ l de agua desionizada, respectivamente. A estas diluciones se les agregaron 200 μ l del colorante azul de Comassie G-250, cuya absorbancia máxima en su forma libre es de 470 nm y unido a proteínas es de 595 nm. La lectura de absorbancia de las muestras se realizó a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro.

En paralelo se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina, abarcando un intervalo de concentración entre 1 y 100µg.

7.8.3 Electroforesis

Los extractos obtenidos por el procedimiento mencionado anteriormente, fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes PAGE-SDS, en geles de poliacrilamida al 10 o 12 %, de acuerdo al peso molecular de la proteína de interés (16.6 ó 20 ml de acrilamida (30%), 6.6 ó 8 ml de Bys-acrilamida (2%), 12.5 ml de buffer (1.5 M Tris HCL) pH=8.8, 500 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS), 10%, agua desionizada, persulfato de amonio al 0.1% y tetrametilenediamina (TEMED) al 0.05%) con un gel de empaquetamiento al 3% (6.7 ml de acrilamida (30%), 2.7 ml de Bys acrilamida (2%), 12.5 ml de amortiguador (0.5 M Tris-HCL) pH 8.8, 500 µl de SDS (10%), agua desionizada, persulfato de amonio y TEMED. Se utilizó un amortiguador de corrida que contiene 0.192 M de glicina, 0.025 M de Tris, 0.1% de SDS a un pH de 8.3.

A continuación, se cargaron en cada carril el marcador de peso molecular y las alícuotas de los extractos celulares, los cuales fueron mezclados con amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25 µl) llevando a un volumen total de 20 µl y hervidos por 5 minutos. Para cargar el gel de poliacrilamida, se tomó un volumen de cada muestra, correspondiente a una concentración de 30 µg de proteína por pozo. A continuación se aplicó un campo eléctrico de 100 Volts (V) durante 2 horas.

Para la determinación del peso molecular de las bandas de proteínas, se empleó un coctel de estándares de peso molecular pre-teñido (26634, Thermo Scientific, UK).

7.8.4 Electrotransferencia

Una vez realizada la separación por electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.22 μm (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Se hizo el sandwich del gel con la membrana PVDF y papel filtro, previamente humedecidos con el amortiguador de transferencia (Tris-Glicina-Metanol), el cual se colocó en la cámara de electrotransferencia semihumeda. La electrotransferencia se corrió a 30 mA, 24 Volts por 50 minutos. Transcurrido ese tiempo, la membrana de PVDF fue lavada con TBS (50 mM Tris, 200mM NaCl. pH 7.4) y Tween al 0.1%, y el gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomasie (Coomasie brilliant blue 0.2%, metanol 45%, ácido acético glacial 10 %), para comprobar la efectividad de la transferencia.

7.8.5 Inmunorrevelado

Los sitios no específicos de la membrana de PVDF se bloquearon con una solución de bloqueo (leche 5% en H_2O , NaN_3 0.02%), durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante con el primer anticuerpo (Tabla 3), a una dilución 1:2000 en la solución de bloqueo. Al término de la incubación se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente, con TBS y un tercer lavado con TBS/Tween 20 al 0.1%, con el fin de remover el exceso de anticuerpo.

A continuación se adicionó el segundo anticuerpo (anti-conejo, anti-ratón o anti-cabra), el cual se encontraba acoplado a HRP (horse radish peroxidase) y se incubó por 2 horas a una dilución 1:5000 a temperatura ambiente y con agitación constante, después, se realizó un lavado con TBS/Tween 20 y dos con TBS. Finalmente la reacción de revelado se llevó a cabo en la oscuridad. La membrana de

PVDF se puso en contacto con 1 ml de solución 1:1 de peroxidasa y sustrato del kit de revelado (Merck Millipore) por 5 minutos, se colocó la membrana entre dos acetatos sobre un cassette de revelado y se puso una película radiográfica sensible a azul y verde (Kodak, T-MatG/RA film) sobre la membrana de PVDF por 45 segundos, se pasó el filme por la solución de revelado hasta que dio señal, se lavó en H₂O por un minuto, se pasó a la solución de paro (ácido acético al 3%), nuevamente se enjuagó en H₂O por un minuto y se pasa a la solución de fijado por 1 minuto y finalmente 1 minuto en H₂O y se deja secar.

Tabla 3. Anticuerpos específicos utilizados

Anticuerpo	No. de Catálogo
Anti-STAT1	(PAF-ST1, R&D Systems, Boston Biochem.)
Anti-STAT1 Fosforilado	(AF-2894 R&D Systems, Boston Biochem.)
Anti- STAT2	(MAB1666, R&D Systems, Boston Biochem.)
Anti-STAT2 fosforilado	(AF2890 R&D Systems, Boston Biochem.)
Anti-SOCS-1	(ab3691, ABCAM, Cambridge, MA.)
Anti-SOCS-3	(ab3693, ABCAM, Cambridge, MA.)
Anti-β-actina	(ab82361, ABCAM, Cambridge, MA)
Anti-conejo	(ab97051, ABCAM, Cambridge, MA)
Anti-ratón	(ab97023, ABCAM, Cambridge, MA)
Anti-cabra	(ab6741, ABCAM, Cambridge, MA)

El peso molecular de una proteína puede ser estimado, comparando su distancia de migración (M_r) en relación a la migración relativa de los estándares de peso molecular (26634, Thermo Scientific, UK). Para calcular el peso molecular de nuestra proteína en cada inmunoblot realizado, se hizo una curva de calibración del marcador Rainbow, la cual se construyó teniendo como variables la movilidad electroforética y el logaritmo base 10 del peso molecular de las proteínas del marcador. En esta curva se intersectó en el eje Y la distancia que recorrió la proteína en el gel (movilidad electroforética, eje X), para proceder a calcular el antilogaritmo de base 10 y, finalmente, obtener el peso molecular de la proteína de interés.

7.8.6 Densitometría

Para el análisis de las películas reveladas de cada inmunoblot, se realizó el escaneo y análisis por densitometría con el programa C-Digit Li-cor + Image Studio Digits versión 3.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). De la densidad óptica (DO) obtenida para las células control (U937) y las diferentes condiciones experimentales, se obtuvo la densidad óptica relativa para cada uno, se normalizó la DO obtenida para cada banda sobre la DO del control de β -actina para cada condición experimental. En total se realizaron 3 repeticiones independientes por cada ensayo y los resultados fueron analizados estadísticamente.

7.9 Inmunofluorescencia

Los macrófagos cultivados y diferenciados, a partir de 5×10^5 monocitos en suspensión/placa (placa de 24 pozos), correspondientes a los grupos experimentales: control, IFN y DENV, a las 3, 6, 12 y 24 h p.i., se lavaron con solución salina de fosfatos (PBS, pH 7.4) y se fijaron con solución de

paraformaldehído al 4% en PBS a pH de 7 por 5 minutos a 4°C, posteriormente fueron lavadas 3 veces con PBS y permeabilizadas con Triton X-100 (Sigma) al 0.1% por 2 minutos, después de lo cual se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS con 2% de SBF y 2% de gelatina (Sigma). A continuación, las células fueron incubadas con un primer anticuerpo específico contra STAT1 fosforilada (table 3) a una dilución 1:500 por 2 h a 37°C, después de 2 lavados con PBS se incubó el segundo anticuerpo anti conejo acoplado al fluorocromo FITC a una dilución 1:1000 (goat anti-rabbit-FITC antibody Sigma F0382) en 1% de SBF. Se realizaron dos lavados con PBS para eliminar el anticuerpo no acoplado y se procedió a teñir los núcleos con DAPI a una concentración de 10µg/ml por 2 minutos, después de lavar tres veces con PBS se procedió a observar las células usando un microscopio invertido de fluorescencia (Carl Zeiss Germany). Los fluorocromos FITC y DAPI fueron excitados utilizando filtros de longitud de onda de 488 y 430 respectivamente. Las microfotografías fueron capturadas con el programa Axiovision SE64 (version 4.8.3) (Carl Zeiss, Germany).

7.10 Silenciamiento de SOCS-1 y SOCS-3

Para el silenciamiento del ARNm de SOCS-3 y SOCS-1, se utilizó FlexiTube ARNsi premezcla para SOCS-1 (Hs_SOCS-1_4), SOCS-3 (Hs_SOCS-3_6) y control de ARNsi (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para estos ensayos, se utilizaron células U937 diferenciadas con PMA, como se explicó previamente en el apartado 7.4, después de 24 horas posteriores a la diferenciación se realizó la transfección de la premezcla de los pequeños ARNs de interferencia (ARNsi), los cuales fueron puestos en contacto con las células al añadirse directamente a una concentración final de 50 nM y un volumen final de 1 ml por pozo en la placa de 6 pozos, manteniéndose en cultivo a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas. En el momento de la transfección

con el ARNsi, las células estuvieron aproximadamente al 60 % de confluencia en 2 ml de RPMI/1640.

Se utilizaron cuatro condiciones experimentales respecto al silenciamiento: células no silenciadas (N-S), silenciamiento de SOCS-1 (S-SOCS-1), silenciamiento de SOCS-3 (S-SOCS-3) y silenciamiento de SOCS-1 y SOCS-3 (S-SOCS-1/3); posterior a la incubación con el ARNsi se iniciaron los tratamientos para cada condición, los cuales fueron los mismos mencionados anteriormente: Células sin tratamiento o control (U937), células tratadas con IFN- α (IFN), Células infectadas con el virus dengue (DENV), células tratadas con IFN- α e infectadas con el virus de dengue (IFN+DENV) y células tratadas con el virus inactivado con luz UV (DUV). Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C y 5% de CO₂, a las 12 h después del tratamiento, el ARN de las células se obtuvo por columnas (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU) y se determinó la expresión de SOCS-1, SOCS-3, IFN- α , TNF- α , MxA, OAS, IFN- γ por qRT-PCR, utilizando el sistema comercial de SyBR green Master Mix (Agilent Technologies), siguiendo las especificaciones del fabricante; se normalizó con los genes constitutivos HPRT y β -actina.

8 RESULTADOS

8.1 *Replicación viral*

La infección viral se corroboró de acuerdo a la observación microscópica de los efectos citopáticos ocasionados en las células C6/36. Adicionalmente, se confirmó la replicación viral, mediante la técnica de RT-PCR de un solo paso, a partir de la extracción de ARN total de los cultivos de las células infectadas, como se describió en metodología y se realizó la titulación viral de los sobrenadantes de las células infectadas mediante el método de formación de placas líticas.

En la Figura 9 A-C se observan imágenes representativas del efecto citopático del virus de dengue en las células C6/36, el cual consiste en lo siguiente: cambio en el número y largo de las extensiones celulares, incremento citoplasmático y aumento en el número de células no adheridas con respecto a las células no infectadas. Además, se observa la formación de sincicios (unión de las membranas celulares de células adyacentes que forman una sola célula multinucleada), los cuales fueron aparentes a partir de las 48 horas postinfección, como había sido ya reportado (Randolph y Stollar 1990).

En la Figura 9 D, se observa la amplificación por PCR de una muestra representativa de ARN total de células infectadas y se puede observar una banda de 119 pb que corresponde al peso molecular del fragmento amplificado del gen que codifica para la proteína de la cápside del virus de dengue tipo 2.

Los títulos virales obtenidos a través de la técnica de la formación de placas líticas en la línea celular BHK-21, de los sobrenadantes de las células infectadas a las 48 horas post-infección (p.i.), fluctuaron entre 25×10^6 y 30×10^6 UFP/ml como se muestra en la figura 9 E.

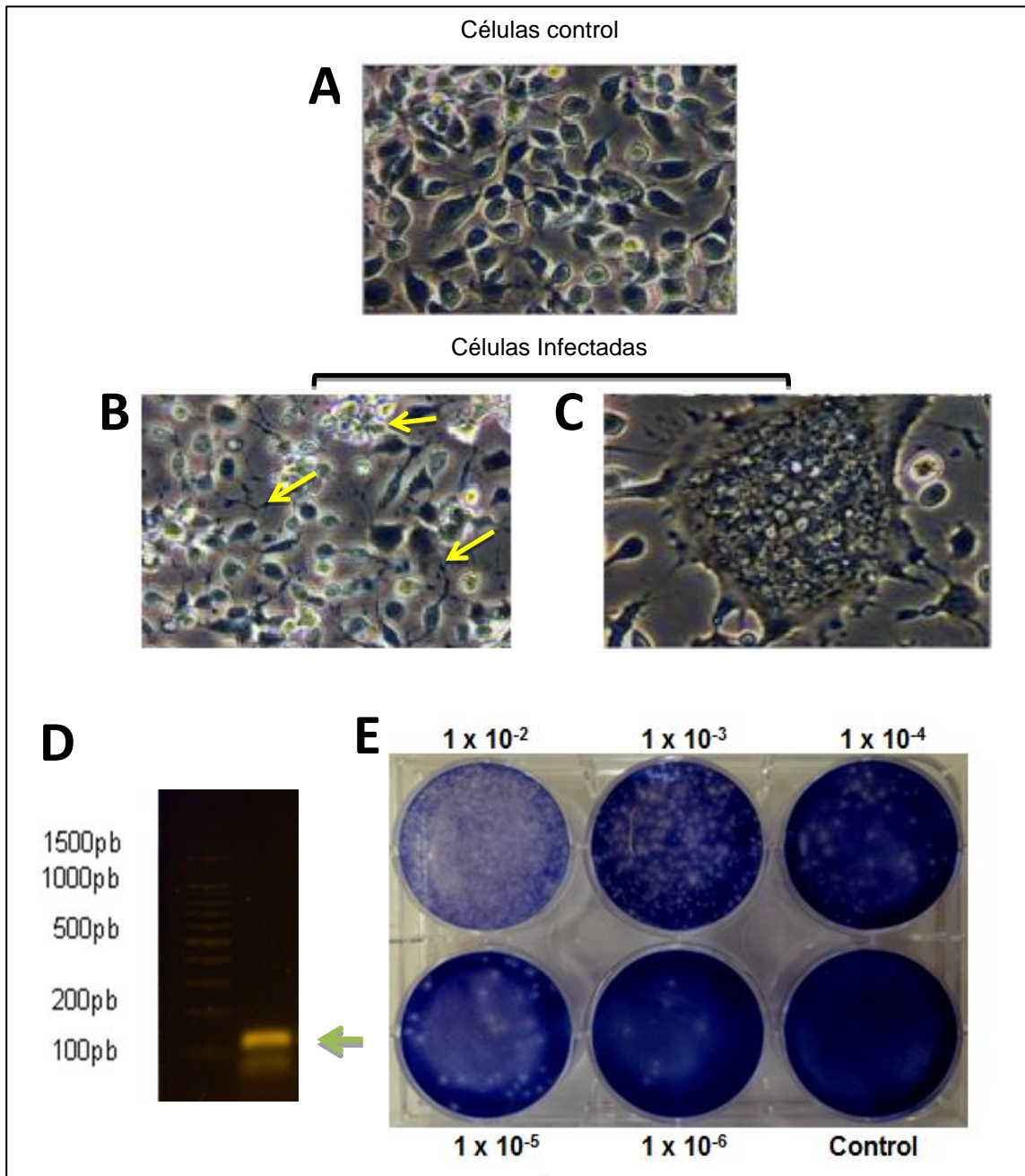


Figura 9. Infección con el virus de dengue tipo 2 (DENV) en células C6/36 **A.** Microfotografía de las células C6/36 (células control). **B.** Microfotografía de las células infectadas con DENV2 a las 48h p.i. en donde se observa el incremento de las extensiones citoplasmáticas y el desprendimiento celular (flechas amarillas). **C.** Presencia de sincicios en las células infectadas a 48h post-infección. **D.** Análisis en gel de agarosa del producto de la RT-PCR del ARN aislado del sobrenadante de células C6/36, en donde se observa una banda de 119 pb, que corresponde al fragmento amplificado del gen que codifica para la proteína C de la cápside del virus de dengue tipo 2. **E.** Titulación viral mediante el análisis de la formación de placas líticas en células BHK-21 a diferentes diluciones de los sobrenadantes obtenidos de las células C6/36 infectadas con el DENV, se observa la disminución del número de placas formadas de acuerdo con la dilución viral.

8.1.1 Infección de los macrófagos humanos U937

Las células U937, como se explicó en Material y Métodos, se replicaron como monocitos en suspensión (Figura 10 A) y fueron diferenciadas con PMA durante 24 horas a macrófagos (células adherentes, como se observa en la figura 10 B); después de una incubación de 24 h sin PMA, se inocularon con el sobrenadante viral de las células C6/36 previamente titulado, se utilizó una MOI de 1, que corresponde a una UFP/célula, con el cual las células fueron infectadas. Los macrófagos U937 no mostraron cambios morfológicos en su diferenciación después de la infección.

Para corroborar la replicación viral en esta línea celular se realizó el ensayo de formación de placas líticas en células BHK-21, con los sobrenadantes recuperados a las 72 horas post-infección, observándose que estos sobrenadantes llegan a tener una titulación viral de hasta 8×10^6 UFP/ml a este tiempo postinfección (p.i.) (Figura 10 C). Esto indica que las células U937 diferenciadas a macrófagos con PMA, logran inducir una adecuada replicación viral, aunque dicha replicación mostró un título menor al que puede producirse en las células C6/36. Esta diferencia es debida a que aunque los macrófagos son células blanco para la replicación viral del virus de dengue, la línea celular C6/36 es derivada de mosquito y varios estudios han mostrado que es mejor medio para la replicación de cualquiera de los 4 serotipos del virus de dengue (Samuel y Tyagi, 2006).

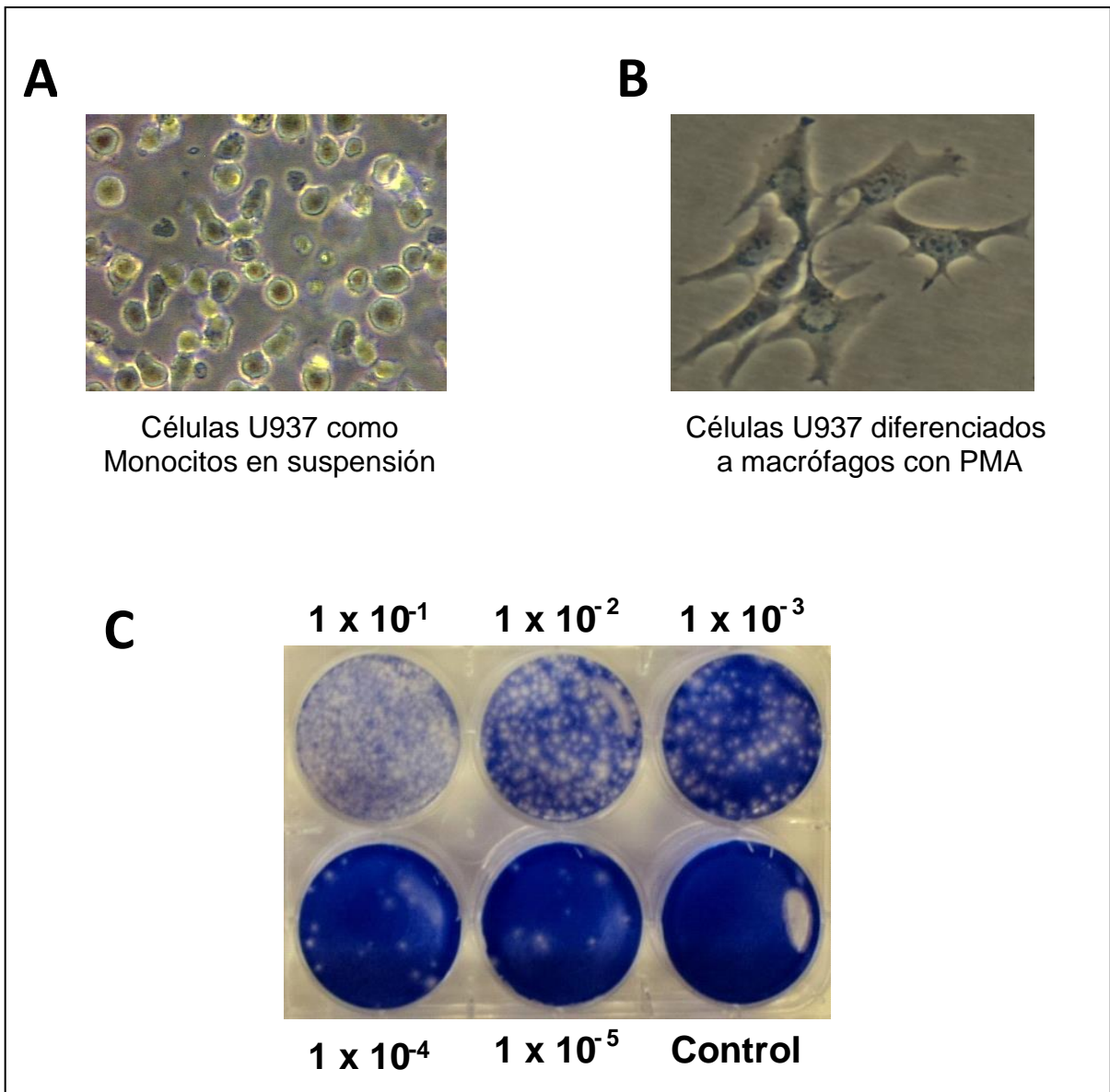


Figura 10. Diferenciación e infección de macrófagos U937. **A.** Microfotografía de los monocitos U937 en suspensión. **B.** Células U937 diferenciadas con PMA durante 24h, se observa adhesión celular al fondo de la placa. **C.** Formación de placas líticas en células BHK-21 infectadas con el sobrenadante de células U937 a 72 h post-infección con el DENV. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

8.2 Efecto del tratamiento con IFN- α sobre el título viral en macrófagos U937 infectados

La figura 11 muestra la cinética de la replicación viral durante la infección con el DENV, mediante el número de unidades formadoras de placas líticas (UFP), empleando el sobrenadante de los macrófagos U937 infectados con el virus de dengue en dos condiciones experimentales: en presencia y en ausencia de pretratamiento con IFN- α (IFN+DENV y DENV) a diferentes tiempos post infección (p.i).

Se observó que los títulos virales en las células sin pre-tratamiento con IFN- α fueron de 11 ± 0.9 , 27 ± 2.1 , 81 ± 7.3 y $62\pm 6.3 \times 10^3$ UFP/ml a las 24, 48, 72 y 96 h (p.i). Se observó que los títulos virales en las células sin pretratamiento con IFN- α fueron de (11 ± 0.9 , 27 ± 2.1 , 81 ± 7.3 y 62 ± 6.3) $\times 10^3$ UFP/ml a las 24, 48, 72 y 96 h p.i., respectivamente. Por su parte, las células que recibieron el pretratamiento con IFN- α antes de la infección, tuvieron títulos de (2 ± 0.1 , 7 ± 1.2 , 27 ± 2 y 11 ± 2) $\times 10^3$ PFU/ml, a los mismos tiempos p.i.

La disminución de la replicación viral debida al pretratamiento con IFN- α (DENV+IFN), pudo observarse a partir de las 24 h p.i. ($p\leq 0.01$) y de las 48 a las 96 h p.i. ($p<0.001$), con respecto a la cinética observada en la infección con DENV sin pretratamiento.

Estos resultados coinciden con otros trabajos en los que se ha reportado que, el pretratamiento con IFN tipo I disminuye la replicación del virus de dengue (Diamond et al., 2000 y Rodríguez-Madoz et al., 2010).

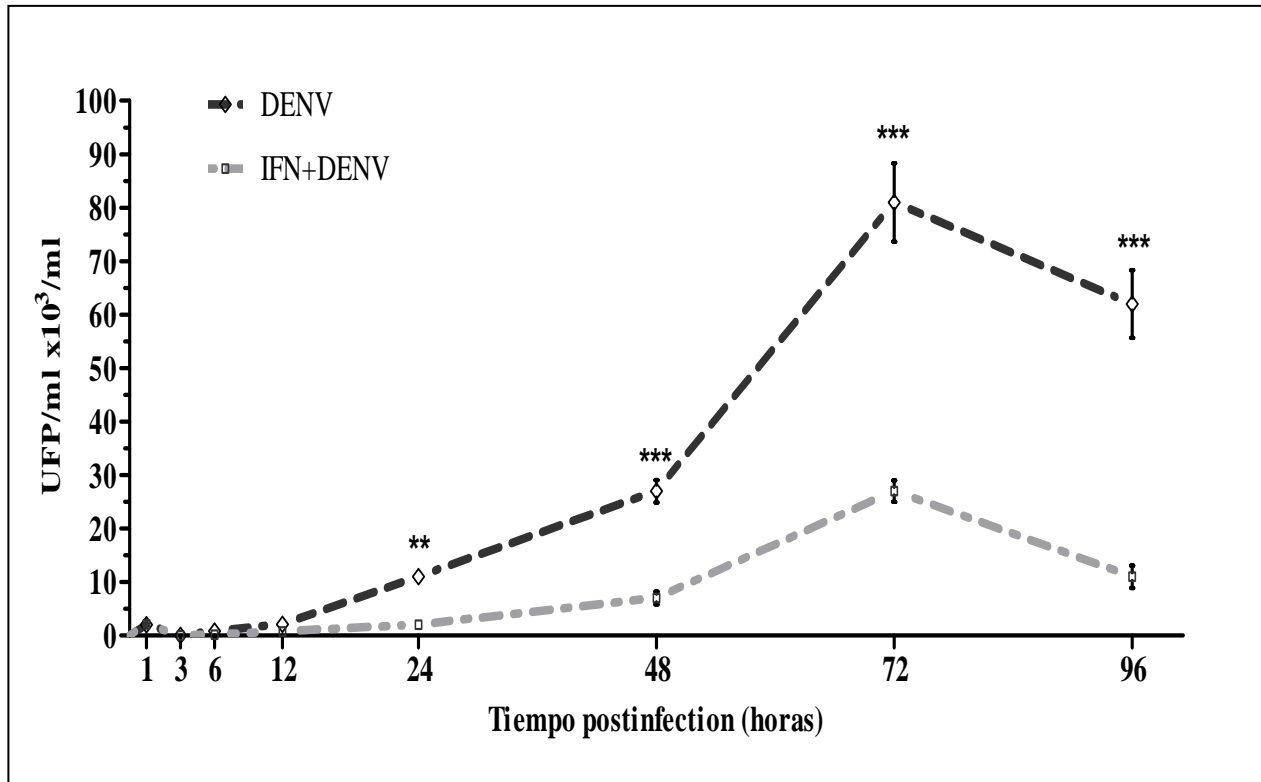


Figura 11. Titulación viral de los sobrenadantes de las células U937 infectada con el DENV. Los títulos virales de los sobrenadante de las células infectadas U937 pretratadas y no tratadas con IFN- α a diferentes tiempos p.i, fueron obtenidos en unidades formadoras de placas a través del método de formación de placas líticas en la línea celular BHK-21. Se observa la disminución significativa después del tratamiento con IFN- α , respecto a la infección sin previo tratamiento a partir de las 24 h p.i. (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) $n=3$

8.3 *Análisis de las proteínas STAT1 y STAT2 de la vía JAK-STAT*

Para evaluar la activación de la vía JAK-STAT durante la infección con el virus de dengue, se analizó la presencia de las proteínas STAT1 y STAT2 en su forma fosforilada y no fosforilada, mediante el procedimiento de western blot. Se utilizaron las condiciones experimentales ya mencionadas para los siguientes grupos: células control, infectadas con el DENV, tratadas con IFN- α e infectadas posterior al pretratamiento con IFN- α . Se realizó la comparación de la presencia de cada proteína a través de la densitometría de los inmunoblots (Anexo 1).

Como se muestra en la figura 12 A, en las células tratadas con IFN- α se induce la expresión de las proteínas STAT1 y STAT2 en su forma total y en su forma fosforilada. Se observa una expresión basal de STAT1, la cual se ve incrementada de los 30 minutos (0.5 h) a las 12 horas, excepto por un eclipsamiento a las 3h en donde no se observa la expresión de esta proteína. Por otro lado, la expresión de la forma fosforilada de STAT1 se observó a los tiempos 0.5 a 3 h y a 18 h, con una mayor expresión a 1.5 h. Asimismo, se observó la presencia de STAT2 de 0.5 a 6 h, la cual fue disminuyendo gradualmente, siendo más abundante al tiempo 0.5 h. Finalmente, la forma fosforilada de STAT2 se observó de 0.5 a 12 h de forma fluctuante, con mayor expresión a los tiempos 0.5, 3 y 12 h.

En la figura 12 B se observa la expresión de las formas fosforilada y no fosforilada de las proteínas STAT1 y STAT2, inducida por la infección con el DENV. La expresión de STAT1 incrementa respecto a su expresión basal a los tiempos 0.5, 1.6 y 6 h p.i., mientras que la forma fosforilada de STAT1 sólo se observó a las 0.5 h y de las 12 a las 24 h p.i., con una mínima expresión a 1.5 a 6 h p.i. Por otra parte, la expresión de STAT2 se observó de 1 a 6 h p.i. y no se observa la expresión de la forma fosforilada de STAT2, salvo a 3 h p.i. en donde se observa una mínima expresión. Es importante resaltar que, con respecto al comportamiento observado por la estimulación con IFN- α , durante la infección con el virus se observó menos proteína STAT1 y, a tiempos tempranos p.i.,

también disminuyó su forma fosforilada. Asimismo, la infección no parece inducir la activación de la forma fosforilada de STAT2.

La figura 12 C hace evidente la presencia de las formas fosforilada y no fosforilada de las proteínas STAT1 y STAT2, inducida por la infección con el DENV en las células pretratadas con IFN- α : La expresión de STAT1 se ve incrementada de 0.5 a 18 h p.i., excepto a las 12 h en donde la expresión es similar a la expresión basal. La forma fosforilada de STAT1 pudo observarse de 0.5 a 24 h p.i. y fue más abundante a 0.5, 1.5, 18 y 24 h p.i. Por su parte, la presencia de STAT2 se observó de 0.5 a 12 h p.i. y la de su forma fosforilada se observó de 0.5 a 24 h p.i. De acuerdo a estos resultados, se puede resaltar que la expresión de las proteínas STAT1 y STAT2 es mayor a la observada durante la infección sin pretratamiento con IFN- α , es decir, existe un restablecimiento en la expresión de estas proteínas, llegando a ser mayor a la expresión observada por el tratamiento con IFN- α , en su forma fosforilada y no fosforilada.

Como se observa en la figura 12 D, el tratamiento con el virus inactivo (DUV) sólo induce un leve incremento de 6 a 18 h p.i. de STAT1 y no se observa la expresión de su forma activa o fosforilada. Tampoco se observó la expresión de la proteína STAT2 o su forma fosforilada, salvo una mínima presencia a 0.5 h p.i. Esto sugiere que la activación de las proteínas STAT es dependiente de la replicación de DENV.

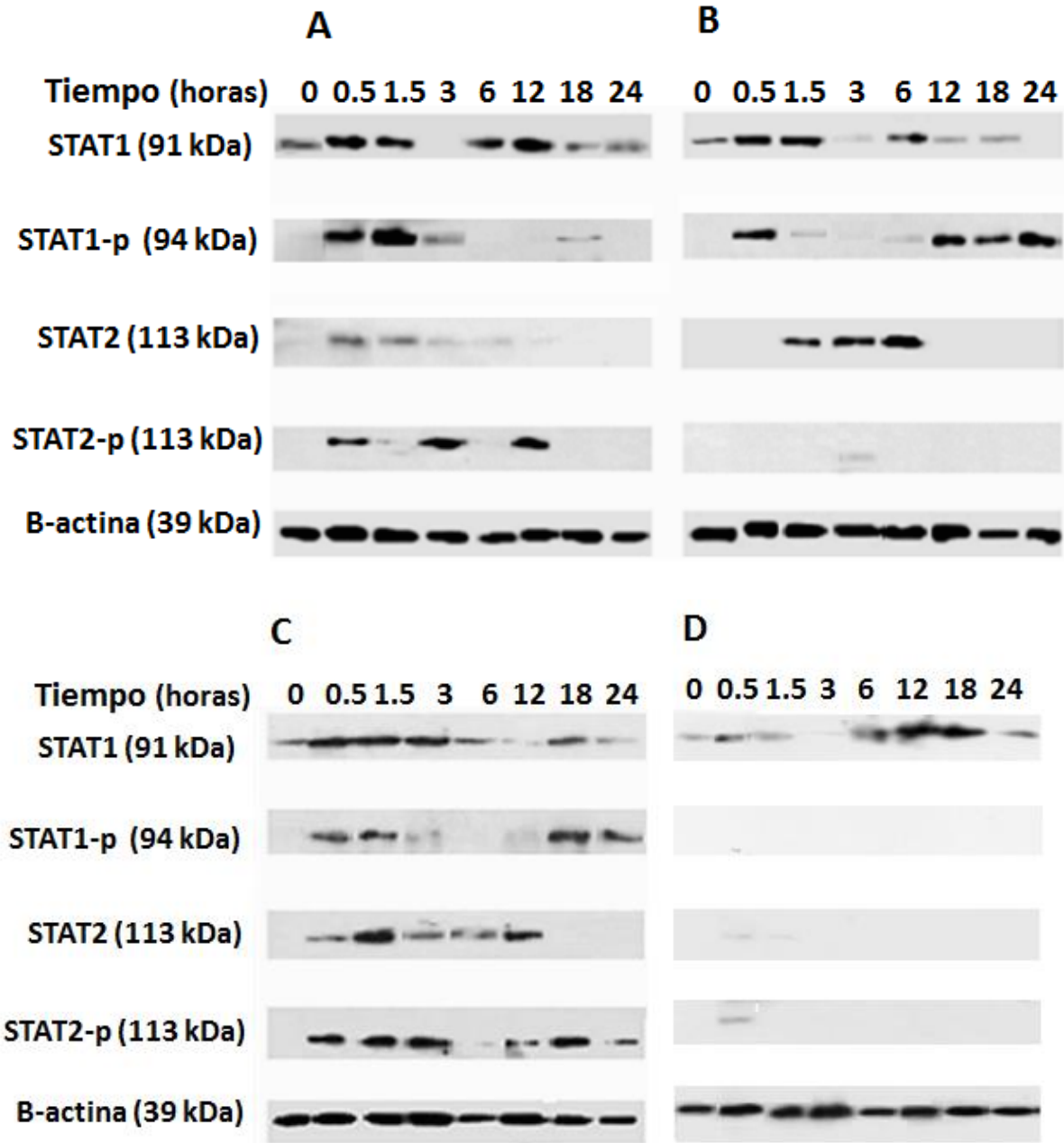


Figura 12. Análisis de la presencia de las proteínas de la vía JAK-STAT. Mediante la técnica de western blot, se realizó la inmunodetección de las proteínas STAT1, STAT1 fosforilada (STAT1p), STAT2, STAT2 fosforilada (STAT2p) y como control β -actina, a diferentes tiempos p.i.: 0.5, 1, 1.5, 3, 6, 12 y 24 horas (h), en diferentes condiciones experimentales: **A.** células estimuladas con IFN- α (IFN), **B.** células infectadas con el virus Dengue 2 (DENV), **C.** células infectadas con Dengue 2 en células pretratadas con IFN- α (IFN+DENV) y **D.** células tratadas con Dengue inactivo (DUV). Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

8.4 Determinación de la localización celular de STAT1-p

Puesto que mediante el análisis por Western Blot se observó que durante la infección con el virus de dengue la proteína STAT1 se encuentra presente en los diferentes tiempos de estudio (0.5 a 24 h p.i.), se decidió analizar su ubicación celular y comprobar si su forma activa fosforilada (STAT1-p) participa en la activación de la vía de señalización JAK-STAT durante la infección con DENV2. Para lo cual se realizó la técnica de inmunofluorescencia a diferentes tiempos p.i. (3, 6, 12 y 24 h) para las células tratadas con IFN- α y las células infectadas con el virus de dengue. Se utilizó un anticuerpo específico para STAT1 fosforilado en Y701, el mismo utilizado para la técnica de Western Blot (tabla 3) y un anticuerpo secundario anti conejo acoplado a FITC (Sigma F0382) para la visualización de fluorescencia por microscopia. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Cuando se realizó el estímulo celular con IFN- α se observó la presencia de la proteína con localización predominantemente citoplasmática a las 3 y 6 h p.i. mientras que a las 12 y 24 h p.i. la localización fue mayor en el núcleo. Durante la infección con DENV2 la localización de STAT1-p fue citoplasmática a todos los tiempos de estudio, de las 3 a las 24 h p.i. únicamente logró observarse la relocalización de la proteína a las 6 h p.i. en donde la proteína tuvo menor presencia y con tendencia a localizarse en un solo polo de la célula, (Figura 13).

Estos resultados sugieren la acumulación de STAT1-p y la disminución de su entrada al núcleo durante la infección con DENV lo cual ocasionaría la inhibición de la formación del complejo ISGF3 y la activación de genes de respuesta a interferón ISGF, GAS. (Ashour et al., 2009, Kumar et al., 2013, Khan et al., 2004).

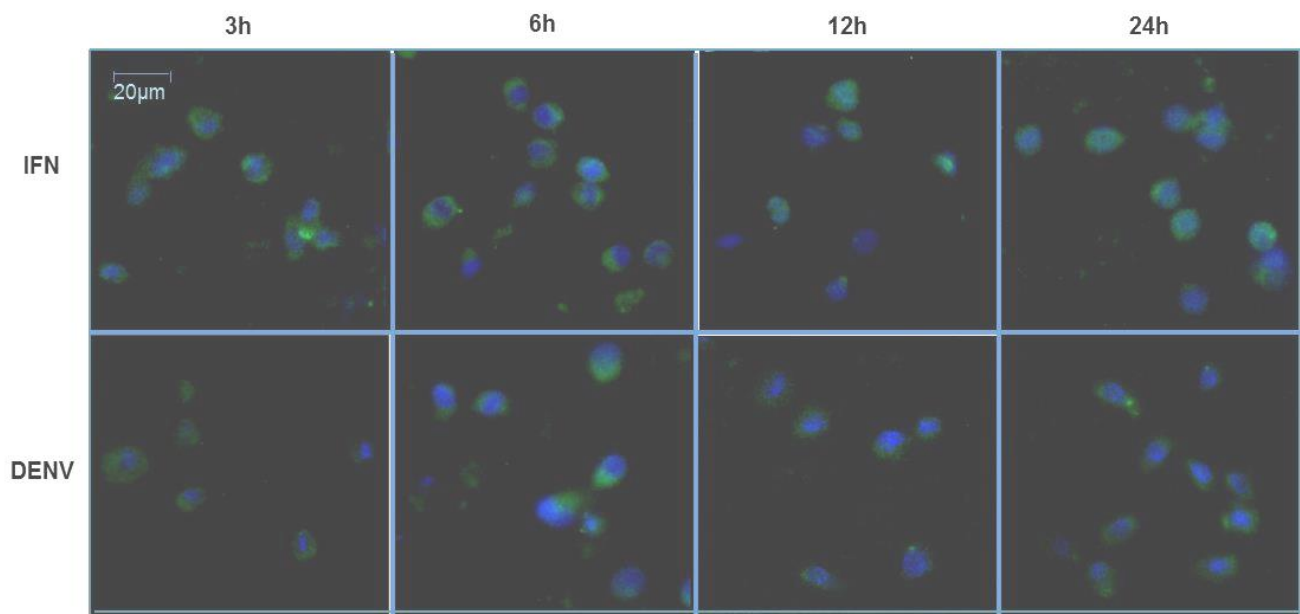


Figura 13. Análisis de la localización celular de la proteína STAT1-p. La detección de la proteína STAT1-p se realizó mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo secundario acoplado a FITC (Verde) y DAPI (Azul) para la tinción nuclear. en macrófagos U937 estimulados con IFN- α (*arriba*) e infectados con DENV2 (*abajo*) a 3, 6, 12 y 24 h p.i (de izquierda a derecha).

8.5 Determinación del mensajero de genes con actividad antiviral activados por la vía JAK-STAT

Como parte del análisis de la activación de la vía *JAK-STAT* ante la infección con el virus de dengue y el estímulo con IFN- α , se realizó la determinación del ARNm de PKR y MxA (dos genes que codifican proteínas de respuesta antiviral) mediante RT-PCR punto final a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas postinfección.

La figura 14 A muestra el corrimiento electroforético de los productos de PCR de los genes PKR (arriba), MxA (centro) y el gen constitutivo, Ciclofilina (abajo), para las diferentes condiciones experimentales. La figura 14 B muestra las gráficas de la cuantificación relativa por densitometría de los niveles del ARNm de los genes problema comparados con el control de expresión endógena.

Para el gen PKR, se observó su expresión en todas las condiciones experimentales incluyendo las células control. Mediante el análisis densitométrico, se observaron incrementos en la transcripción de PKR en torno a 2 y 2.5 veces en las células estimuladas con IFN- α , en las células infectadas y en las células estimuladas con IFN- α e infectadas con respecto a las células control.

Por otro lado, la expresión de MxA no se observa en las células control; mediante el análisis densitométrico, se observó el incremento de su ARNm cuando las células fueron infectadas con el virus de dengue con y sin previo tratamiento con IFN- α y en menor proporción en las células estimulas con IFN- α a las 24 y 48 h.

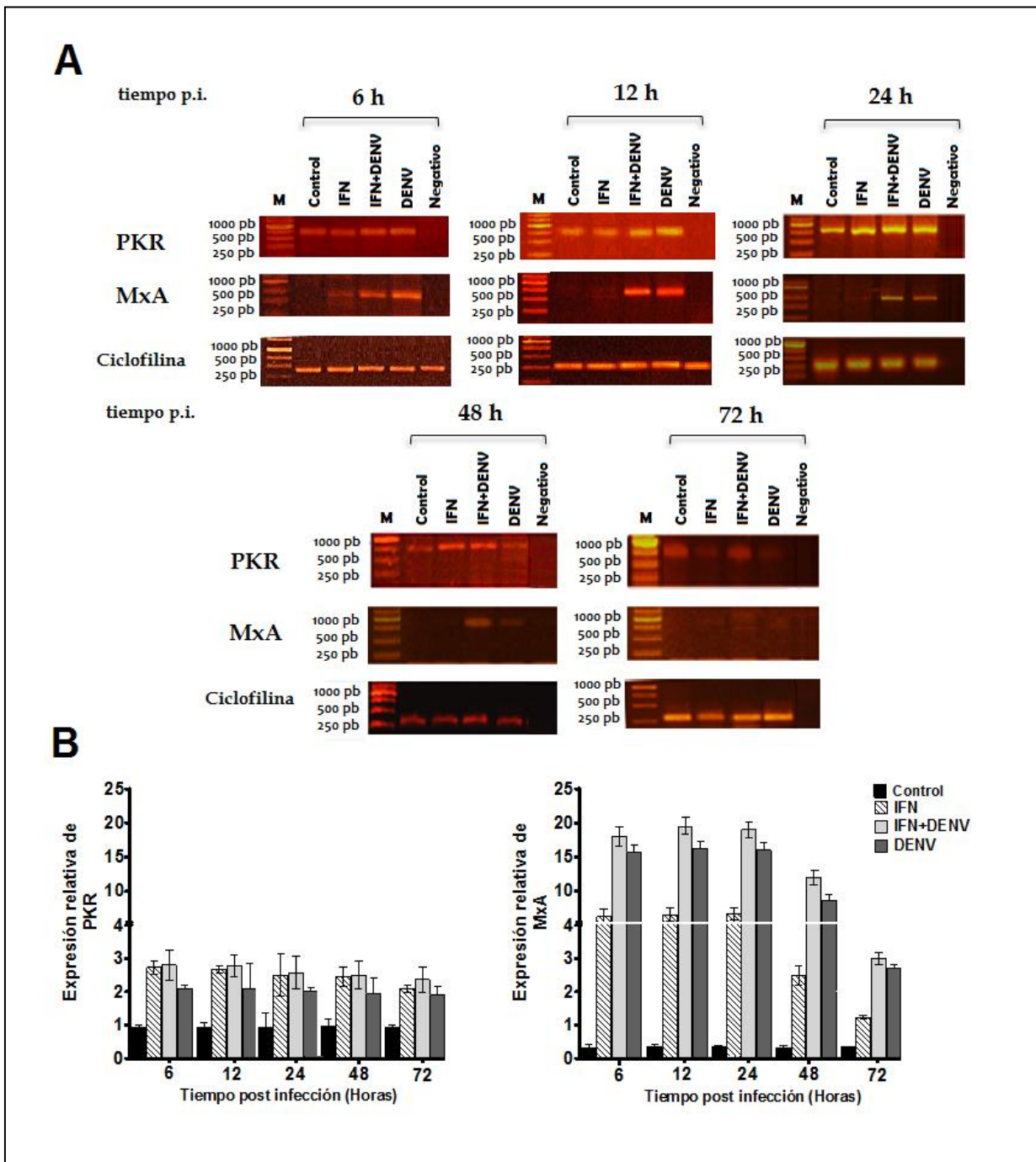


Figura 14. Análisis de los niveles de transcripción de PKR y OAS. A. Corrimiento en gel de agarosa de los productos de RT-PCR de PKR (arriba), MxA (centro) y el gen endógeno, ciclofilina (abajo) a diferentes tiempos post estímulo: 6, 12, 24, 48 y 72 horas, de izquierda a derecha. Los carriles corresponden a las células control, IFN, IFN+DENV y DENV, M= Marcador de peso molecular y control negativo (Negativo) **B.** Cuantificación relativa por densitometría de los niveles de ARNm de PKR (izquierda) y MxA (derecha), n=3.

De acuerdo a estos resultados, no se observaron cambios significativos en la transcripción de PKR en esta línea celular y la inducción de MxA es dada por la infección con DENV, por lo tanto, se realizó el análisis por qRT-PCR (PCR en tiempo real con SYBR Green) del nivel de transcripción de la proteína MxA y también de la proteína OAS, otra proteína antiviral que puede ser activada a través de la vía JAK-STAT.

Las condiciones del PCR en tiempo real fueron optimizadas, variando el tipo de iniciador y la concentración de los iniciadores y de los reactivos de RT-PCR, hasta obtener la máxima eficacia en todos los casos (cerca del 100%). Posteriormente, se encontró el valor dinámico de la concentración de ARN total a utilizar para el análisis de la cuantificación relativa. Fue de 20 a 320 ng de ARN total para los dos genes, se obtuvo una pendiente de 0.02 para MxA y de 0.03 para OAS. (Figura 15 A y B)

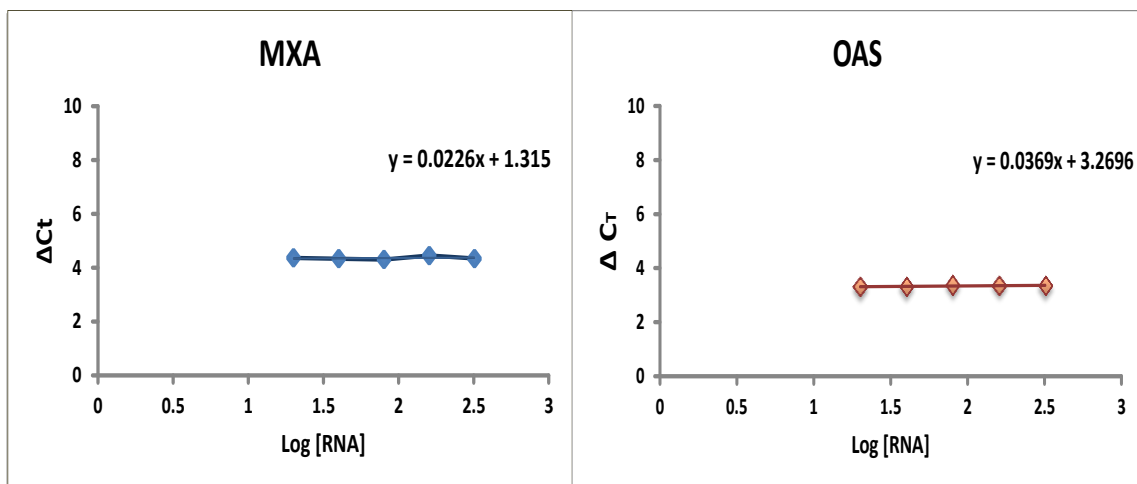


Figura 15. Validación de RT-PCR en tiempo real para MxA y OAS. Curvas de validación con el RNA extraído de los macrófagos U937. La diferencia de Ct entre cada gen y el gen endógeno constitutivo (HPRT) fue calculado y graficado respecto al logaritmo de la concentración del RNA total, el valor de la pendiente, en el eje y, con lo que se obtuvo la eficiencia relativa, para la cuantificación de la transcripción de MxA y OAS, usando como gen endógeno HPRT (n=3).

Se observó que el estímulo con IFN- α induce la transcripción de MxA a partir de 3 h, con incrementos de: 4 ± 0.3 , 37.8 ± 2.4 , 44.3 ± 3.7 , 89.1 ± 8.6 y 37.9 ± 2.5 veces a las 3, 6, 12, 24 y 48 h p.i., respectivamente. Por otra parte, la infección indujo incrementos de 10.3 ± 0.9 , 15.6 ± 1.3 , 45.6 ± 3.6 , 10.8 ± 1 a 6, 12, 24 y 48 h, respectivamente. Asimismo, la infección posterior al pretratamiento con IFN- α mostró valores de incrementos de 66 ± 3.8 , 20 ± 1.8 , 17 ± 1 y 9 ± 0.2 , respectivamente, a los mismos tiempos p.i. Todos los valores fueron con respecto al grupo control (Figura 16 A).

Para OAS se observaron incrementos con el tratamiento de IFN- α , respecto a las células control, en número de veces de 14 ± 1.2 , 53.2 ± 3.8 , 34 ± 2.8 , 89 ± 6.5 y 14 ± 1 a 3, 6, 12, 24 y 48 h, respectivamente; la infección con DENV indujo su transcripción en 1.3 ± 0.04 , 5.2 ± 0.4 , 48 ± 3.23 , 4.5 ± 0.2 , 2.7 ± 0.3 veces, a los mismos tiempos. Finalmente, cuando la infección se realizó posterior al pretratamiento con IFN- α , se observaron valores de incremento en número de veces de 17.5 ± 1.7 , 7 ± 0.4 , 11.5 ± 0.9 , 1.2 ± 0.2 a las 6, 12, 24 y 48 h, respectivamente (Figura 16 B).

Cuando se realizó el tratamiento con el virus inactivo no se observó incremento del transcrito de MxA y OAS (Figura 16 A y B). Estos resultados sugieren que se requiere del proceso de replicación viral para inducir la transcripción de MxA y OAS.

Los resultados observados en el análisis de las proteínas de la vía JAK-STAT (STAT1 y STAT2), así como la expresión del ARNm de MxA y OAS, sugieren que la infección con el virus de dengue afecta la expresión de genes de respuesta antiviral mediante la disminución de las señales mediadas por la vía JAK-STAT. Esto al comparar contra los valores encontrados en las células tratadas con IFN. Por otra parte, la infección después del pretratamiento con IFN- α parece tener mejor activación de la vía, con mayor inducción de la transcripción de los genes MxA y OAS, respecto a la infección, a 6 y 12 h p.i., respectivamente, no obstante, respecto a las células tratadas con IFN- α , sólo se observó un mayor incremento para el ARNm de MxA, en el tratamiento IFN+DENV a las 6h p.i. (Figura 15).

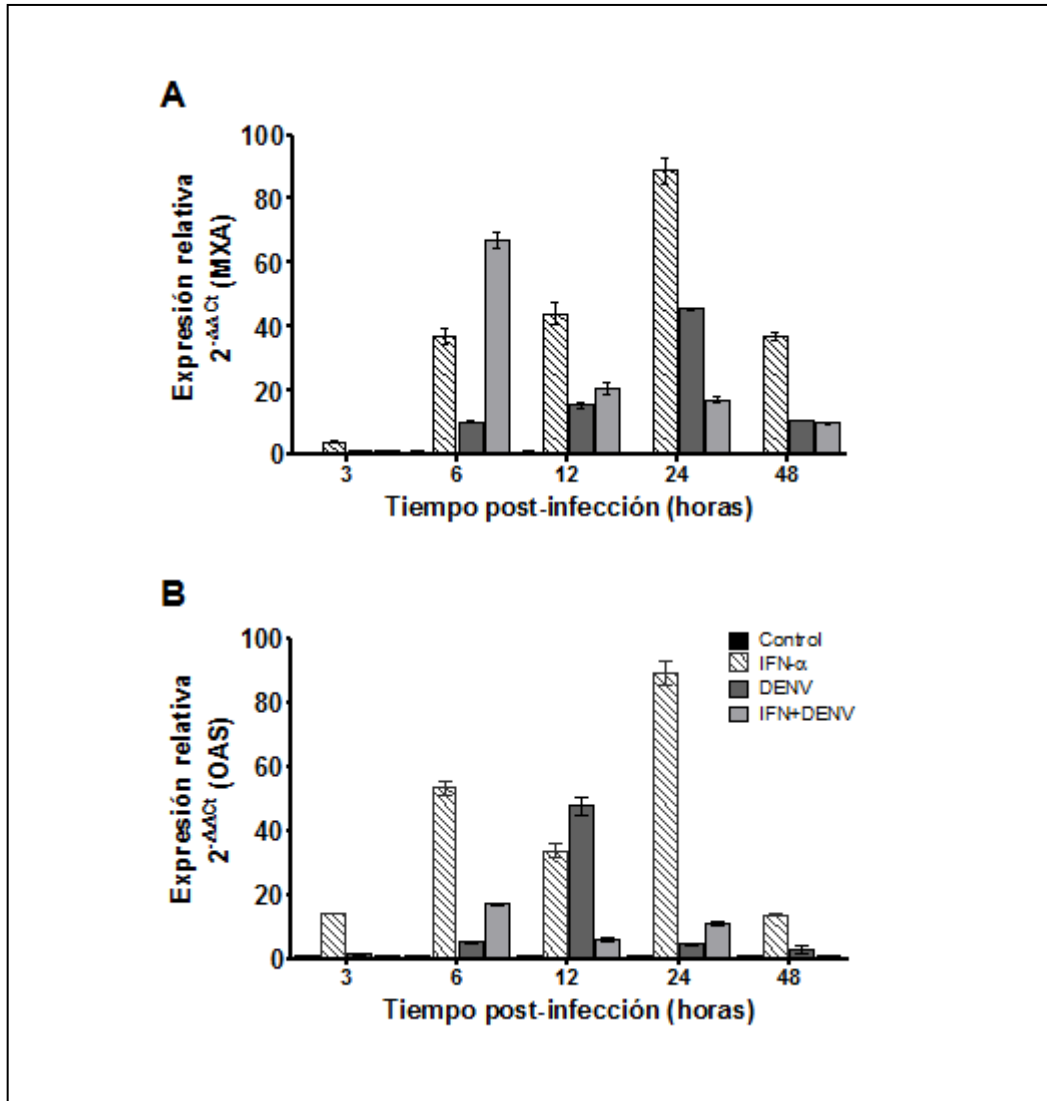


Figura 16. Análisis de la inducción de la transcripción de *MxA* y *OAS*. Se analizó el incremento en número de veces del nivel de transcripción de *MxA* y *OAS* (A y B), a través de RT-PCR en tiempo real, mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, en los 5 grupos experimentales: Células sin tratamiento (CONTROL); células tratadas con IFN- α (IFN), células infectadas después del pretratamiento con IFN- α (IFN+DENV); células infectadas con el virus activo (DENV) y con el virus inactivo (DUV) con respecto a las células control a las 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h post-infección, $n=3$.

8.6 Determinación de las proteínas PIAS-1, SOCS-1 y SOCS-3

8.6.1 RT-PCR Semicuantitativo

Para determinar los cambios en la expresión de genes que codifican los supresores de las señales de citocinas (SOCS-1, SOCS-3, PIAS-1), inducidos por la infección con el virus de dengue se realizó RT-PCR de punto final en las células sin infectar (Control) e infectadas (DENV), y los productos de la PCR se analizaron en gel de agarosa al 1.5%, determinándose la expresión de forma semicuantitativa de cada gen (PIAS-1, SOCS-1 y SOCS-3) respecto la expresión del gen constitutivo (RNAsa P) a 24, 48 y 72 h postinfección.

En la figura 17 se muestran, en la primera columna, los corrimientos en gel de agarosa de los productos de PCR para SOCS-1, SOCS-3 y PIAS-1. En la segunda columna se observó la determinación semicuantitativa de la transcripción de estos genes por análisis densitométrico, a través del cual se observó la expresión de los ARNm en las células diferenciadas a los tres tiempos de estudio; sin embargo, se observó incremento en la transcripción de PIAS-1 y SOCS-1 y en menor grado para SOCS-3, en las células infectadas por el virus de dengue con respecto a las células control, esto sugiere que la infección induce la expresión de estos genes de regulación negativa y que esta inducción pudiera estar relacionada al tiempo de infección.

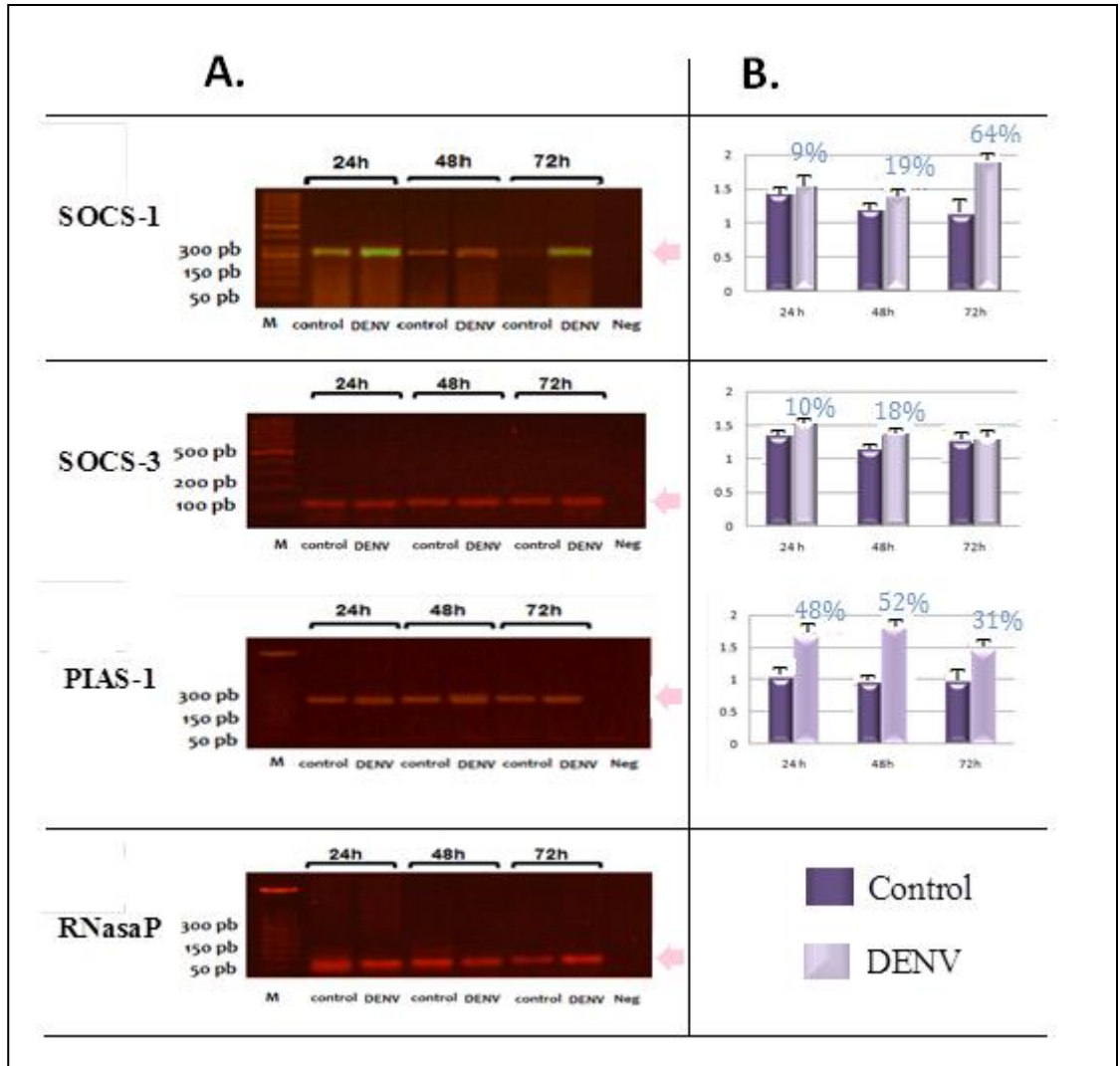


Figura 17. Análisis de la expresión de genes supresores de la vía JAK/STAT: SOCS-1, SOCS-3 y PIAS-1. Mediante la técnica de RT-PCR se analizó la expresión del RNAm de las células infectadas (DENV) con respecto a las células sin tratamiento (Control). **A.** Corrimiento en gel de agarosa, de los productos de la RT-PCR, carriles: (M) Marcador de peso molecular; (Neg) Control negativo; (Control) Células sin tratamiento, y (DENV) Células infectadas (Representativo de un experimento). **B.** Determinación semicuantitativa por densitometría del corrimiento en gel de los productos de PCR de los genes de SOCS-1, SOCS-3 y PIAS-1 Todos a 24, 48 y 72 h post-infección, normalizado con respecto al gen constitutivo RNAsa P (n=3).

8.6.2 RT-PCR en Tiempo Real

Para determinar de una manera más exacta la diferencia entre la cantidad de mensajero del gen problema respecto de cada condición experimental, se procedió a realizar el análisis de cuantificación a través de PCR en tiempo real, a través de esta técnica se llevó a cabo la cuantificación relativa de los niveles de los ARNm de PIAS-1, SOCS-1, SOCS-3, en las 5 condiciones experimentales establecidas: 1. Control, sin tratamiento; 2. IFN, tratamiento con IFN- α ; 3. DENV, células infectadas; 4. IFN+DENV, células infectadas después de un pretratamiento con IFN- α , y 5. DUV, células tratadas con el virus inactivado mediante la exposición a luz ultravioleta.

En primer lugar, se establecieron las condiciones para el procedimiento de la PCR en tiempo real, como son: concentración de los iniciadores y del ARN, eficiencia de amplificación (cercana a 100%) y, en segundo lugar, se realizó la cuantificación mediante el método matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, como se explicó previamente en la sección de Material y Métodos. Posteriormente se corroboró la especificidad de los iniciadores mediante una curva de disociación a diferentes T_m , la cual mostró que los iniciadores para cada uno de los diferentes genes (PIAS-1, SOCS-1 y SOCS-3) y el gen endógeno RNAsa P, producen un solo amplicón. (Figura 18, arriba)

A continuación se determinó el intervalo de concentraciones de ARN total a utilizar para los tres genes. Esto se obtuvo mediante un análisis de eficiencia de amplificación para cada gen, como se explicó en la sección de Material y Métodos, donde se encontró que el intervalo dinámico de la concentración de ARN total fue de 50 a 400 ng para cada uno de los genes (Figura 18, abajo). A partir de estos resultados, se decidió utilizar para los ensayos de cuantificación relativa, una concentración de 100 ng para SOCS-1, PIAS-1 y SOCS-3.

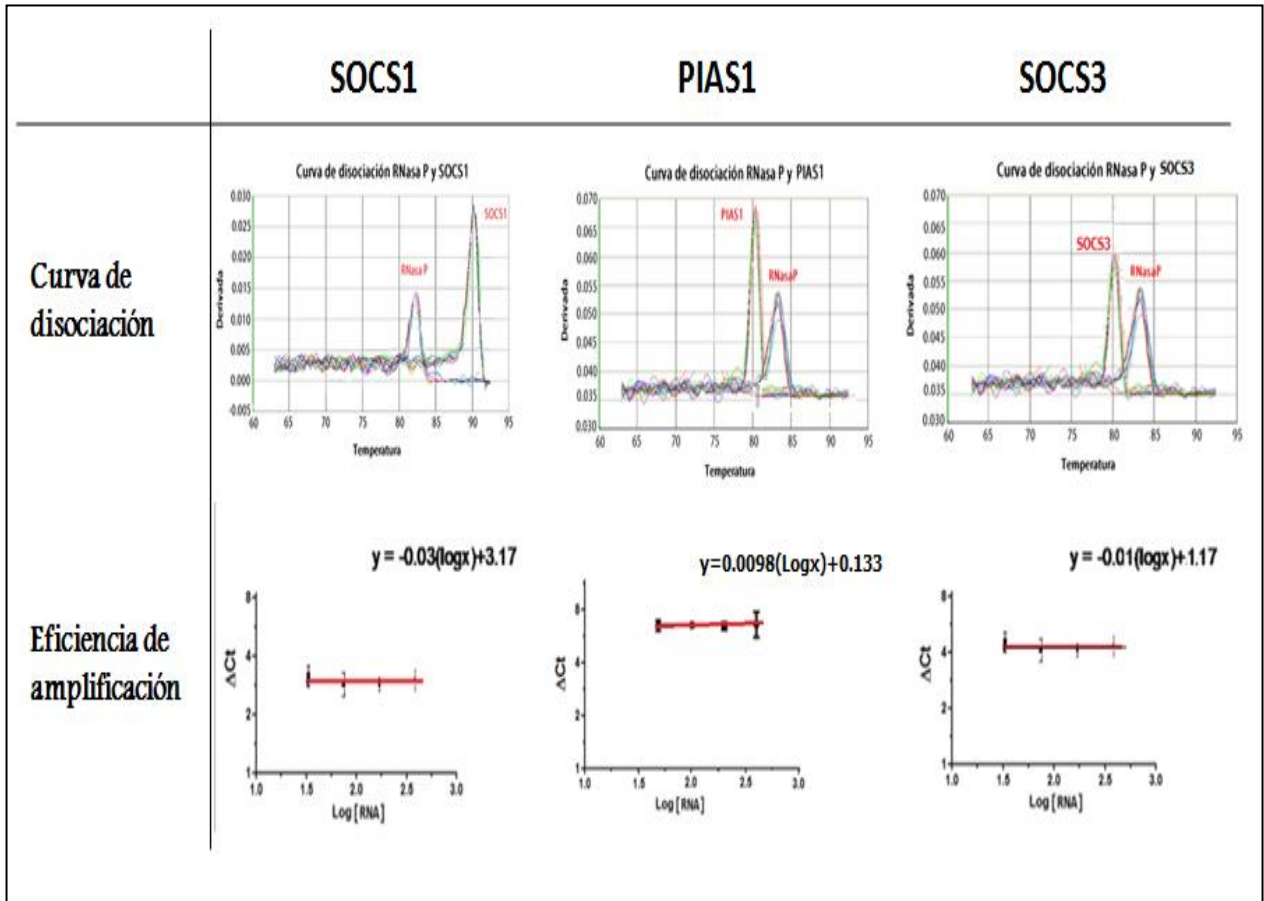


Figura 18. Validación de la RT-PCR en tiempo real para SOCS-1, SOCS-3 y PIAS-1 con RNasa P.

Arriba, Curva de disociación; los picos corresponden de derecha a izquierda a: RNasa P y SOCS-1; PIAS-1, y RNasa P, y SOCS-3 y RNasa P. *Abajo*, curvas de validación con el RNA extraído de los macrófagos U937, la diferencia de Ct entre cada gen y el gen endógeno constitutivo (RNasa P) fue calculada y graficada respecto al logaritmo de la concentración del RNA total, el valor de la pendiente (eje y) indica el rango dinámico al cual la RNasaP puede usarse como gen endógeno, para la cuantificación de la transcripción de los genes SOCS-1, SOCS-3 y PIAS-1 (n=3).

Posteriormente, se realizó la cuantificación relativa de los niveles de transcripción de SOCS-1, SOCS-3 y PIAS-1 mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ a diferentes tiempos post infección (1.5, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h), para los 5 grupos experimentales (1. Control, 2. IFN, 3. DENV, 4. IFN+DENV y 5. DUV), y se analizó el incremento en el ARNm con respecto a sus niveles de transcripción en las células control, que toma el valor de 1.

En las células estimuladas sólo con IFN- α se observaron incrementos, desde los 90 minutos y hasta las 12 h post-infección, en 109 ± 17 , 345 ± 38 , 948 ± 94 y 11 ± 1 veces, respectivamente, con respecto a las células control. Es necesario hacer notar que el nivel de expresión fue en aumento hasta las 6 h, donde empezó a decaer para desaparecer a las 24 h. Por otra parte, en el grupo de células infectadas (DENV), se observó un incremento en la expresión de SOCS-1 desde la 3 h y hasta 48 h p.i. (436 ± 18 , 1282 ± 117 , 430 ± 38 , 124 ± 9 y 14.8 ± 1 veces con respecto a las células control). Conviene hacer notar que la expresión de SOCS-1 inicia después, respecto a la expresión inducida por la estimulación con IFN- α , pero se mantiene durante más tiempo; empero, el tiempo de 6 h p.i. fue el período de máxima expresión de SOCS-1, inducido por la infección viral. Por otra parte, en las células IFN+DENV se observó incremento en la expresión de SOCS-1 desde las 3 h y hasta las 24 h p.i. (97 ± 3 , 356 ± 14 , 25 ± 0.7 y 9 ± 0.2 veces con respecto a las células control), cabe resaltar que, aunque estos incrementos muestran un comportamiento similar a la infección, sus valores de incremento son menores a los inducidos por el IFN- α (excepto a 12h p.i.) y por el virus sin tratamiento previo. Finalmente, las células incubadas con virus inactivado no mostraron incremento en la expresión de SOCS-1 con respecto a las células control. (Figura 19).

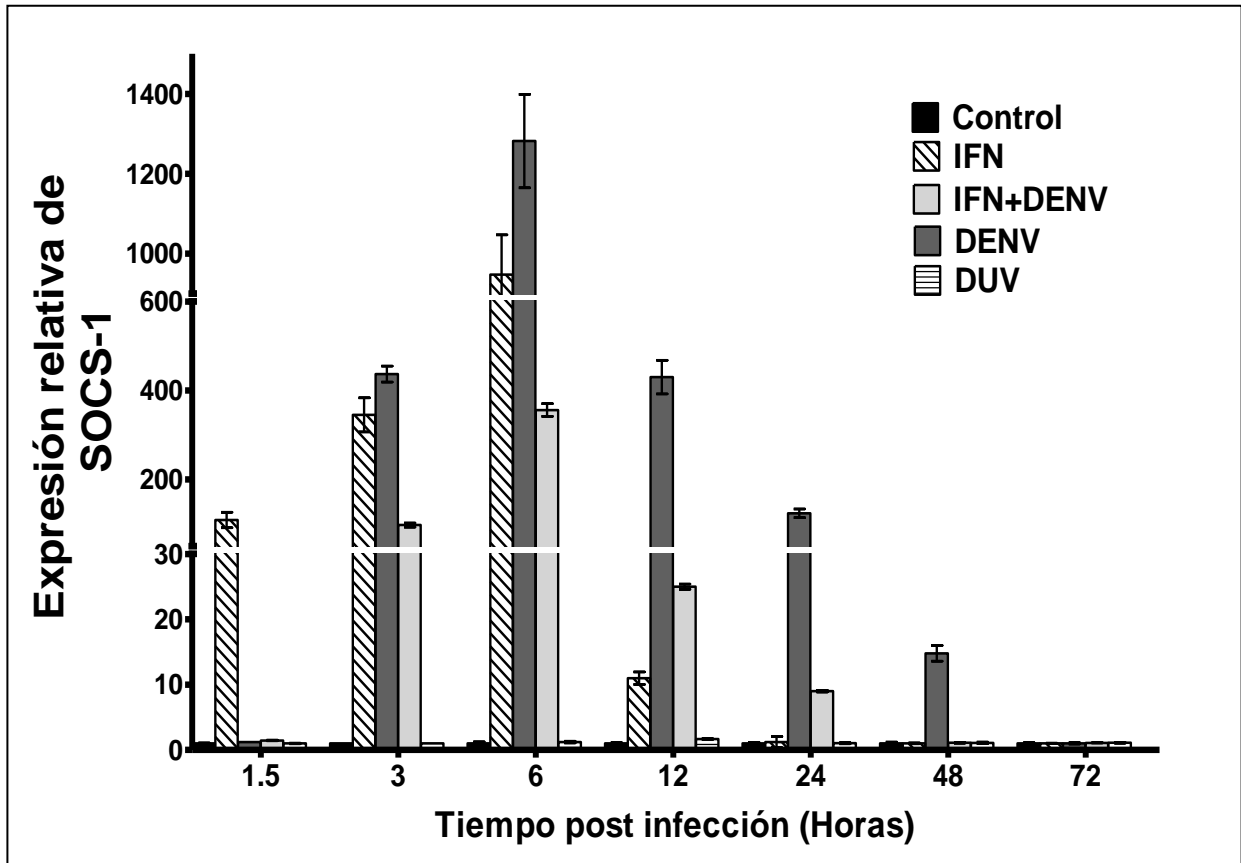


Figura 19. Análisis de la inducción de la transcripción de SOCS-1. Por medio de RT-PCR en tiempo real y a través del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, se obtuvo el incremento, en número de veces, de SOCS-1 a 6, 12, 24, 48 y 72 h post-infección, en los 5 grupos experimentales: células tratadas con IFN- α (IFN); células infectadas después del pretratamiento con IFN- α (IFN+DENV), y células infectadas con el virus activo (DENV) y con el virus inactivo (DUV), cada uno respecto a las células sin tratamiento (CONTROL), a las que se les dio el valor de 1 (n=3.)

El uso del virus inactivo no modifica la expresión de SOCS-3, lo que sugiere que, al igual que para SOCS-1, la inducción de esta proteína depende de la actividad replicativa del virus de dengue tipo 2.

En las células estimuladas sólo con IFN- α se observó incremento en la expresión de SOCS-3, desde las 3 y hasta las 24 h p.i. (4.6 ± 0.2 , 17 ± 0.2 , 32 ± 1 y 8 ± 0.8 veces con respecto al control), dicho incremento fue en aumento de las 3 a las 12 h, donde empezó a decaer para desaparecer a las 48 h.

Por su parte, la infección viral indujo la expresión de SOCS-3 desde las 6 y hasta las 48 h p.i. (7.6 ± 1 , 16 ± 1 , 42 ± 2 y 11.6 ± 1 veces con respecto a las células control). Cabe hacer notar que la expresión máxima del ARNm de SOCS-3 durante la infección fue mayor, aunque se observó a un tiempo posterior de la inducida por el tratamiento con IFN- α ; además, dicha expresión de forma similar a la estimulación con IFN- α , fue incrementando de las 6 a las 24 h, después decayó para desaparecer a las 72 h.

Finalmente, las células infectadas, posterior al pretratamiento con IFN- α , muestran incrementos desde las 12 y hasta las 48 h p.i. (2 ± 0.8 , 56 ± 3 , 9 ± 0.2 y 4 ± 0.2 veces con respecto al control). Es importante resaltar que el tiempo de máxima expresión, al igual que cuando se estimula únicamente con IFN- α , fue a las 12 h y este incremento es significativamente mayor a todos los incrementos observados por los otros tratamientos presentándose en forma abrupta con una disminución drástica a las 24 horas, desapareciendo a las 72 h p.i. (Figura 20).

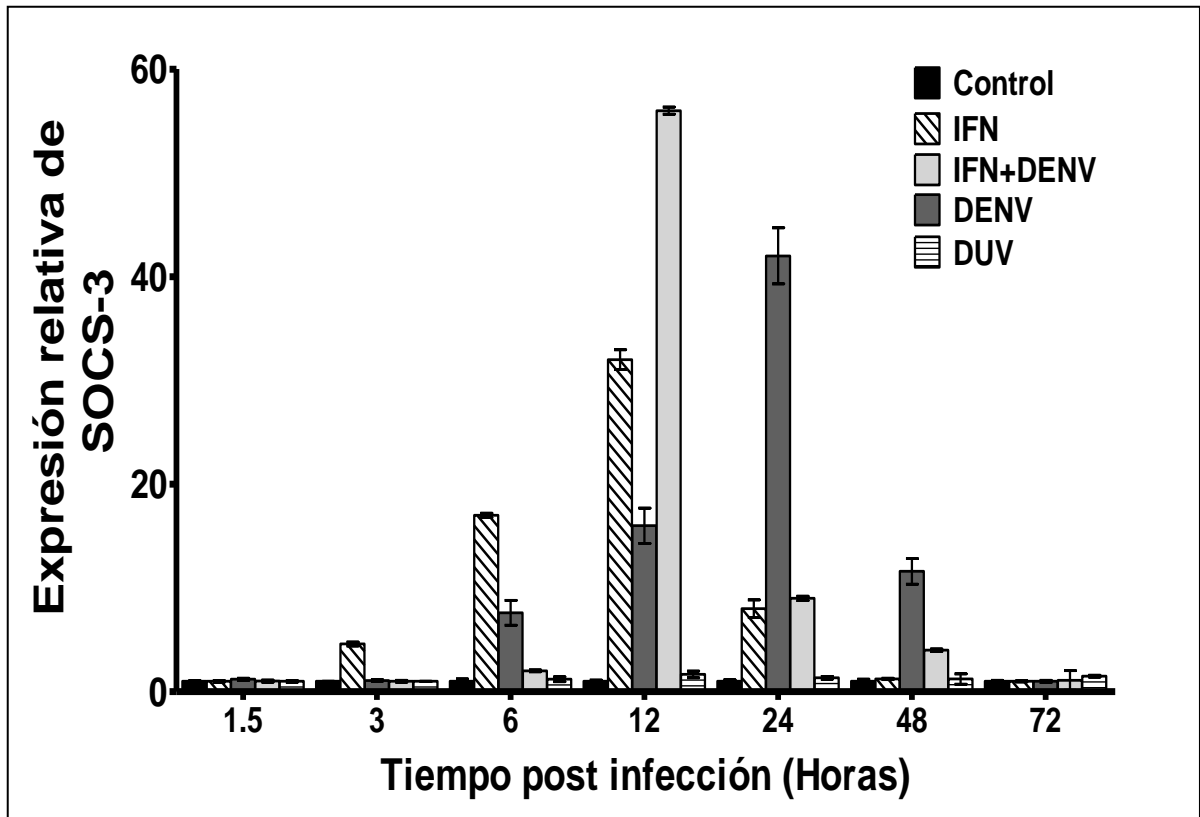


Figura 20. Análisis de la inducción de la transcripción de SOCS-3. Por medio de RT-PCR en tiempo real y a través del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, se obtuvo el incremento, en número de veces, de SOCS-3, a 6, 12, 24, 48 y 72 h post-infección, en los 5 grupos experimentales: células tratadas con IFN- α (IFN); células infectadas después del pretratamiento con IFN- α (IFN+DENV), y células infectadas con el virus activo (DENV) y con el virus inactivo (DUV), cada uno respecto a las células sin tratamiento (CONTROL), a las que se les dio el valor de 1 (n=3.)

Por otra parte, la expresión de los niveles de ARNm de PIAS-1, con respecto al grupo control, no fue alterada por ninguno de los tratamientos, (con IFN- α , la infección con el DENV y la infección posterior al pretratamiento con IFN- α) durante las primeras 12 h p.i. Sin embargo, en los tiempos experimentales 24 y 48 h p.i. se observó que el tratamiento con IFN- α indujo un incremento (4 ± 0.6 y 4.2 ± 0.3 veces con respecto al control), la infección viral indujo un incremento (12 ± 1 y 4.6 ± 0.2 veces con respecto al control) y las células infectadas posterior al pretratamiento con IFN- α también mostraron un incremento en la expresión (4.6 ± 0.5 y 4.2 ± 0.4 veces con respecto al control). Es importante resaltar que, a las 24 h p.i., la infección con el DENV indujo un mayor incremento que los otros tratamientos, mientras que cuando la infección se produjo posterior al pretratamiento con IFN- α los niveles del ARNm de PIAS-1 mostraron un comportamiento idéntico, al que se observó en el grupo IFN, tanto a las 24 como a las 48 h p.i. (Figura 21).

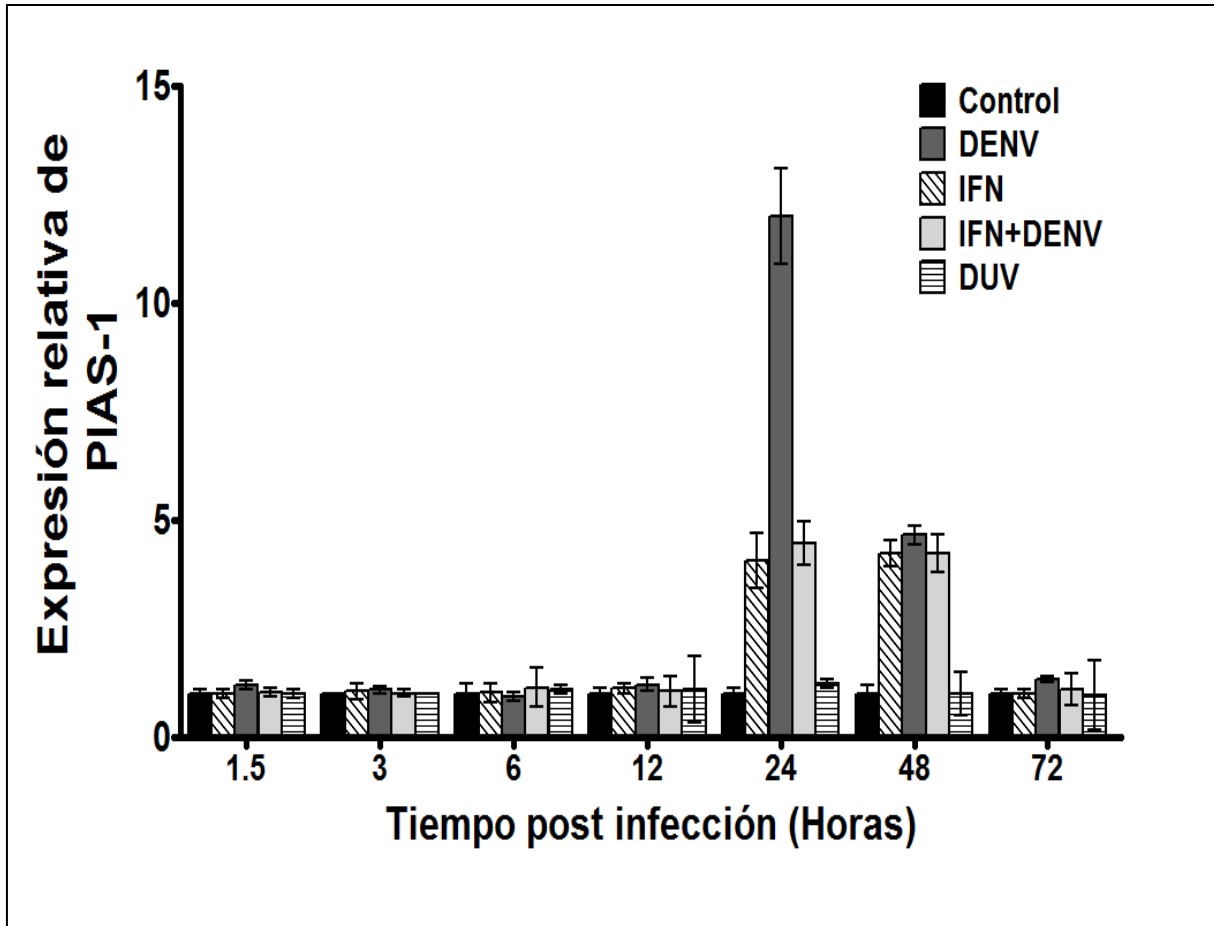


Figura 21. Análisis de la inducción de la transcripción de PIAS 1. Por medio de RT-PCR en tiempo real y a través del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, se obtuvo el incremento, en número de veces, de PIAS-1 a 6, 12, 24, 48 y 72 h post-infección, en los 5 grupos experimentales: células tratadas con IFN- α (IFN); células infectadas después del pretratamiento con IFN- α (IFN+DENV), y células infectadas con el virus activo (DENV) y con el virus inactivo (DUV), cada uno respecto a las células sin tratamiento (CONTROL), a las que se les dio el valor de 1 (n=3.)

8.7 Determinación de la presencia de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3

Por medio del procedimiento de Western blot se evaluó la presencia de las proteínas SOCS-1 y SOCS3, a los mismos tiempos que se realizó el análisis de la expresión de su ARNm, buscando corroborar si los niveles de la proteína coinciden con los niveles del transcrito o si existía alguna desregulación ocasionada por la replicación viral (Figura 22 A y 23 A). Para la comparación relativa, se empleó el procedimiento de densitometría de las bandas reveladas por quimioluminiscencia (previamente descrito en Material y Métodos), cuya densidad fue normalizada con la banda de β -actina a cada tiempo analizado. (Figura 22 B y 23 B)

Se observó la expresión de SOCS-1 posterior al tratamiento con IFN- α de las 3 a las 36 h p.i., con mayor expresión a las 3, 6 y 24 h p.i. Asimismo, cuando la infección se realizó posterior al pretratamiento con IFN- α , la presencia de SOCS-1 no incrementó con respecto al control antes de 24 horas, disminuyendo hasta no expresarse a las 48 h p.i. Por su parte la infección viral evidenció un incremento de proteína desde las 6 h, que se mantuvo durante todo el resto de la cinética, alcanzando su máximo a las 6 y 24 h p.i. (Figura 22 A y B).

Se debe resaltar que la presencia de la proteína SOCS1 coincide en los tiempos en los cuales se observaron los incrementos del transcrito para la misma.

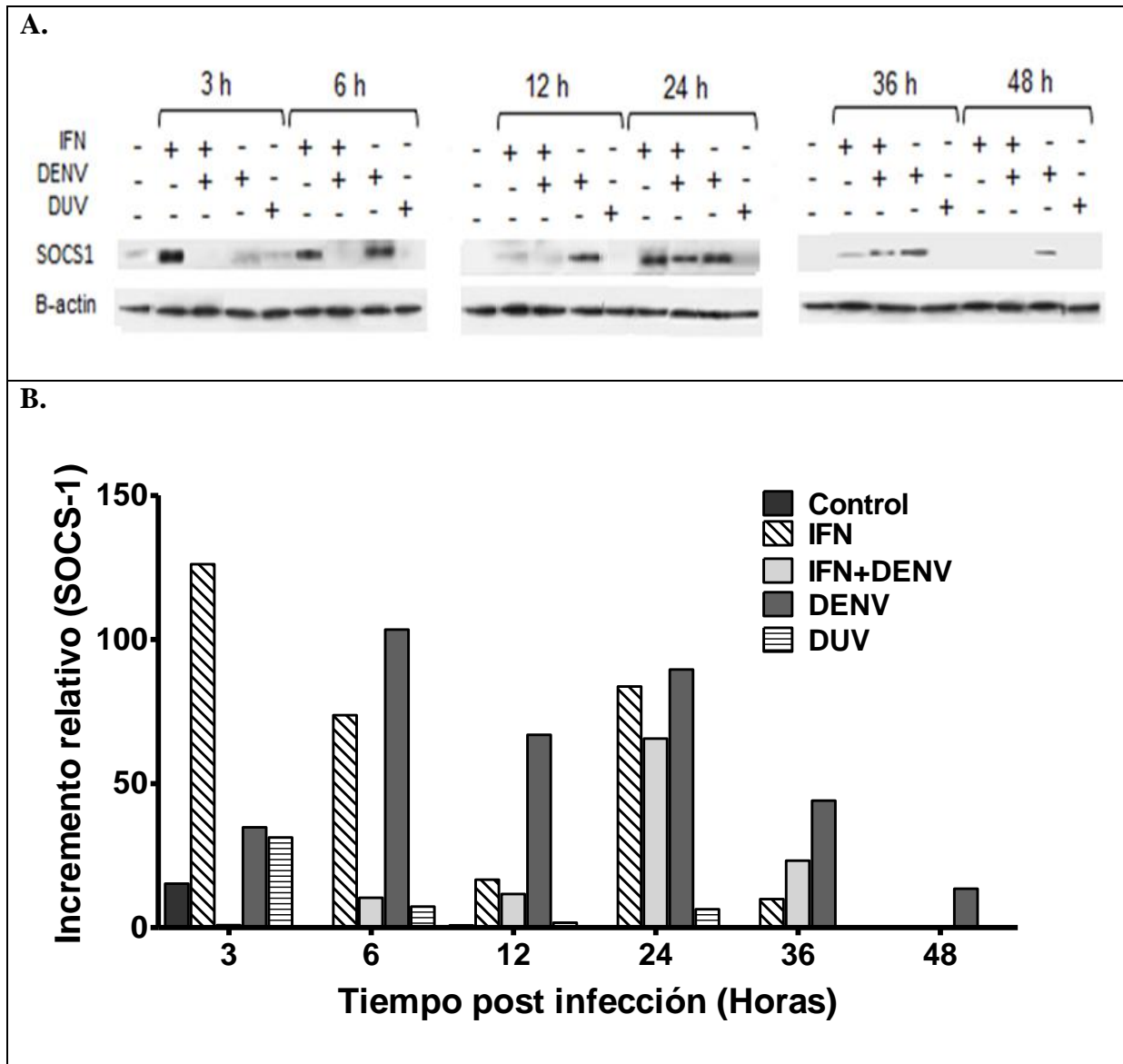


Figura 22. Análisis de la presencia de proteína SOCS-1 **A.** Inmunodetección de SOCS-1 (arriba) y β -actina (abajo) a diferentes tiempos post-infección: 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas. **B.** Análisis densitométrico de cada banda, por cada condición y cada tiempo. Se realizó la normalización de cada banda con la banda de β -actina correspondiente. Se muestra un experimento ilustrativo de una $n=3$.

La presencia de SOCS-3 posterior al tratamiento con IFN- α fue detectada a los tiempos experimentales de 3 a 48 h p.i., siendo más abundante en los tiempos 24 y 48 h p.i., observándose el menor incremento a las 6 h. Por su parte, cuando la infección con DENV se realizó posterior al pretratamiento con IFN- α la presencia de SOCS3 sólo pudo detectarse a partir de 12 h p.i, con una mayor expresión a las 36 h p.i. Finalmente la infección mostró un incremento en la presencia de la proteína, con respecto al control, de las 3 a las 48h p.i., alcanzando un máximo a las 24 y a las 48 h p.i. y fue menor a las 3 h p.i., mostrando un incremento ascendente hasta las 24 h p.i. (Figura 23 A y B).

Los niveles de expresión de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3 no fueron detectados cuando las células fueron inoculadas con el virus inactivo, a excepción de las 3 h en donde se observa una mínima expresión de SOCS-1. Esto sugiere que la replicación viral es requerida para la inducción en la expresión de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3. (Figuras 22 y 23).

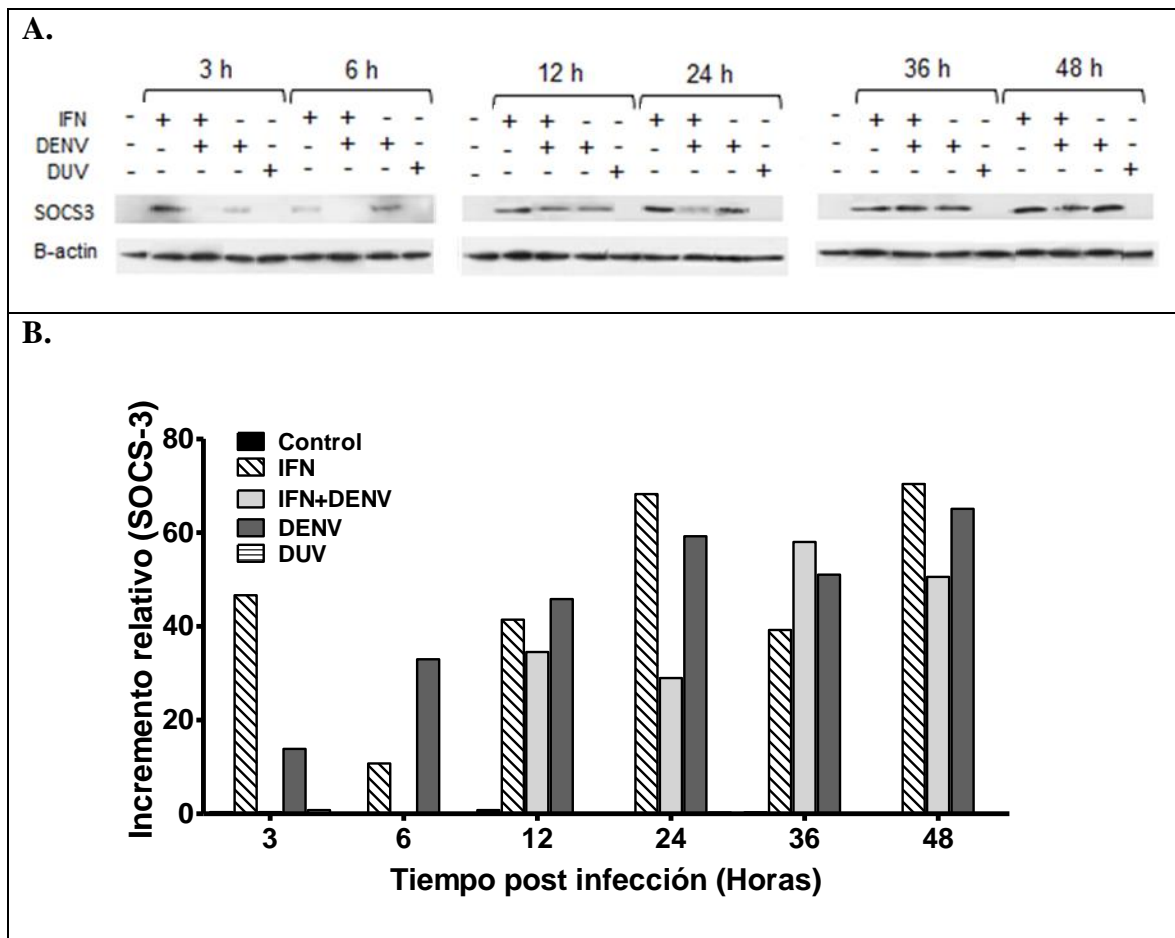


Figura 23. Análisis de la presencia de la proteína SOCS-3 **A.** Inmunodetección de SOCS-3 (arriba) y β -actina (abajo) a diferentes tiempos post-infección: 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas. **B.** Análisis densitométrico de cada banda, por cada condición y cada tiempo. Se realizó la normalización de cada banda con la banda de β -actina correspondiente. Se muestra un experimento ilustrativo de una $n=3$.

8.8 Silenciamiento de SOCS-1 y SOCS-3

Para establecer la participación de las proteínas SOCS en la inhibición de la respuesta inmune y/o en el favorecimiento de la replicación viral, se realizó el silenciamiento de SOCS-1 y SOCS-3. El silenciamiento fue comprobado a través de la cuantificación relativa de la expresión del ARNm de SOCS-1 y SOCS-3 por RT-PCR, en tiempo real posterior al tratamiento con IFN- α de las células silenciadas con respecto a las células no silenciadas, de esta manera, se observó que durante el silenciamiento no hay inducción de la expresión del mensajero de los genes silenciados, los cuales presentan niveles de expresión similares a los de las células control. Cabe destacar que después del silenciamiento de SOCS-3 se observó el incremento de la expresión del ARNm de SOCS-1, respecto a las células control, mientras que durante el silenciamiento de SOCS-1 no se observa incremento en la expresión del mensajero de SOCS-3. (Figura 24 A y B).

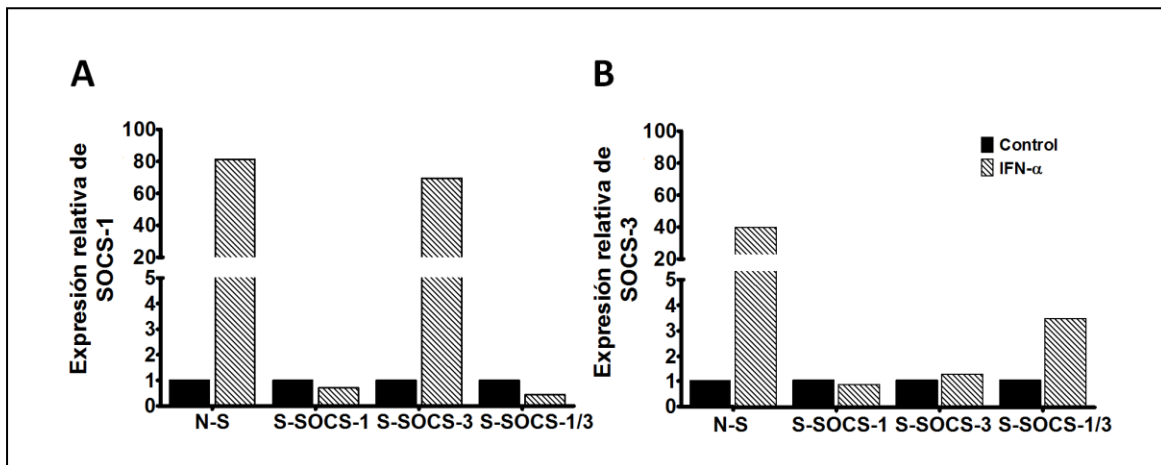


Figura 24. Análisis del efecto del silenciamiento sobre la expresión relativa de SOCS-1 y SOCS-3. A través de RT-PCR en tiempo real y mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, se obtuvo el incremento en número de veces del ARNm en células con silenciamiento de: SOCS-1 (S-SOCS-1), de SOCS-3 (S-SOCS-3) y de SOCS-1/SOCS-3 (S-SOCS-1/3) respecto a las células no silenciadas (N-S,) en células tratadas con IFN- α , a 12 h post-estimulación (A y B).

Una vez corroborado el silenciamiento, se analizó su efecto sobre la vía JAK-STAT, mediante la medición de la transcripción de los productos finales de esta vía como MxA y OAS, así como también del IFN- α .

En el caso de MxA, se observó expresión de su ARNm en los diferentes tratamientos (células tratadas con IFN- α , células infectadas (DENV) y en la infección de células pretratadas con IFN- α (IFN+DENV), después del silenciamiento, respecto a las células control.

Se determinó que la expresión del ARN es muy baja, sin embargo, en las células tratadas con IFN- α con silenciamiento de SOCS-3 y de SOCS-1/3 y en las tratadas con IFN+DENV con silenciamiento de SOCS-1/3, se muestra una inducción considerable de MxA, la cual también es menor que en las células no silenciadas (Figura 25 A).

De la misma forma, para OAS con el silenciamiento de SOCS-1, aunque no se observaron incrementos de la expresión del ARNm de OAS en la infección, se observó una expresión similar a la observada en células sin silenciar, tratadas con IFN- α y con IFN- α +DENV. Este patrón de expresión también se observó con el silenciamiento de SOCS-3 y SOCS-1/3, sin embargo, la expresión de OAS en el silenciamiento de SOCS-3 y el tratamiento con IFN- α , tuvo un incremento de 6 veces comparado con las células no silenciadas (Figura 25 B).

Asimismo, la transcripción del IFN- α tuvo un leve incremento en el silenciamiento de SOCS-1, respecto a las células no silenciadas, con incrementos de 4 y 6 veces en las células tratadas con IFN- α y en las células infectadas después de un pretratamiento con IFN- α , respectivamente. Por otro lado, en el silenciamiento de SOCS-3 y de SOCS-1/3 no se observaron cambios, excepto, en el silenciamiento de SOCS-3 durante el tratamiento con IFN- α , donde se observó un incremento del ARNm de IFN- α , de 37 veces con respecto a las células no silenciadas (Figura 26 A)

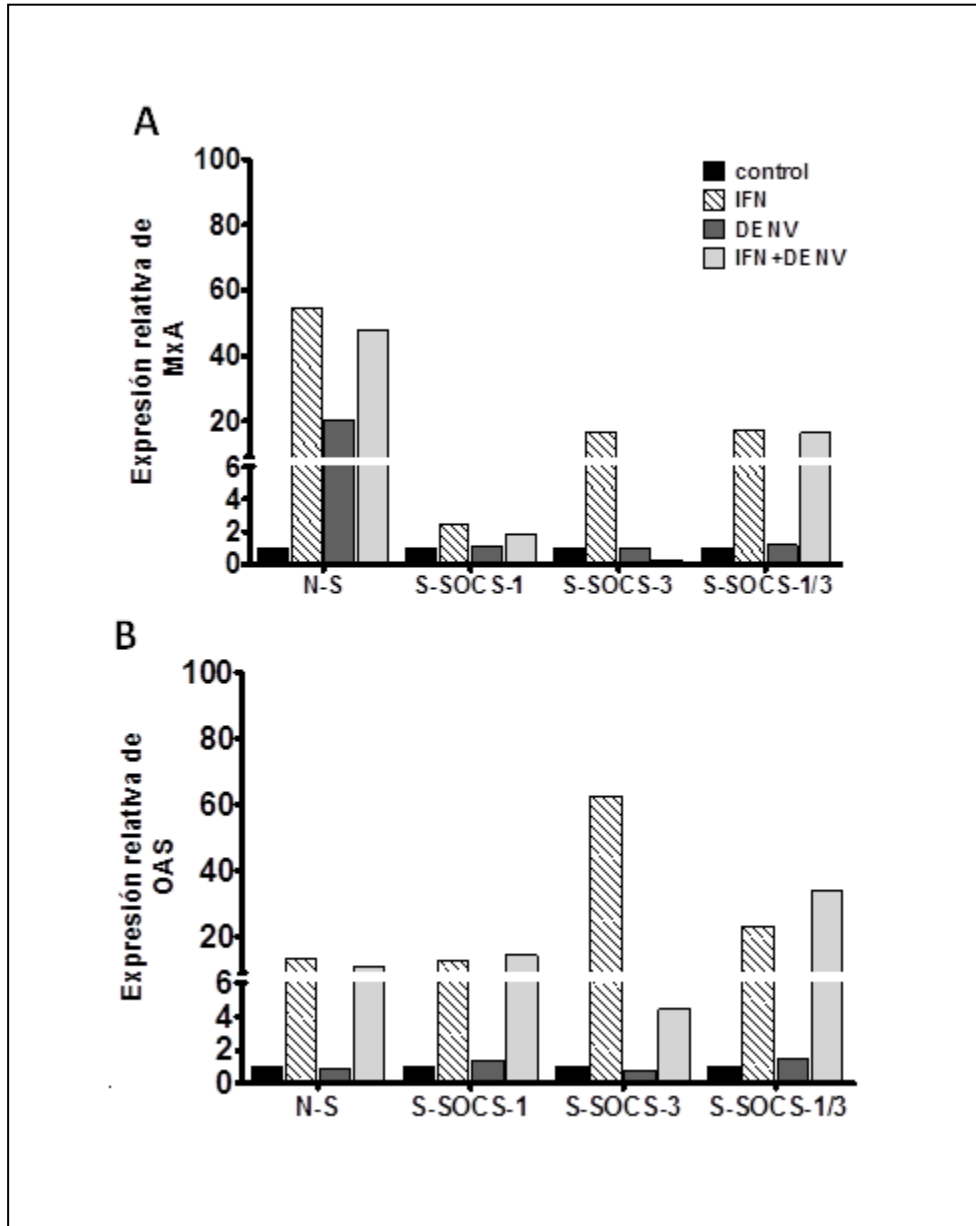


Figura 25. Análisis del efecto del silenciamiento sobre la inducción de la transcripción de MXA y OAS. Por medio de RT-PCR en tiempo real y a través del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, se obtuvo el incremento, en número de veces, respecto a las células sin tratamiento (control) de **A.** MXA y **B.** OAS en células tratadas con IFN- α (IFN); células infectadas posterior al pretratamiento con IFN- α (IFN+DENV), y células infectadas con el virus activo (DENV) y con el virus inactivo (DUV) para las células con silenciamiento de: SOCS-1 (S-SOCS-1); SOCS-3 (S-SOCS-3); de ambas proteínas SOCS-1 y SOCS-3 (S-SOCS-1/3) y de las células no silenciadas (N-S) a 12 h post-infección.

Con la finalidad de analizar el efecto debido al incremento de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3, durante la infección con el DENV, en vías de señalización independientes de la vía JAK-STAT inducida por IFN-tipo I, se analizaron los cambios del nivel de ARNm de otras citocinas tales como TNF- α e IFN- γ en el silenciamiento de SOCS-1 y SOCS-3.

Cuando se analizó la expresión del ARNm de TNF- α , no se observaron incrementos en las células silenciadas con respecto a las células control. Por otro lado, se observaron incrementos, respecto a las células control, de 11 y 8 veces, durante el tratamiento con IFN- α y la infección posterior al pretratamiento con IFN- α , respectivamente, al silenciar ambos genes (S-SOCS-1/3). Además, durante el silenciamiento de SOCS-3 se observó un incremento de 37 veces en las células que fueron estimuladas con IFN- α . No se observó modificación en la expresión del ARNm de TNF- α durante el silenciamiento de SOCS-1, respecto a las células no silenciadas (Figura 26 B).

Al determinar la expresión de ARNm del IFN- γ se observaron cambios importantes por efecto del silenciamiento de los genes SOCS: primero, se observó la disminución de la expresión de IFN- γ ante el estímulo con IFN- α , respecto a las células no silenciadas, en las células en las cuales estuvo involucrado el silenciamiento de SOCS-1 se observó que la infección con DENV induce un fuerte aumento en la expresión de IFN- γ , mientras que las células con silenciamiento de SOCS-3 mostraron menores niveles de expresión de IFN- γ respecto a las células no silenciadas. El tratamiento IFN+DENV disminuyó la expresión del mensajero de IFN- γ , con respecto a la inducción ocasionada por la infección, también, durante el silenciamiento de SOCS-1/3 se observó la disminución de la expresión de IFN- γ respecto a la infección, pero fue mayor a la expresión observada durante el silenciamiento de SOCS-1 y de SOCS-3 (Figura 26 C).

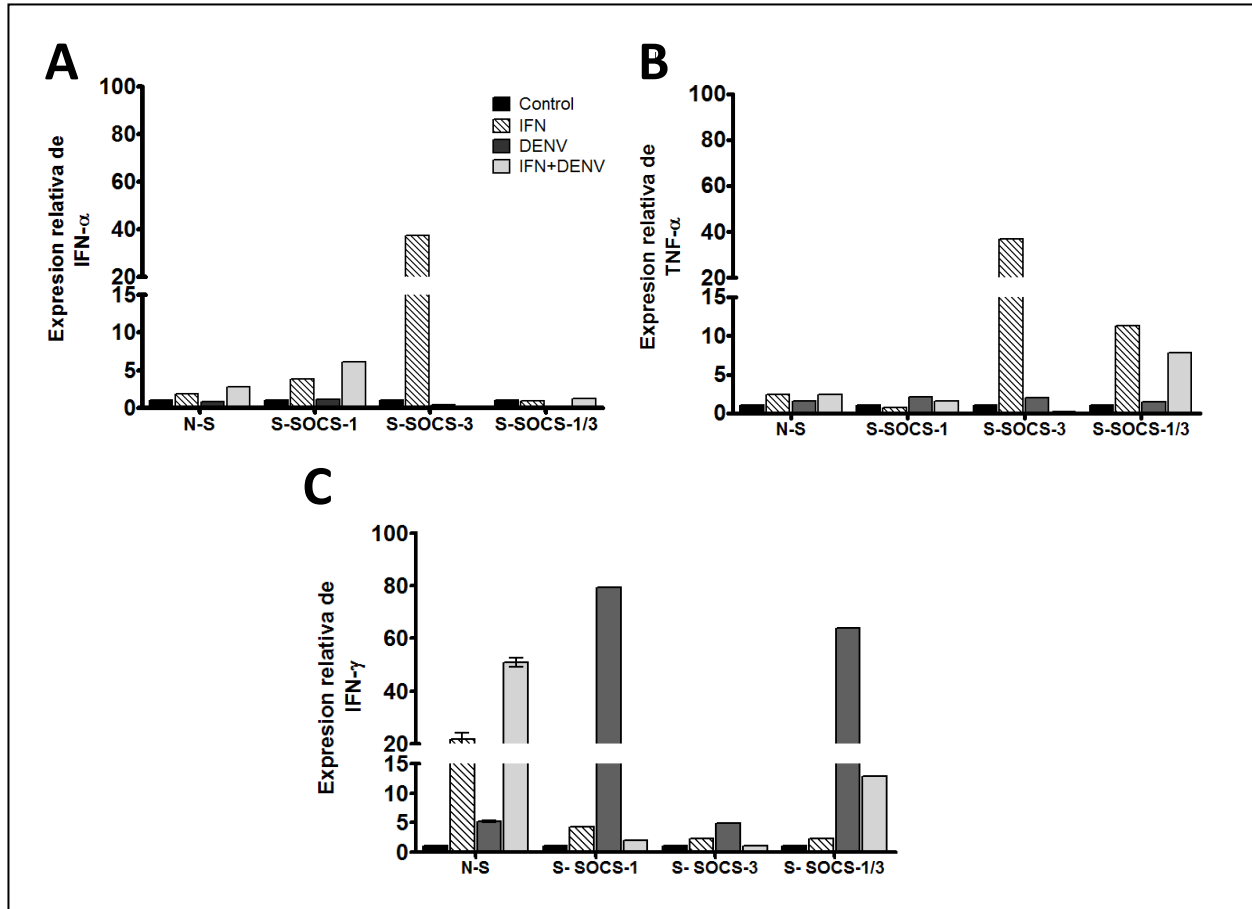


Figura 26. Efecto del silenciamiento sobre la inducción de la transcripción de IFN- α , TNF- α e IFN- γ . A través de la técnica de RT-PCR y mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, se obtuvo el incremento en número de veces de los diferentes tratamientos, respecto a las células control, en células tratadas con IFN- α (IFN); células infectadas posterior al pretratamiento con IFN- α (IFN+DENV), y células infectadas con el virus activo (DENV) y con el virus inactivo (DENV) para las células con silenciamiento de: SOCS-1 (S-SOCS-1); SOCS-3 (S-SOCS-3); de ambas proteínas SOCS-1 y SOCS-3 (S-SOCS-1/3) y de las células no silenciadas (N-S) a 12 h post-infección **A.** IFN- α , **B.** TNF- α y **C.** IFN- γ .

9 DISCUSIÓN

El análisis de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune durante la infección con el virus de dengue es un amplio campo de investigación, actualmente se han descrito varios mecanismos, un mecanismo cardinal estudiado es la regulación negativa de la vía JAK-STAT a través de la interacción de las proteínas no estructurales (NS2, NS4 y NS5) con proteínas del huésped como son las STAT1 y STAT2. (Ashour et al., 2009, Ho et al., 2005, Jones et al., 2005, Mazzon et al., 2009, Muñoz Jordan et al., 2003, Rothman 2010). En este trabajo se analizó el efecto de la infección con el virus dengue en la activación de la vía JAK-STAT, en macrófagos U937, mediante el análisis de la presencia de las proteínas STAT1 y STAT2 total y en sus formas fosforiladas. Se observó la disminución de ambas proteínas, la forma fosforilada de STAT1 disminuye a tiempos tempranos, con una aparente recuperación a partir de las 6 horas p.i., estos resultados concuerdan con reportes previos, en donde se ha relacionado la disminución de la forma fosforilada de STAT1 activada por IFN tipo I con la actividad del complejo NS2B-NS3, NS4A/B del virus dengue, en líneas celulares epiteliales A549, Vero y en las líneas monocíticas: K562 y THP1 (Sureste et al., 2005, Muñoz-Jordan et al., 2005, Rodríguez Madoz et al., 2010, Jones et al., 2005) sin embargo, se ha reportado el incremento de IFN tipo I asociado a la severidad de la infección, en suero de pacientes infectados (Becquart et al, 2010, Kurane 1993, Avirutnan et al., 2007, Chaturvedi et al 2006), mismo que puede explicar la recuperación observada de la activación de STAT1.

Por otro lado, el comportamiento de la proteína STAT2 durante la infección fue distinto, la proteína total disminuye a partir de las 3 h p.i mientras que su forma fosforilada no se observó a ningún tiempo. Esto puede ser debido a los mecanismos reportados en otros trabajos, donde en estudios *in vitro*, en células Vero y células dendríticas humanas, demuestran, mediante análisis de coexpresión y por coprecipitación, la unión de la proteína no estructural del virus dengue NS5 con STAT2, la cual a través de su unión a la proteína de reconocimiento-N UBR4 induce la marcación de STAT2 para su degradación por vía proteasomal (Morrison, et al 2013, Ashour et al., 2010, Ashour, et al., 2009, Mazzon et al., 2009)

Los cambios en la expresión de las proteínas STAT1 y STAT2, llevan a la inhibición de la vía JAK-STAT, dicha inhibición se ve reflejada en la disminución de la transcripción de proteínas antivirales, tales como MxA y OAS. De acuerdo a los resultados de este trabajo, los niveles del ARNm de estas dos proteínas se encuentran disminuidos durante la infección de las 6 a las 48 h p.i. para MxA y para OAS a partir de las 3 a las 48 h p.i. lo cual coincide con resultados previos reportados en otras líneas celulares, macrófagos K562, células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica y células de origen epitelial A549 y HepG2; en todas estas líneas celulares se observó de manera conjunta una disminución de la forma fosforilada de STAT1 y de la proteína STAT2 total durante la infección con el virus dengue y esta disminución se relacionó con la disminución de IFN- α y varió de acuerdo a la línea celular (Muñoz-Jordan 2005, Jones et al., 2005, Mazzon et al., 2009, Ho et al., 2005, Umareddy et al., 2008).

Aunado a estos resultados, se observó que el tratamiento previo a la infección con IFN- α no muestra ninguna disminución en la expresión de las proteínas STAT, con una recuperación de la expresión de estas proteínas en su forma total y fosforilada con respecto a la infección sin previo estímulo, además se observó que, en los sobrenadantes de las células infectadas, posterior al pretratamiento con IFN- α , disminuyen los títulos virales respecto a los títulos observados en los sobrenadantes de las células infectadas sin previo tratamiento, en el ensayo de formación de placas líticas, esto coincide de manera con lo reportado por otros autores que relacionan la estimulación con IFN-tipo I previa a la infección con la disminución de la replicación viral (Jones et al., 2005, Gandini 2013, Rodríguez-Madoz 2010, y Diamond 2001). Estos resultados sugieren que la activación de la vía con IFN- α logra inducir un mecanismo antiviral en las células y que la acción de las proteínas no estructurales virales sobre las STAT no se completa, disminuyendo la replicación viral, con lo que se corrobora la importancia de la inhibición de la vía JAK-STAT en la replicación viral

Se ha propuesto que la inhibición de la vía JAK-STAT es a través de las proteínas NS virales (NS2a/3, NS4a/b, NS5), sin embargo, nuestros resultados, en concordancia con otros autores, muestran que, aun cuando la infección viral es capaz de inhibir la vía JAK-STAT, el pretratamiento,

y la activación de la vía por IFN- α , no inhibe completamente la infección, sugiriendo que la infección viral induce otros mecanismos que coadyuvan a la supervivencia del virus y el establecimiento de la infección. Se ha reportado en otras infecciones virales que la regulación de la vía JAK-STAT y la inhibición de IFN tipo I, es a través de la inducción de las proteínas PIAS, SOCS-1 y SOCS-3, las cuales son requeridas en el establecimiento de infecciones virales como: RSV, HCV, HSV y el virus influenza A (Yokota et al., 2004; Bode et al., 2003; Oshansky et al., 2009; Pauli et al., 2008; Pothlichet et al., 2008). Nuestros resultados muestran que, para PIAS1 únicamente se observó un incremento de su ARNm a las 24h p.i. durante la infección viral con o sin tratamiento previo con IFN- α esto sugiere que su incremento puede ser debido a los mecanismos desencadenados por la elevación de la carga viral, más que a mecanismos de evasión de la respuesta antiviral. No obstante, la infección con el virus de dengue induce elevados niveles tanto del ARNm de la proteína SOCS-1, respecto al control de estimulación, en este caso IFN- α , que es el principal inductor de esta proteína, a la par se observaron incrementos de SOCS3 en la infección, aunque dichos incrementos son menores, en comparación a los observados para SOCS1, incluyendo para el control de expresión con IFN- α , y los incrementos se observaron a tiempos posteriores a SOCS1. La infección posterior al pretratamiento con IFN- α indujo menor incremento de SOCS1, lo que sugiere que la inducción de este gen podría actuar como mecanismo de evasión de la respuesta antiviral. De igual forma, la infección posterior al tratamiento con IFN- α mostró niveles del mensajero de SOCS-3 mayores, y los tiempos de inducción coinciden con los observados durante el estímulo de IFN- α , esto sugiere que la inducción observada por la infección está relacionada con el incremento en el título viral y el establecimiento de la infección viral.

Para corroborar la función de las proteínas SOCS en la replicación viral y en la inhibición de la vía JAK-STAT, se realizó el silenciamiento de SOCS-1, SOCS-3 y SOCS-1 y 3, mediante ARN de interferencia. Se determinaron los productos finales de la vía: MXA, OAS e IFN- α , observándose que durante los silenciamientos no se modificó la expresión de ninguno de estos genes cuando las células fueron infectadas con el virus dengue, con o sin tratamiento previo con IFN- α , es decir, no

existe restablecimiento de la vía durante la infección aun cuando los inhibidores de ésta son silenciados.

La expresión de citocinas como TNF- α e INF- γ , asociadas a la patogénesis del dengue severo (Chakravarti y Kumaria et al 2006), puede ser inhibida por las proteínas SOCS, por lo que se realizó la determinación de su ARNm durante el silenciamiento de SOCS1, SOCS3 y SOCS1/3. La expresión de TNF- α no se vio afectada a un tiempo temprano de 12 horas p.i., esto puede ser debido a la cinética de producción de TNF- α , la cual se sintetiza a tiempos tardíos 24-48 horas p.i (Carr et al., 2003, Espina et al., 2003, Newby et al., 2007). Cabe señalar que la inducción de la expresión de TNF- α no está relacionada con la vía JAK-STAT, sino que es a través de la activación de los factores de transcripción NF-kB y AP-1 (Hiscott et al., 2006; Kulms y Schwarz, 2006), por lo cual las vías celulares de señalización desencadenadas por el reconocimiento del genoma viral, a través de TLRs y RIG son capaces de estimular su expresión, como parte de la respuesta inflamatoria inducida por la infección, y no por la relación directa con elementos de la estructura viral.

Por otro lado, la expresión de IFN- γ está asociada con la respuesta del hospedero para la eliminación de la infección viral producido principalmente por las células NK y linfocitos citotóxicos, sin embargo, no se ha esclarecido totalmente su participación en la patogénesis del dengue aunque su incremento se ha asociado con la presentación de formas severas de la enfermedad, también se ha detectado su expresión en formas no complicadas o sin asociación con la severidad de la infección (Espada-Murao y Kouichi Morita 2011). Además se ha reportado la expresión del mismo por macrófagos, incluyendo la línea celular U937 (Tsai y Ma 2013), inducida por señalización celular activada por la infección viral, que inducen su expresión y median la polarización del macrófago hacia una respuesta antiinflamatoria y la capacidad de activar linfocitos T citotóxicos, en este estudio encontramos que la infección con el virus de dengue disminuye la transcripción de INF- γ con respecto a la inducción que logra detectarse después de la estimulación con IFN- α con o sin infección a las 12 horas p.i. esto aunado con el hecho de que durante el silenciamiento de SOCS-1 se observó el incremento de los niveles de ARNm de IFN- γ , no así durante el silenciamiento de SOCS

3 que si bien muestra un aumento en la expresión de esta citocina es a niveles menores. La vía de señalización de IFN- γ es mediada por la fosforilación y formación de homodímeros de STAT1 (Patil et al 2014, Tsai y Ma 2013, Kershaw et al., 2013) por lo cual puede verse afectada también por las proteínas NS virales (Ashour et al., 2009) y la expresión de la proteína fosforilada, sin embargo, como muestran nuestros resultados, es incluso mayor a la inducida por el solo estímulo de IFN- α después de las 6 horas p.i. Estos resultados sugieren que la disminución de IFN- γ a tiempos tempranos, 12 h p.i. es debida a la expresión de SOCS-1 inducida por el virus a 6 y 12 horas, no obstante cuando los niveles de STAT 1 se recuperan (posterior a las 6 horas), los niveles de IFN- γ muestran el mismo patrón como se reporta en suero de pacientes infectados con dengue, donde la expresión de esta citocina se encuentra incrementa siempre después de las 24 horas p.i (Chakravarti y Kumaria 2006). Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de SOCS-1 es un mecanismo de evasión viral debido al hecho que durante el silenciamiento de SOCS-1 incrementan los niveles de IFN- γ y esto disminuye la replicación viral. Enmarcando nuestros resultados en un sistema de infección *in vivo* se podría hipotetizar que la alta expresión de SOCS-1 inducida por la infección por dengue contribuye a la evasión de la respuesta inmune al disminuir la expresión de IFN- γ y con ello la activación de células citotóxicas capaces de eliminar células infectadas, permitiendo la replicación viral durante las primeras horas de infección. En etapas posteriores de la infección (después de 12 horas) cuando los niveles de STAT1 se recuperan, la producción de IFN- γ se reestablece. Por lo cual se sugiere determinar a otros tiempos la cinética de expresión de IFN- γ para corroborar este comportamiento.

A continuación se muestra un panorama general de las consecuencias del incremento de la expresión de SOCS-1 y SOCS-3 inducido por la infección con el virus dengue.

10 CONCLUSIONES

1. La infección con el virus de dengue inhibe la expresión de las proteínas STAT1 y STAT2 totales y fosforiladas y con ello la activación de la vía JAK-STAT, disminuyendo la expresión de las proteínas antivirales MxA y OAS.
2. La inhibición de las proteínas STAT1 y STAT2 es revertida cuando la infección ocurre después de la estimulación de las células con IFN- α , y este pretratamiento con IFN- α disminuye la replicación viral un 60%.
3. La infección con el virus de dengue induce la expresión de las proteínas supresoras de respuesta a citocinas SOCS1 y SOCS3, esta inducción está relacionada a la inhibición de la transcripción de IFN- γ durante el inicio de la replicación viral.
4. El silenciamiento de las proteínas SOCS1 y SOCS3 a 12 h p.i. no modifica la transcripción de las proteínas antivirales MxA y OAS durante la infección con el virus de dengue, sin embargo induce el incremento de la transcripción de IFN- γ , respecto a las células no silenciadas.

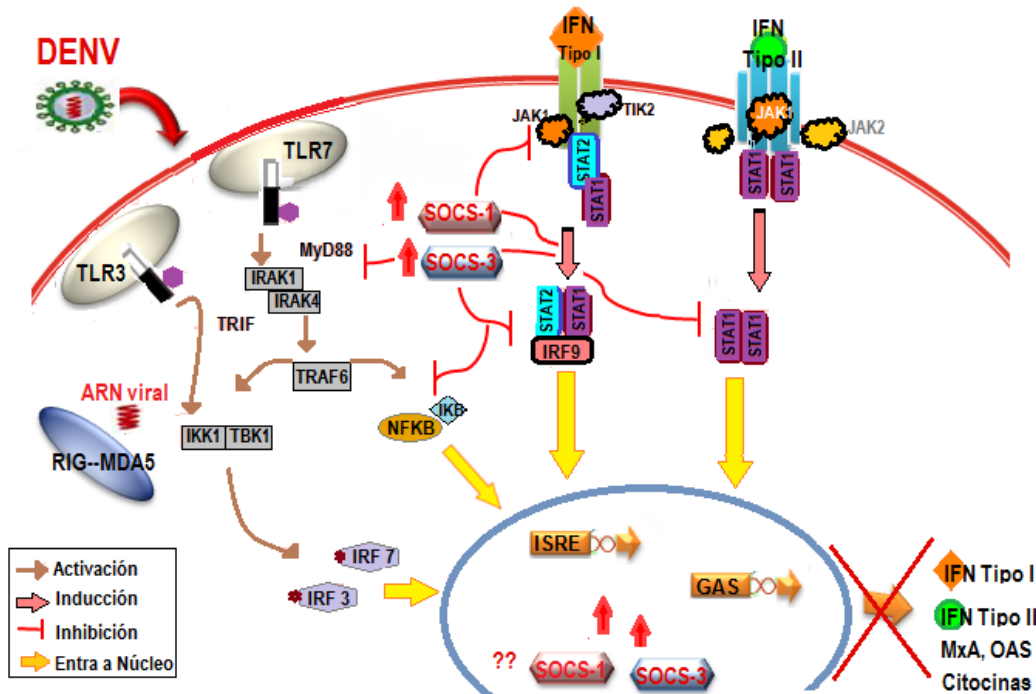


Figura 26. Panorama general de los posibles mecanismos de evasión de la respuesta inmune antiviral por el virus de dengue: Durante la replicación viral ocurre el reconocimiento de elementos virales por los receptores tipo Toll (TLR)3, 7 y 9, los cuales inician el reclutamiento de proteínas adaptadoras como TRIF, MyD88, las cuales median el subsecuente reclutamiento y activación de cinasas TBK1 e IKK, de forma similar las RNA helicasas: RIG y MDA5 también activan estas cinasas que ocasionan la fosforilación de IRF3 y 7, que se translocan al núcleo y se unen a sitios promotores de IFN- β y de IFN- α respectivamente, este IFN tipo I es reconocido por sus receptores específicos IFNAR, lo que lleva a la activación de las proteínas cinasas TyK2 y JAK1 y su fosforilación con lo cual se activa la cascada de fosforilación y la formación de heterodímeros STAT1 y STAT2 que junto con la proteína IRF9 conforman el complejo de entrada nuclear ISGF3, capaz de inducir la expresión de genes de respuesta a IFN-tipo I mediante la activación de elementos de respuesta a IFN (ISRE). La activación de las diferentes cascadas de señalización lleva a la inducción de la expresión de IFN tipo II, que es reconocido por los receptores IFNGR e induce la activación de secuencias activadas por IFN- γ (GAS) a través la formación de homodímeros STAT1. Esta producción de IFNs es frenada durante la infección con el virus de dengue a la vez que se induce el incremento de la transcripción y expresión de proteínas de regulación negativa, las proteínas supresoras inducidas por citocinas SOCS-1 y SOCS-3 las cuales funcionan como inhibidoras directas de la vía JAK-STAT, mediante la inhibición de la unión de las cinasas TIK y JAK al receptor, asimismo por inhibición de la proteína STAT. Los altos niveles de las proteínas SOCS-1 y SOCS-3 pueden explicar la inhibición de estas vías de señalización y la inhibición de la expresión de las proteínas antivirales MxA y OAS, así como de los IFNs tipo I y tipo II, lo cual lleva a la desregulación de la expresión de citocinas proinflamatorias que resulta en la respuesta inmune desregulada asociada con la fisiopatogenia de la infección por el virus de dengue, (para lo cual se requieren mayores estudios).

11 BIBLIOGRAFIA

1. Akhtar, L. N. and E. N. Benveniste. "Viral Exploitation of Host Socs Protein Functions." *J Virol* 85, no. 5 (2011): 1912-21.
2. Alcaraz-Estrada, S. L., M. I. Manzano, R. M. Del Angel, R. Levis and R. Padmanabhan. "Construction of a Dengue Virus Type 4 Reporter Replicon and Analysis of Temperature-Sensitive Mutations in Non-Structural Proteins 3 and 5." *J Gen Virol* 91, no. Pt 11 (2010): 2713-8.
3. Alexander, W. S. and D. J. Hilton. "The Role of Suppressors of Cytokine Signaling (Socs) Proteins in Regulation of the Immune Response." *Annu Rev Immunol* 22, (2004): 503-29.
4. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell. "Recognition of Double-Stranded Rna and Activation of Nf-Kappab by Toll-Like Receptor 3." *Nature* 413, no. 6857 (2001): 732-8.
5. Anderson, R., S. Wang, C. Osioy and A. C. Issekutz. "Activation of Endothelial Cells Via Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection of Peripheral Blood Monocytes." *J Virol* 71, no. 6 (1997): 4226-32.
6. Ashour, J., M. Laurent-Rolle, P. Y. Shi and A. García-Sastre. "Ns5 of Dengue Virus Mediates Stat2 Binding and Degradation." *J Virol* 83, no. 11 (2009): 5408-18.
7. Ashour, J., J. Morrison, M. Laurent-Rolle, A. Belicha-Villanueva, C. R. Plumlee, D. Bernal-Rubio, K. L. Williams, E. Harris, A. Fernandez-Sesma, C. Schindler and A. García-Sastre. "Mouse Stat2 Restricts Early Dengue Virus Replication." *Cell Host Microbe* 8, no. 5 (2010): 410-21.
8. Au-Yeung, N., R. Mandhana and C. M. Horvath. "Transcriptional Regulation by Stat1 and Stat2 in the Interferon Jak-Stat Pathway." *JAKSTAT* 2, no. 3 (2013): e23931.
9. Avirutnan, P., A. Fuchs, R. E. Hauhart, P. Somnuk, S. Youn, M. S. Diamond and J. P. Atkinson. "Antagonism of the Complement Component C4 by Flavivirus Nonstructural Protein Ns1." *J Exp Med* 207, no. 4 (2010): 793-806.
10. Babon, J. J., N. J. Kershaw, J. M. Murphy, L. N. Varghese, A. Laktyushin, S. N. Young, I. S. Lucet, R. S. Norton and N. A. Nicola. "Suppression of Cytokine Signaling by Socs3: Characterization of the Mode of Inhibition and the Basis of Its Specificity." *Immunity* 36, no. 2 (2012): 239-50.
11. Babon, J. J., A. Laktyushin and N. J. Kershaw. "In Vitro Ubiquitination of Cytokine Signaling Components." *Methods Mol Biol* 967, (2013): 261-71.
12. Bäck, A. T. and A. Lundkvist. "Dengue Viruses - an Overview." *Infect Ecol Epidemiol* 3, (2013).

13. Baetz, A., M. Frey, K. Heeg and A. H. Dalpke. "Suppressor of Cytokine Signaling (Socs) Proteins Indirectly Regulate Toll-Like Receptor Signaling in Innate Immune Cells." *J Biol Chem* 279, no. 52 (2004): 54708-15.
14. Basu, A. and U. C. Chaturvedi. "Vascular Endothelium: The Battlefield of Dengue Viruses." *FEMS Immunol Med Microbiol* 53, no. 3 (2008): 287-99.
15. Baum, A. and A. García-Sastre. "Induction of Type I Interferon by Rna Viruses: Cellular Receptors and Their Substrates." *Amino Acids* 38, no. 5 (2010): 1283-99.
16. Bazan, J. F. and R. J. Fletterick. "Detection of a Trypsin-Like Serine Protease Domain in Flaviviruses and Pestiviruses." *Virology* 171, no. 2 (1989): 637-9.
17. Becquart P., N. Wauquier, D. Nkoghe, A. Ndjoyi-Mbiguino, C. Padilla, M. Souris, E. M. Leroy. "Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production." *BMC Infectious Diseases* 10, no.** (2010): 356.
18. Best, S. M., K. L. Morris, J. G. Shannon, S. J. Robertson, D. N. Mitzel, G. S. Park, E. Boer, J. B. Wolfenbarger and M. E. Bloom. "Inhibition of Interferon-Stimulated Jak-Stat Signaling by a Tick-Borne Flavivirus and Identification of Ns5 as an Interferon Antagonist." *J Virol* 79, no. 20 (2005): 12828-39.
19. Billiau, A. and P. Matthys. "Interferon-Gamma: A Historical Perspective." *Cytokine Growth Factor Rev* 20, no. 2 (2009): 97-113.
20. Bluysen, A. R., J. E. Durbin and D. E. Levy. "Isgf3 Gamma P48, a Specificity Switch for Interferon Activated Transcription Factors." *Cytokine Growth Factor Rev* 7, no. 1 (1996): 11-7.
21. Bode, J. G., E. D. Brenndörfer and D. Häussinger. "Subversion of Innate Host Antiviral Strategies by the Hepatitis C Virus." *Arch Biochem Biophys* 462, no. 2 (2007): 254-65.
22. Bode, J. G., S. Ludwig, C. Ehrhardt, U. Albrecht, A. Erhardt, F. Schaper, P. C. Heinrich and D. Häussinger. "Ifn-Alpha Antagonistic Activity of Hcv Core Protein Involves Induction of Suppressor of Cytokine Signaling-3." *FASEB J* 17, no. 3 (2003): 488-90.
23. Bonjardim, C. A., P. C. Ferreira and E. G. Kroon. "Interferons: Signaling, Antiviral and Viral Evasion." *Immunol Lett* 122, no. 1 (2009): 1-11.
24. Bustos-Arriaga, J., J. García-Machorro, M. León-Juárez, J. García-Cordero, L. Santos-Argumedo, L. Flores-Romo, A. R. Méndez-Cruz, F. J. Juárez-Delgado and L. Cedillo-Barrón. "Activation of the Innate Immune Response against Denv in Normal Non-Transformed Human Fibroblasts." *PLoS Negl Trop Dis* 5, no. 12 (2011): e1420.
25. Butthep, P., S. Chunchakan, S. Yoksan, K. Tangnararatchakit, A. Chuansumrit. "Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever." *Pediatr Infect Dis J* 12, (2012):e232-8

26. Carr, J. M., H. Hocking, K. Bunting, P. J. Wright, A. Davidson, J. Gamble, C. J. Burrell and P. Li. "Supernatants from Dengue Virus Type-2 Infected Macrophages Induce Permeability Changes in Endothelial Cell Monolayers." *J Med Virol* 69, no. 4 (2003): 521-8.
27. CENA VECE: Anuarios de Morbilidad 2000-2010/ Panorama Epidemiológico de Dengue, Cierre 2011.
28. Chakravarti, A. and R. Kumaria. "Circulating Levels of Tumour Necrosis Factor-Alpha & Interferon-Gamma in Patients with Dengue & Dengue Haemorrhagic Fever During an Outbreak." *Indian J Med Res* 123, no. 1 (2006): 25-30.
29. Chang, T. H., S. R. Chen., C. Y. Yu, Y. S. Lin, Y. S. Chen, T. Kubota, M. Matsuoka, Y. L. Lin. "Dengue Virus Serotype 2 Blocks Extracellular Signal-Regulated Kinase and Nuclear Factor-kB Activation to Downregulate Cytokine Production" *PLoS One* 7 no. 8 (2012): e41635.
30. Charnsilpa, W., R. Takhampunya, T. P. Endy, M. P. Mammen, D. H. Libraty and S. Ubol. "Nitric Oxide Radical Suppresses Replication of Wild-Type Dengue 2 Viruses in Vitro." *J Med Virol* 77, no. 1 (2005): 89-95.
31. Chaturvedi, U. C., R. Agarwal, E. A. Elbishbishi and A. S. Mustafa. "Cytokine Cascade in Dengue Hemorrhagic Fever: Implications for Pathogenesis." *FEMS Immunol Med Microbiol* 28, no. 3 (2000): 183-8.
32. Chaturvedi, U. C., E. A. Elbishbishi, R. Agarwal, R. Raghupathy, R. Nagar, R. Tandon, A. S. Pacsa, O. I. Younis and F. Azizieh. "Sequential Production of Cytokines by Dengue Virus-Infected Human Peripheral Blood Leukocyte Cultures." *J Med Virol* 59, no. 3 (1999): 335-40.
33. Chaturvedi, U., R. Nagar and R. Shrivastava. "Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever: Implications of Host Genetics." *FEMS Immunol Med Microbiol* 47, no. 2 (2006): 155-66.
34. Chen, H. C., F. M. Hofman, J. T. Kung, Y. D. Lin and B. A. Wu-Hsieh. "Both Virus and Tumor Necrosis Factor Alpha Are Critical for Endothelium Damage in a Mouse Model of Dengue Virus-Induced Hemorrhage." *J Virol* 81, no. 11 (2007): 5518-26.
35. Chen, S. T., Y. L. Lin, M. T. Huang, M. F. Wu, S. C. Cheng, H. Y. Lei, C. K. Lee, T. W. Chiou, C. H. Wong and S. L. Hsieh. "Clec5a Is Critical for Dengue-Virus-Induced Lethal Disease." *Nature* 453, no. 7195 (2008): 672-6.
36. Chen, Y., T. Maguire, R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. D. Esko, R. J. Linhardt and R. M. Marks. "Dengue Virus Infectivity Depends on Envelope Protein Binding to Target Cell Heparan Sulfate." *Nat Med* 3, no. 8 (1997): 866-71.
37. Chuansumrit, A., C. Puripokai, P. Butthep, W. Wongtiraporn, W. Sasanakul, K. Tangnararatchakit, S. Chanhakan and S. Yoksan. "Laboratory Predictors of Dengue Shock Syndrome During the Febrile Stage." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 41, no. 2 (2010): 326-32.
38. Chung, C. D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta and K. Shuai. "Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by Pias3." *Science* 278, no. 5344 (1997): 1803-5.

39. Clyde, K. and E. Harris. "Rna Secondary Structure in the Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selection and Is Required for Viral Replication." *J Virol* 80, no. 5 (2006): 2170-82.
40. Colamonici, O. R., P. Domanski, S. M. Sweitzer, A. Larner and R. M. Buller. "Vaccinia Virus B18r Gene Encodes a Type I Interferon-Binding Protein That Blocks Interferon Alpha Transmembrane Signaling." *J Biol Chem* 270, no. 27 (1995): 15974-8.
41. Conceição, T. M., A. T. Da Poian and M. H. Sorgine. "A Real-Time Pcr Procedure for Detection of Dengue Virus Serotypes 1, 2, and 3, and Their Quantitation in Clinical and Laboratory Samples." *J Virol Methods* 163, no. 1 (2010): 1-9.
42. Costa, V. V., C. T. Fagundes, D. da Gloria de Souza, M. M. Teixeira. "Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection: Protection versus Disease Induction." *Am J Pathol* 182, (2013):1950-51.
43. Darnell, J. E., I. M. Kerr and G. R. Stark. "Jak-Stat Pathways and Transcriptional Activation in Response to Ifns and Other Extracellular Signaling Proteins." *Science* 264, no. 5164 (1994): 1415-21.
44. Davey, G. M., W. R. Heath and R. Starr. "Socs1: A Potent and Multifaceted Regulator of Cytokines and Cell-Mediated Inflammation." *Tissue Antigens* 67, no. 1 (2006): 1-9.
45. Decker, T. and A. Meinke. "Jaks, Stats and the Immune System." *Immunobiology* 198, no. 1-3 (1997): 99-111.
46. den Boon, J. A., A. Diaz and P. Ahlquist. "Cytoplasmic Viral Replication Complexes." *Cell Host Microbe* 8, no. 1 (2010): 77-85.
47. Diamond, M. S. and E. Harris. "Interferon Inhibits Dengue Virus Infection by Preventing Translation of Viral Rna through a Pkr-Independent Mechanism." *Virology* 289, no. 2 (2001): 297-311.
48. Diamond, M. S., T. G. Roberts, D. Edgil, B. Lu, J. Ernst and E. Harris. "Modulation of Dengue Virus Infection in Human Cells by Alpha, Beta, and Gamma Interferons." *J Virol* 74, no. 11 (2000): 4957-66.
49. El Kasmi, K. C., J. Holst, M. Coffre, L. Mielke, A. de Pauw, N. Lhocine, A. M. Smith, R. Rutschman, D. Kaushal, Y. Shen, T. Suda, R. P. Donnelly, M. G. Myers, W. Alexander, D. A. Vignali, S. S. Watowich, M. Ernst, D. J. Hilton and P. J. Murray. "General Nature of the Stat3-Activated Anti-Inflammatory Response." *J Immunol* 177, no. 11 (2006): 7880-8.
50. Espada-Murao, L. A. and K. Morita. "Dengue and Soluble Mediators of the Innate Immune System." *Trop Med Health* 39, no. 4 Suppl (2011): 53-62.
51. Espina, L. M., N. J. Valero, J. M. Hernández and J. A. Mosquera. "Increased Apoptosis and Expression of Tumor Necrosis Factor-Alpha Caused by Infection of Cultured Human Monocytes with Dengue Virus." *Am J Trop Med Hyg* 68, no. 1 (2003): 48-53.
52. Ferguson, B. J., D. S. Mansur, N. E. Peters, H. Ren and G. L. Smith. "Dna-Pk Is a Dna Sensor for Irf-3-Dependent Innate Immunity." *Elife* 1, (2012): e00047.

53. Fujimoto, M. and T. Naka. "Socs1, a Negative Regulator of Cytokine Signals and Tlr Responses, in Human Liver Diseases." *Gastroenterol Res Pract* 2010, (2010).
54. Furqan, M., N. Mukhi, B. Lee and D. Liu. "Dysregulation of Jak-Stat Pathway in Hematological Malignancies and Jak Inhibitors for Clinical Application." *Biomark Res* 1, no. 1 (2013): 5.
55. Gandini, M., C. Gras, E. L. Azeredo, L. M. Pinto, N. Smith, P. Despres, R. V. da Cunha, L. J. de Souza, C. F. Kubelka and J. P. Herbeuval. "Dengue Virus Activates Membrane Trail Relocalization and Ifn-A Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells in Vitro and in Vivo." *PLoS Negl Trop Dis* 7, no. 6 (2013): e2257.
56. Gao, S., A. von der Malsburg, S. Paeschke, J. Behlke, O. Haller, G. Kochs and O. Daumke. "Structural Basis of Oligomerization in the Stalk Region of Dynamin-Like Mxa." *Nature* 465, no. 7297 (2010): 502-6.
57. Garcin, D., P. Latorre and D. Kolakofsky. "Sendai Virus C Proteins Counteract the Interferon-Mediated Induction of an Antiviral State." *J Virol* 73, no. 8 (1999): 6559-65.
58. García, G., N. González, A. B. Pérez, B. Sierra, E. Aguirre, D. Rizo, A. Izquierdo, L. Sánchez, D. Díaz, M. Lezcay, B. Pacheco, K. Hirayama and M. G. Guzmán. "Long-Term Persistence of Clinical Symptoms in Dengue-Infected Persons and Its Association with Immunological Disorders." *Int J Infect Dis* 15, no. 1 (2011): e38-43.
59. Gibbons R. V. and D. W. Vaughn. "Dengue: an escalating problem." *BMJ*. 324. no. 7353 (2002):1563–1566.
60. Gotoh, B., K. Takeuchi, T. Komatsu, J. Yokoo, Y. Kimura, A. Kurotani, A. Kato and Y. Nagai. "Knockout of the Sendai Virus C Gene Eliminates the Viral Ability to Prevent the Interferon-Alpha/Beta-Mediated Responses." *FEBS Lett* 459, no. 2 (1999): 205-10.
61. Green, S., D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, A. Nisalak, R. Lew, B. L. Innis, I. Kurane, A. L. Rothman and F. A. Ennis. "Early Immune Activation in Acute Dengue Illness Is Related to Development of Plasma Leakage and Disease Severity." *J Infect Dis* 179, no. 4 (1999): 755-62.
62. Green, S., D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, A. Nisalak, A. L. Rothman and F. A. Ennis. "Elevated Plasma Interleukin-10 Levels in Acute Dengue Correlate with Disease Severity." *J Med Virol* 59, no. 3 (1999): 329-34.
63. Gubler D.J. "Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century." *Trop Med Health* 39, (2011):3-11.
64. Gubler, D. J. "The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases as Public Health Problems." *Arch Med Res* 33, no. 4 (2002): 330-42.
65. Guirakhoo, F., R. A. Bolin and J. T. Roehrig. "The Murray Valley Encephalitis Virus Prm Protein Confers Acid Resistance to Virus Particles and Alters the Expression of Epitopes within the R2 Domain of E Glycoprotein." *Virology* 191, no. 2 (1992): 921-31.
66. Guirakhoo, F., F. X. Heinz, C. W. Mandl, H. Holzmann and C. Kunz. "Fusion Activity of Flaviviruses: Comparison of Mature and Immature (Prm-Containing) Tick-Borne Encephalitis Virions." *J Gen Virol* 72 (Pt 6), (1991): 1323-9.

67. Guzmán, M. G. "[Dengue and Hemorrhagic Dengue Fever: A Forgotten Entity?]." *Rev Cubana Med Trop* 54, no. 3 (2002): 169-70.
68. Haller, O. and G. Kochs. "Human Mxa Protein: An Interferon-Induced Dynamin-Like Gtpase with Broad Antiviral Activity." *J Interferon Cytokine Res* 31, no. 1 (2011): 79-87.
69. Haller, O., G. Kochs and F. Weber. "Interferon, Mx, and Viral Countermeasures." *Cytokine Growth Factor Rev* 18, no. 5-6 (2007): 425-33.
70. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner and S. Bauer. "Species-Specific Recognition of Single-Stranded Rna Via Toll-Like Receptor 7 and 8." *Science* 303, no. 5663 (2004): 1526-9.
71. Heinz, F. X. and S. L. Allison. "Flavivirus Structure and Membrane Fusion." *Adv Virus Res* 59, (2003): 63-97.
72. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira. "A Toll-Like Receptor Recognizes Bacterial Dna." *Nature* 408, no. 6813 (2000): 740-5.
73. Hiscott, J., T. L. Nguyen, M. Arguello, P. Nakhaei and S. Paz. "Manipulation of the Nuclear Factor-Kappab Pathway and the Innate Immune Response by Viruses." *Oncogene* 25, no. 51 (2006): 6844-67.
74. Ho, L. J., L. F. Hung, C. Y. Weng, W. L. Wu, P. Chou, Y. L. Lin, D. M. Chang, T. Y. Tai and J. H. Lai. "Dengue Virus Type 2 Antagonizes Ifn-Alpha but Not Ifn-Gamma Antiviral Effect Via Down-Regulating Tyk2-Stat Signaling in the Human Dendritic Cell." *J Immunol* 174, no. 12 (2005): 8163-72.
75. Hollidge, B. S., S. R. Weiss and S. S. Soldan. "The Role of Interferon Antagonist, Non-Structural Proteins in the Pathogenesis and Emergence of Arboviruses." *Viruses* 3, no. 6 (2011): 629-58.
76. Honda, K., A. Takaoka and T. Taniguchi. "Type I Interferon [Corrected] Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors." *Immunity* 25, no. 3 (2006): 349-60.
77. Huang, Y., J. J. Feld, R. K. Sapp, S. Nanda, J. H. Lin, L. M. Blatt, M. W. Fried, K. Murthy and T. J. Liang. "Defective Hepatic Response to Interferon and Activation of Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Chronic Hepatitis C." *Gastroenterology* 132, no. 2 (2007): 733-44.
78. Hung, S. L., P. L. Lee, H. W. Chen, L. K. Chen, C. L. Kao and C. C. King. "Analysis of the Steps Involved in Dengue Virus Entry into Host Cells." *Virology* 257, no. 1 (1999): 156-67.
79. Ilangumaran, S. and R. Rottapel. "Regulation of Cytokine Receptor Signaling by Socs1." *Immunol Rev* 192, (2003): 196-211.
80. Imanaka, K., S. Tamura, K. Fukui, N. Ito, S. Kiso, Y. Imai, T. Naka, T. Kishimoto, S. Kawata, Y. Shinomura and Kansai Viral Hepatitis Research Group. "Enhanced Expression of Suppressor of Cytokine Signaling-1 in the Liver of Chronic Hepatitis C: Possible Involvement in Resistance to Interferon Therapy." *J Viral Hepat* 12, no. 2 (2005): 130-8.

81. Ishikawa, H. and G. N. Barber. "Sting Is an Endoplasmic Reticulum Adaptor That Facilitates Innate Immune Signalling." *Nature* 455, no. 7213 (2008): 674-8.
82. Ishikawa, H., Z. Ma and G. N. Barber. "Sting Regulates Intracellular Dna-Mediated, Type I Interferon-Dependent Innate Immunity." *Nature* 461, no. 7265 (2009): 788-92.
83. Jacobs, B. L. and J. O. Langland. "When Two Strands Are Better Than One: The Mediators and Modulators of the Cellular Responses to Double-Stranded Rna." *Virology* 219, no. 2 (1996): 339-49.
84. Javaid, K., A. Rahman, K. N. Anwar, R. S. Frey, R. D. Minshall and A. B. Malik. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces Early-Onset Endothelial Adhesivity by Protein Kinase Czeta-Dependent Activation of Intercellular Adhesion Molecule-1." *Circ Res* 92, no. 10 (2003): 1089-97.
85. Johnson, A. J., F. Guirakhoo and J. T. Roehrig. "The Envelope Glycoproteins of Dengue 1 and Dengue 2 Viruses Grown in Mosquito Cells Differ in Their Utilization of Potential Glycosylation Sites." *Virology* 203, no. 2 (1994): 241-9.
86. Jones, M., A. Davidson, L. Hibbert, P. Gruenwald, J. Schlaak, S. Ball, G. R. Foster and M. Jacobs. "Dengue Virus Inhibits Alpha Interferon Signaling by Reducing Stat2 Expression." *J Virol* 79, no. 9 (2005): 5414-20.
87. Kallmann, B. A., V. Hummel, T. Lindenlaub, K. Ruprecht, K. V. Toyka and P. Rieckmann. "Cytokine-Induced Modulation of Cellular Adhesion to Human Cerebral Endothelial Cells Is Mediated by Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1." *Brain* 123 (Pt 4), (2000): 687-97.
88. Kamizono, S., T. Hanada, H. Yasukawa, S. Minoguchi, R. Kato, M. Minoguchi, K. Hattori, S. Hatakeyama, M. Yada, S. Morita, T. Kitamura, H. Kato, Nakayama Ki and A. Yoshimura. "The Socs Box of Socs-1 Accelerates Ubiquitin-Dependent Proteolysis of Tel-Jak2." *J Biol Chem* 276, no. 16 (2001): 12530-8.
89. Kawaguchi, T., T. Yoshida, M. Harada, T. Hisamoto, Y. Nagao, T. Ide, E. Taniguchi, H. Kumemura, S. Hanada, M. Maeyama, S. Baba, H. Koga, R. Kumashiro, T. Ueno, H. Ogata, A. Yoshimura and M. Sata. "Hepatitis C Virus Down-Regulates Insulin Receptor Substrates 1 and 2 through up-Regulation of Suppressor of Cytokine Signaling 3." *Am J Pathol* 165, no. 5 (2004): 1499-508.
90. Kawai, T. and S. Akira. "Toll-Like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity." *Immunity* 34, no. 5 (2011): 637-50.
91. Kershaw, N. J., J. M. Murphy, N. P. Liao, L. N. Varghese, A. Laktyushin, E. L. Whitlock, I. S. Lucet, N. A. Nicola and J. J. Babon. "Socs3 Binds Specific Receptor-Jak Complexes to Control Cytokine Signaling by Direct Kinase Inhibition." *Nat Struct Mol Biol* 20, no. 4 (2013): 469-76.
92. Kershaw, N. J., J. M. Murphy, I. S. Lucet, N. A. Nicola and J. J. Babon. "Regulation of Janus Kinases by Socs Proteins." *Biochem Soc Trans* 41, no. 4 (2013): 1042-7.

93. Kile, B. T., B. A. Schulman, W. S. Alexander, N. A. Nicola, H. M. Martin and D. J. Hilton. "The Socs Box: A Tale of Destruction and Degradation." *Trends Biochem Sci* 27, no. 5 (2002): 235-41.
94. Kim, K. A., W. Lin, A. W. Tai, R. X. Shao, E. Weinberg, C. B. De Sa Borges, A. K. Bhan, H. Zheng, Y. Kamegaya and R. T. Chung. "Hepatic Socs3 Expression Is Strongly Associated with Non-Response to Therapy and Race in Hcv and Hcv/Hiv Infection." *J Hepatol* 50, no. 4 (2009): 705-11.
95. Kochs, G., M. Reichelt, D. Danino, J. E. Hinshaw and O. Haller. "Assay and Functional Analysis of Dynamin-Like Mx Proteins." *Methods Enzymol* 404, (2005): 632-43.
96. Komatsu, T., K. Takeuchi, J. Yokoo, Y. Tanaka and B. Gotoh. "Sendai Virus Blocks Alpha Interferon Signaling to Signal Transducers and Activators of Transcription." *J Virol* 74, no. 5 (2000): 2477-80.
97. Kovarik, P., D. Stoiber, M. Novy and T. Decker. "Stat1 Combines Signals Derived from Ifn-Gamma and Lps Receptors During Macrophage Activation." *EMBO J* 17, no. 13 (1998): 3660-8.
98. Krebs, D. L. and D. J. Hilton. "Socs: Physiological Suppressors of Cytokine Signaling." *J Cell Sci* 113 (Pt 16), (2000): 2813-9.
99. Krebs, D. L. and D. J. Hilton. "Socs Proteins: Negative Regulators of Cytokine Signaling." *Stem Cells* 19, no. 5 (2001): 378-87.
100. Kulms, D. and T. Schwarz. "Nf-Kappab and Cytokines." *Vitam Horm* 74, (2006): 283-300.
101. Kundu, K., K. Dutta, A. Nazmi and A. Basu. "Japanese Encephalitis Virus Infection Modulates the Expression of Suppressors of Cytokine Signaling (Socs) in Macrophages: Implications for the Hosts' Innate Immune Response." *Cell Immunol* 285, no. 1-2 (2013): 100-10.
102. Kurane, I. "Dengue Hemorrhagic Fever with Special Emphasis on Immunopathogenesis." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 30, no. 5-6 (2007): 329-40.
103. LaFleur, C., J. Granados, G. Vargas-Alarcon, J. Ruiz-Morales, C. Villarreal-Garza, L. Higuera, G. Hernández-Pacheco, T. Cutiño-Moguel, H. Rangel, R. Figueroa, M. Acosta, E. Lazcano and C. Ramos. "Hla-Dr Antigen Frequencies in Mexican Patients with Dengue Virus Infection: Hla-Dr4 as a Possible Genetic Resistance Factor for Dengue Hemorrhagic Fever." *Hum Immunol* 63, no. 11 (2002): 1039-44.
104. Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, D. J. Gubler, G. J. Chang and A. V. Vorndam. "Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction." *J Clin Microbiol* 30, no. 3 (1992): 545-51.
105. Lang, R., A. L. Pauleau, E. Parganas, Y. Takahashi, J. Mages, J. N. Ihle, R. Rutschman and P. J. Murray. "Socs3 Regulates the Plasticity of Gp130 Signaling." *Nat Immunol* 4, no. 6 (2003): 546-50.
106. Laoprasopwattana, K., D. H. Libraty, T. P. Endy, A. Nisalak, S. Chunsuttiwat, F. A. Ennis, A. L. Rothman and S. Green. "Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Mediated by

- Plasma Obtained before Secondary Dengue Virus Infections: Potential Involvement in Early Control of Viral Replication." *J Infect Dis* 195, no. 8 (2007): 1108-16.
107. Laurent-Rolle, M., E. F. Boer, K. J. Lubick, J. B. Wolfenbarger, A. B. Carmody, B. Rockx, W. Liu, J. Ashour, W. L. Shupert, M. R. Holbrook, A. D. Barrett, P. W. Mason, M. E. Bloom, A. García-Sastre, A. A. Khromykh and S. M. Best. "The Ns5 Protein of the Virulent West Nile Virus Ny99 Strain Is a Potent Antagonist of Type I Interferon-Mediated Jak-Stat Signaling." *J Virol* 84, no. 7 (2010): 3503-15.
 108. Lee, I. K., C. J. Hsieh, R. F. Chen, Z. S. Yang, L. Wang, C. M. Chen, C. F. Liu, C. H. Huang, C. Y. Lin, Y. H. Chen, K. D. Yang and J. W. Liu. "Increased Production of Interleukin-4, Interleukin-10, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor by Type 2 Diabetes' Mononuclear Cells Infected with Dengue Virus, but Not Increased Intracellular Viral Multiplication." *Biomed Res Int* 2013, (2013): 965853.
 109. Lei, H. Y., T. M. Yeh, H. S. Liu, Y. S. Lin, S. H. Chen and C. C. Liu. "Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection." *J Biomed Sci* 8, no. 5 (2001): 377-88.
 110. Leitmeyer, K. C., D. W. Vaughn, D. M. Watts, R. Salas, I. Villalobos, de Chacon, C. Ramos and R. Rico-Hesse. "Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis." *J Virol* 73, no. 6 (1999): 4738-47.
 111. Leonard, G. T. and G. C. Sen. "Effects of Adenovirus E1a Protein on Interferon-Signaling." *Virology* 224, no. 1 (1996): 25-33.
 112. Levy, D. E. and A. García-Sastre. "The Virus Battles: Ifn Induction of the Antiviral State and Mechanisms of Viral Evasion." *Cytokine Growth Factor Rev* 12, no. 2-3 (2001): 143-56.
 113. Liao, J., Y. Fu and K. Shuai. "Distinct Roles of the Nh2- and CooH-Terminal Domains of the Protein Inhibitor of Activated Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat) 1 (Pias1) in Cytokine-Induced Pias1-Stat1 Interaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, no. 10 (2000): 5267-72.
 114. Libraty, D. H., P. R. Young, D. Pickering, T. P. Endy, S. Kalayanarooj, S. Green, D. W. Vaughn, A. Nisalak, F. A. Ennis and A. L. Rothman. "High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein Ns1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever." *J Infect Dis* 186, no. 8 (2002): 1165-8.
 115. Lin, C. F., S. W. Wan, H. J. Cheng, H. Y. Lei and Y. S. Lin. "Autoimmune Pathogenesis in Dengue Virus Infection." *Viral Immunol* 19, no. 2 (2006): 127-32.
 116. Lin, C. W., K. H. Lin, P. C. Lyu and W. J. Chen. "Japanese Encephalitis Virus Ns2b-Ns3 Protease Binding to Phage-Displayed Human Brain Proteins with the Domain of Trypsin Inhibitor and Basic Region Leucine Zipper." *Virus Res* 116, no. 1-2 (2006): 106-13.
 117. Liu, B., S. Mink, K. A. Wong, N. Stein, C. Getman, P. W. Dempsey, H. Wu and K. Shuai. "Pias1 Selectively Inhibits Interferon-Inducible Genes and Is Important in Innate Immunity." *Nat Immunol* 5, no. 9 (2004): 891-8.
 118. Liu, B. and K. Shuai. "Targeting the Pias1 Sumo Ligase Pathway to Control Inflammation." *Trends Pharmacol Sci* 29, no. 10 (2008): 505-9.

119. Liu, X. and C. K. Qu. "Protein Tyrosine Phosphatase Shp-2 (Ptpn11) in Hematopoiesis and Leukemogenesis." *J Signal Transduct* 2011, (2011): 195239.
120. Lobigs, M. "Flavivirus Premembrane Protein Cleavage and Spike Heterodimer Secretion Require the Function of the Viral Proteinase Ns3." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, no. 13 (1993): 6218-22.
121. Long, J., I. Matsuura, D. He, G. Wang, K. Shuai and F. Liu. "Repression of Smad Transcriptional Activity by Piasy, an Inhibitor of Activated Stat." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, no. 17 (2003): 9791-6.
122. Loo, Y. M., J. Fornek, N. Crochet, G. Bajwa, O. Perwitasari, L. Martinez-Sobrido, S. Akira, M. A. Gill, A. García-Sastre, M. G. Katze and M. Gale. "Distinct Rig-I and Mda5 Signaling by Rna Viruses in Innate Immunity." *J Virol* 82, no. 1 (2008): 335-45.
123. Loo, Y. M. and M. Gale. "Immune Signaling by Rig-I-Like Receptors." *Immunity* 34, no. 5 (2011): 680-92.
124. Lu, Y. E., T. Cassese and M. Kielian. "The Cholesterol Requirement for Sindbis Virus Entry and Exit and Characterization of a Spike Protein Region Involved in Cholesterol Dependence." *J Virol* 73, no. 5 (1999): 4272-8.
125. Mackenzie, J. M., M. K. Jones and P. R. Young. "Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein Ns1 Suggests a Role in Viral Rna Replication." *Virology* 220, no. 1 (1996): 232-40.
126. Mansfield, K. L., N. Johnson, S. L. Cosby, T. Solomon and A. R. Fooks. "Transcriptional Upregulation of Socs 1 and Suppressors of Cytokine Signaling 3 Mrna in the Absence of Suppressors of Cytokine Signaling 2 Mrna after Infection with West Nile Virus or Tick-Borne Encephalitis Virus." *Vector Borne Zoonotic Dis* 10, no. 7 (2010): 649-53.
127. Martina, B. E., P. Koraka and A. D. Osterhaus. "Dengue Virus Pathogenesis: An Integrated View." *Clin Microbiol Rev* 22, no. 4 (2009): 564-81.
128. Mazzon, M., M. Jones, A. Davidson, B. Chain and M. Jacobs. "Dengue Virus Ns5 Inhibits Interferon-Alpha Signaling by Blocking Signal Transducer and Activator of Transcription 2 Phosphorylation." *J Infect Dis* 200, no. 8 (2009): 1261-70.
129. Miller, J. L., B. J. de Wet, B. J. deWet, L. Martinez-Pomares, C. M. Radcliffe, R. A. Dwek, P. M. Rudd and S. Gordon. "The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages." *PLoS Pathog* 4, no. 2 (2008): e17.
130. Miller, S., S. Sparacio and R. Bartenschlager. "Subcellular Localization and Membrane Topology of the Dengue Virus Type 2 Non-Structural Protein 4b." *J Biol Chem* 281, no. 13 (2006): 8854-63.
131. Moorman, J., Z. P. Dong, L. Ni, C. Zhang, T. Borthwick and Z. Q. Yao. "Abnormal B-Cell Activation Associated with Tall-1 over-Expression and Socs-1 Suppression During Chronic Hepatitis C Virus Infection." *Immunology* 128, no. 2 (2009): 227-35.
132. Morrison, J., S. Aguirre and A. Fernandez-Sesma. "Innate Immunity Evasion by Dengue Virus." *Viruses* 4, no. 3 (2012): 397-413.

133. Mosmann, T. R. and S. Sad. "The Expanding Universe of T-Cell Subsets: Th1, Th2 and More." *Immunol Today* 17, no. 3 (1996): 138-46.
134. Muñoz-Jordan, J. L., G. G. Sánchez-Burgos, M. Laurent-Rolle and A. García-Sastre. "Inhibition of Interferon Signaling by Dengue Virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, no. 24 (2003): 14333-8.
135. Muñoz-Jordán, J. L., M. Laurent-Rolle, J. Ashour, L. Martínez-Sobrido, M. Ashok, W. I. Lipkin and A. García-Sastre. "Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the Ns4b Protein of Flaviviruses." *J Virol* 79, no. 13 (2005): 8004-13.
136. Narro-Robles J., y H. Gómez-Dantés H. "El dengue en México: un problema prioritario de salud pública." *Salud Publica Mex* 37. Supl 1. (1995):12-20.
137. Navarro-Sanchez, E., R. Altmeyer, A. Amara, O. Schwartz, F. Fieschi, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos and P. Desprès. "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, no. 7 (2003): 723-8.
138. Neves-Souza, P. C., E. L. Azeredo, S. M. Zagne, R. Valls-de-Souza, S. R. Reis, D. I. Cerqueira, R. M. Nogueira and C. F. Kubelka. "Inducible Nitric Oxide Synthase (Inos) Expression in Monocytes During Acute Dengue Fever in Patients and During in Vitro Infection." *BMC Infect Dis* 5, (2005): 64.
139. Newby, C. M., L. Sabin and A. Pekosz. "The Rna Binding Domain of Influenza a Virus Ns1 Protein Affects Secretion of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-6, and Interferon in Primary Murine Tracheal Epithelial Cells." *J Virol* 81, no. 17 (2007): 9469-80.
140. Nguyen, T. H., H. Y. Lei, T. L. Nguyen, Y. S. Lin, K. J. Huang, B. L. Le, C. F. Lin, T. M. Yeh, Q. H. Do, T. Q. Vu, L. C. Chen, J. H. Huang, T. M. Lam, C. C. Liu and S. B. Halstead. "Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: A Study of Clinical and Cytokine Profiles." *J Infect Dis* 189, no. 2 (2004): 221-32.
141. Nishio, M., M. Tsurudome, M. Ito, M. Kawano, H. Komada and Y. Ito. "High Resistance of Human Parainfluenza Type 2 Virus Protein-Expressing Cells to the Antiviral and Anti-Cell Proliferative Activities of Alpha/Beta Interferons: Cysteine-Rich V-Specific Domain Is Required for High Resistance to the Interferons." *J Virol* 75, no. 19 (2001): 9165-76.
142. OPS. DENGUE: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Organización Panamericana de la Salud. OMS, 2010 56pp.
143. Oshansky, C. M., T. M. Krunkosky, J. Barber, L. P. Jones and R. A. Tripp. "Respiratory Syncytial Virus Proteins Modulate Suppressors of Cytokine Signaling 1 and 3 and the Type I Interferon Response to Infection by a Toll-Like Receptor Pathway." *Viral Immunol* 22, no. 3 (2009): 147-61.
144. Parisien, J. P., J. F. Lau, J. J. Rodriguez, B. M. Sullivan, A. Moscona, G. D. Parks, R. A. Lamb and C. M. Horvath. "The V Protein of Human Parainfluenza Virus 2 Antagonizes Type I Interferon Responses by Destabilizing Signal Transducer and Activator of Transcription 2." *Virology* 283, no. 2 (2001): 230-9.

145. Patel, S. J., R. Jindal, K. R. King, A. W. Tilles and M. L. Yarmush. "The Inflammatory Response to Double Stranded Dna in Endothelial Cells Is Mediated by NF κ b and TNF α ." *PLoS One* 6, no. 5 (2011): e19910.
146. Patil, V., Y. Zhao, S. Shah, B. A. Fox, L. M. Rommereim, D. J. Bzik and G. S. Yap. "Co-Existence of Classical and Alternative Activation Programs in Macrophages Responding to Toxoplasma Gondii." *Int J Parasitol* 44, no. 2 (2014): 161-4.
147. Pauli, E. K., M. Schmolke, T. Wolff, D. Viemann, J. Roth, J. G. Bode and S. Ludwig. "Influenza a Virus Inhibits Type I Ifn Signaling Via Nf-Kappab-Dependent Induction of Socs-3 Expression." *PLoS Pathog* 4, no. 11 (2008): e1000196.
148. Persico, M., M. Capasso, E. Persico, M. Svelto, R. Russo, D. Spano, L. Crocè, V. La Mura, F. Moschella, F. Masutti, R. Torella, C. Tiribelli and A. Iolascon. "Suppressor of Cytokine Signaling 3 (Socs3) Expression and Hepatitis C Virus-Related Chronic Hepatitis: Insulin Resistance and Response to Antiviral Therapy." *Hepatology* 46, no. 4 (2007): 1009-15.
149. Persico, M., M. Capasso, R. Russo, E. Persico, L. Crocè, C. Tiribelli and A. Iolascon. "Elevated Expression and Polymorphisms of Socs3 Influence Patient Response to Antiviral Therapy in Chronic Hepatitis C." *Gut* 57, no. 4 (2008): 507-15.
150. Pethel, M., B. Falgout and C. J. Lai. "Mutational Analysis of the Octapeptide Sequence Motif at the Ns1-Ns2a Cleavage Junction of Dengue Type 4 Virus." *J Virol* 66, no. 12 (1992): 7225-31.
151. Pothlichet, J., A. Burtey, A. V. Kubarenko, G. Caignard, B. Solhonne, F. Tangy, M. Ben-Ali, L. Quintana-Murci, A. Heinzmann, J. D. Chiche, P. O. Vidalain, A. N. Weber, M. Chignard and M. Si-Tahar. "Study of Human Rig-I Polymorphisms Identifies Two Variants with an Opposite Impact on the Antiviral Immune Response." *PLoS One* 4, no. 10 (2009): e7582.
152. Pothlichet, J., M. Chignard and M. Si-Tahar. "Cutting Edge: Innate Immune Response Triggered by Influenza a Virus Is Negatively Regulated by Socs1 and Socs3 through a Rig-I/Ifnar1-Dependent Pathway." *J Immunol* 180, no. 4 (2008): 2034-8.
153. Preugschat, F. and J. H. Strauss. "Processing of Nonstructural Proteins Ns4a and Ns4b of Dengue 2 Virus in Vitro and in Vivo." *Virology* 185, no. 2 (1991): 689-97.
154. Qashqari, H., A. Al-Mars, A. Chaudhary, A. Abuzenadah, G. Damanhour, M. Alqahtani, M. Mahmoud, M. El Sayed Zaki, K. Fatima and I. Qadri. "Understanding the Molecular Mechanism(S) of Hepatitis C Virus (Hcv) Induced Interferon Resistance." *Infect Genet Evol* 19, (2013): 113-9.
155. Qu, C. K. "The Shp-2 Tyrosine Phosphatase: Signaling Mechanisms and Biological Functions." *Cell Res* 10, no. 4 (2000): 279-88.
156. Rahim, M. A. and M. S. Sikder. "Clinicopathologic Manifestations and Outcome of Dengue Fever and Dengue Haemorrhagic Fever." *Bangladesh Med Res Counc Bull* 31, no. 1 (2005): 36-45.
157. Randall, R. E. and S. Goodbourn. "Interferons and Viruses: An Interplay between Induction, Signalling, Antiviral Responses and Virus Countermeasures." *J Gen Virol* 89, no. Pt 1 (2008): 1-47.

158. Randolph V. B. and V. Stollar. "Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures." *J Gen Virol*, 7 (1990): 1845-1850.
159. Rauch, I., M. Müller and T. Decker. "The Regulation of Inflammation by Interferons and Their Stats." *JAKSTAT* 2, no. 1 (2013): e23820.
160. Rayamajhi, M., J. Humann, K. Penheiter, K. Andreasen and L. L. Lenz. "Induction of Ifn-Alpha Enables *Listeria Monocytogenes* to Suppress Macrophage Activation by Ifn-Gamma." *J Exp Med* 207, no. 2 (2010): 327-37.
161. Rico-Hesse, R., L. M. Harrison, R. A. Salas, D. Tovar, A. Nisalak, C. Ramos, J. Boshell, M. T. de Mesa, R. M. Nogueira and A. T. da Rosa. "Origins of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the Americas." *Virology* 230, no. 2 (1997): 244-51.
162. Rodriguez-Madoz, J. R., A. Belicha-Villanueva, D. Bernal-Rubio, J. Ashour, J. Ayllon and A. Fernandez-Sesma. "Inhibition of the Type I Interferon Response in Human Dendritic Cells by Dengue Virus Infection Requires a Catalytically Active Ns2b3 Complex." *J Virol* 84, no. 19 (2010): 9760-74.
163. Rodriguez-Madoz, J. R., D. Bernal-Rubio, D. Kaminski, K. Boyd and A. Fernandez-Sesma. "Dengue Virus Inhibits the Production of Type I Interferon in Primary Human Dendritic Cells." *J Virol* 84, no. 9 (2010): 4845-50.
164. Rothman, A. L. "Immunology and Immunopathogenesis of Dengue Disease." *Adv Virus Res* 60, (2003): 397-419.
165. Rothman, A. L. "Cellular Immunology of Sequential Dengue Virus Infection and Its Role in Disease Pathogenesis." *Curr Top Microbiol Immunol* 338, (2010): 83-98.
166. Salonen, A., T. Ahola and L. Kääriäinen. "Viral Rna Replication in Association with Cellular Membranes." *Curr Top Microbiol Immunol* 285, (2005): 139-73.
167. Sariol C.A., M. I. Martínez, F. Rivera, I.V. Rodríguez, P. Pantoja, K. Abel, T. Arana, L. Giavedoni, V. Hodara, L. J. White, Y.I. Angleró, L. J. Montaner, E. N. Kraiselburd. "Decreased dengue replication and an increased anti-viral humoral response with the use of combined Toll-like receptor 3 and 7/8 agonists in macaques." *PLoS One* 29, no. 6(2011): e19323.
168. Sasaki, A., H. Yasukawa, A. Suzuki, S. Kamizono, T. Syoda, I. Kinjyo, M. Sasaki, J. A. Johnston and A. Yoshimura. "Cytokine-Inducible Sh2 Protein-3 (Cis3/Socs3) Inhibits Janus Tyrosine Kinase by Binding through the N-Terminal Kinase Inhibitory Region as Well as Sh2 Domain." *Genes Cells* 4, no. 6 (1999): 339-51.
169. Samuel P. and B. Tyagi. "Diagnostic methods for detection and isolation of dengue viruses from vector mosquitoes." *Indian J Med Res* 123, (2006): 615-628.
170. Shepard D.S., L. Coudeville, Y. A. Halasa, B. Zambrano, G.H. Dayan. "Economic impact of dengue illness in the Americas." *Am J Trop Med Hyg* 8, (2011):200-207.
171. Schindler, C., K. Shuai, V. R. Prezioso and J. E. Darnell. "Interferon-Dependent Tyrosine Phosphorylation of a Latent Cytoplasmic Transcription Factor." *Science* 257, no. 5071 (1992): 809-13.

172. Schlesinger, J. J., M. W. Brandriss and E. E. Walsh. "Protection of Mice against Dengue 2 Virus Encephalitis by Immunization with the Dengue 2 Virus Non-Structural Glycoprotein Ns1." *J Gen Virol* 68 (Pt 3), (1987): 853-7.
173. Schmidt, A. C. "Response to Dengue Fever--the Good, the Bad, and the Ugly?" *N Engl J Med* 363, no. 5 (2010): 484-7.
174. Schoenborn, J. R. and C. B. Wilson. "Regulation of Interferon-Gamma During Innate and Adaptive Immune Responses." *Adv Immunol* 96, (2007): 41-101.
175. Shresta, S., K. L. Sharar, D. M. Prigozhin, H. M. Snider, P. R. Beatty and E. Harris. "Critical Roles for Both Stat1-Dependent and Stat1-Independent Pathways in the Control of Primary Dengue Virus Infection in Mice." *J Immunol* 175, no. 6 (2005): 3946-54.
176. Schroder K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, D. A. Hume. "Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions." *J Leukocyte Biol* 75, (2004):163-89.
177. Shuai, K. "The Stat Family of Proteins in Cytokine Signaling." *Prog Biophys Mol Biol* 71, no. 3-4 (1999): 405-22.
178. Shuai, K. and B. Liu. "Regulation of Gene-Activation Pathways by Pias Proteins in the Immune System." *Nat Rev Immunol* 5, no. 8 (2005): 593-605.
179. Shultz, D. B., J. D. Fuller, Y. Yang, N. Sizemore, M. R. Rani and G. R. Stark. "Activation of a Subset of Genes by Ifn-Gamma Requires Ikkbeta but Not Interferon-Dependent Activation of Nf-Kappab." *J Interferon Cytokine Res* 27, no. 10 (2007): 875-84.
180. Si-Tahar, M., L. Touqui and M. Chignard. "Innate Immunity and Inflammation--Two Facets of the Same Anti-Infectious Reaction." *Clin Exp Immunol* 156, no. 2 (2009): 194-8.
181. Sierra, B., R. Alegre, A. B. Pérez, G. García, K. Sturn-Ramirez, O. Obasanjo, E. Aguirre, M. Alvarez, R. Rodriguez-Roche, L. Valdés, P. Kanki and M. G. Guzmán. "Hla-a, -B, -C, and -Drb1 Allele Frequencies in Cuban Individuals with Antecedents of Dengue 2 Disease: Advantages of the Cuban Population for Hla Studies of Dengue Virus Infection." *Hum Immunol* 68, no. 6 (2007): 531-40.
182. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Sinave), Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad. Dirección General de Epidemiología. México, información a la semana 52 año 2013
183. Sinave/Cenavece. Panorama dengue, información de las semanas 52 de los años 2004 a 2011. Secretaria de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad. Dirección General de Epidemiología. México.
184. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Sinave), Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad. Dirección General de Epidemiología. México, 1998-2004.
185. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Sinave), Secretaría de Salud. PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE DENGUE 2014.
186. Smith, K. M., K. Nanda, C. J. Spears, M. Ribeiro, R. Vancini, A. Piper, G. S. Thomas, M. E. Thomas, D. T. Brown and R. Hernandez. "Structural Mutants of Dengue Virus 2 Transmembrane Domains Exhibit Host-Range Phenotype." *Virol J* 8, (2011): 289.

187. Stadler, K., S. L. Allison, J. Schlich and F. X. Heinz. "Proteolytic Activation of Tick-Borne Encephalitis Virus by Furin." *J Virol* 71, no. 11 (1997): 8475-81.
188. Stephens, H. A., R. Klaythong, M. Sirikong, D. W. Vaughn, S. Green, S. Kalayanarooj, T. P. Endy, D. H. Libraty, A. Nisalak, B. L. Innis, A. L. Rothman, F. A. Ennis and D. Chandanayingyong. "Hla-a and -B Allele Associations with Secondary Dengue Virus Infections Correlate with Disease Severity and the Infecting Viral Serotype in Ethnic Thais." *Tissue Antigens* 60, no. 4 (2002): 309-18.
189. Sun, W., Y. Li, L. Chen, H. Chen, F. You, X. Zhou, Y. Zhou, Z. Zhai, D. Chen and Z. Jiang. "Eris, an Endoplasmic Reticulum Ifn Stimulator, Activates Innate Immune Signaling through Dimerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, no. 21 (2009): 8653-8.
190. Symons, A., S. Beinke and S. C. Ley. "Map Kinase Kinase Kinases and Innate Immunity." *Trends Immunol* 27, no. 1 (2006): 40-8.
191. Symons, J. A., A. Alcamí and G. L. Smith. "Vaccinia Virus Encodes a Soluble Type I Interferon Receptor of Novel Structure and Broad Species Specificity." *Cell* 81, no. 4 (1995): 551-60.
192. Takeda, K. and S. Akira. "Regulation of Innate Immune Responses by Toll-Like Receptors." *Jpn J Infect Dis* 54, no. 6 (2001): 209-19.
193. Tan, S. S. and M. A. Bujang. "The clinical features and outcomes of acute liver failure associated with dengue infection in adults: a case series." *Braz J Infect Dis* 17, (2013): 164-9.
194. Tanaka, Y. and Z. J. Chen. "Sting Specifies Irf3 Phosphorylation by Tbk1 in the Cytosolic Dna Signaling Pathway." *Sci Signal* 5, no. 214 (2012): ra20.
195. Tassaneetrithep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger and M. A. Marovich. "Dc-Sign (Cd209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells." *J Exp Med* 197, no. 7 (2003): 823-9.
196. Thai, K. T., M. R. Henn, M. C. Zody, V. Tricou, N. M. Nguyet, P. Charlebois, N. J. Lennon, L. Green, P. J. de Vries, T. T. Hien, J. Farrar, H. R. van Doorn, M. D. de Jong, B. W. Birren, E. C. Holmes and C. P. Simmons. "High-Resolution Analysis of Intrahost Genetic Diversity in Dengue Virus Serotype 1 Infection Identifies Mixed Infections." *J Virol* 86, no. 2 (2012): 835-43.
197. Thomas, S. J., D. Strickman and D. W. Vaughn. "Dengue Epidemiology: Virus Epidemiology, Ecology, and Emergence." *Adv Virus Res* 61, (2003): 235-89.
198. Tsai, C. J., C. H. Kuo, P. C. Chen and C. S. Changcheng. "Upper Gastrointestinal Bleeding in Dengue Fever." *Am J Gastroenterol* 86, no. 1 (1991): 33-5.
199. Tsai, P. F. and C. Y. Ma. "Effect of a Glycoprotein from Mushroom *Hypsizygus Marmoratus* (Peck) Bigelow on Growth and Differentiation of Human Leukemic U937 Cells." *Food Chem Toxicol* 62, (2013): 782-5.
200. Tsai, Y. T., S. Y. Chang, C. N. Lee and C. L. Kao. "Human Tlr3 Recognizes Dengue Virus and Modulates Viral Replication in Vitro." *Cell Microbiol* 11, no. 4 (2009): 604-15.

201. Tun-Lin, W., T. R. Burkot and B. H. Kay. "Effects of Temperature and Larval Diet on Development Rates and Survival of the Dengue Vector *Aedes Aegypti* in North Queensland, Australia." *Med Vet Entomol* 14, no. 1 (2000): 31-7.
202. Ubol, S. and S. B. Halstead. "How Innate Immune Mechanisms Contribute to Antibody-Enhanced Viral Infections." *Clin Vaccine Immunol* 17, no. 12 (2010): 1829-35.
203. Ubol, S., W. Phuklia, S. Kalayanarooj and N. Modhiran. "Mechanisms of Immune Evasion Induced by a Complex of Dengue Virus and Preexisting Enhancing Antibodies." *J Infect Dis* 201, no. 6 (2010): 923-35.
204. Umareddy I., K. F. Tang, S. G. Vasudevan, S. Devi, M. L. Hibberd, F. Gu. "Dengue Virus regulates Type I Interferon Signalling in a Strain-dependent Manner in Human Cell lines." *J Gen Virol* 89, (2008):3052-3062.
205. Unterholzner, L. "The Interferon Response to Intracellular Dna: Why So Many Receptors?" *Immunobiology* 218, no. 11 (2013): 1312-21.
206. Unterholzner, L., S. E. Keating, M. Baran, K. A. Horan, S. B. Jensen, S. Sharma, C. M. Sirois, T. Jin, E. Latz, T. S. Xiao, K. A. Fitzgerald, S. R. Paludan and A. G. Bowie. "Ifi16 Is an Innate Immune Sensor for Intracellular Dna." *Nat Immunol* 11, no. 11 (2010): 997-1004.
207. Upton, C., K. Mossman and G. McFadden. "Encoding of a Homolog of the Ifn-Gamma Receptor by Myxoma Virus." *Science* 258, no. 5086 (1992): 1369-72.
208. Valente, G., L. Ozmen, F. Novelli, M. Geuna, G. Palestro, G. Forni and G. Garotta. "Distribution of Interferon-Gamma Receptor in Human Tissues." *Eur J Immunol* 22, no. 9 (1992): 2403-12.
209. Veals, S. A., T. Santa Maria and D. E. Levy. "Two Domains of Isgf3 Gamma That Mediate Protein-Dna and Protein-Protein Interactions During Transcription Factor Assembly Contribute to Dna-Binding Specificity." *Mol Cell Biol* 13, no. 1 (1993): 196-206.
210. Versteeg, G. A. and A. García-Sastre. "Viral Tricks to Grid-Lock the Type I Interferon System." *Curr Opin Microbiol* 13, no. 4 (2010): 508-16.
211. Vu, T. T., E. C. Holmes, V. Duong, T. Q. Nguyen, T. H. Tran, M. Quail, C. Churcher, J. Parkhill, J. Cardoso, J. Farrar, B. Wills, N. J. Lennon, B. W. Birren, P. Buchy, M. R. Henn and C. P. Simmons. "Emergence of the Asian 1 Genotype of Dengue Virus Serotype 2 in Viet Nam: In Vivo Fitness Advantage and Lineage Replacement in South-East Asia." *PLoS Negl Trop Dis* 4, no. 7 (2010): e757.
212. Wang, C. H., N. T. Chang, H. H. Wu and C. M. Ho. "Integrated Control of the Dengue Vector *Aedes Aegypti* in Liu-Chiu Village, Ping-Tung County, Taiwan." *J Am Mosq Control Assoc* 16, no. 2 (2000): 93-9.
213. Wang, S., R. He and R. Anderson. "Prm- and Cell-Binding Domains of the Dengue Virus E Protein." *J Virol* 73, no. 3 (1999): 2547-51.
214. Watson, A. A., A. A. Lebedev, B. A. Hall, A. E. Fenton-May, A. A. Vagin, W. Dejnirattisai, J. Felce, J. Mongkolsapaya, A. S. Palma, Y. Liu, T. Feizi, G. R. Screaton, G. N. Murshudov and C. A. O'Callaghan. "Structural Flexibility of the Macrophage Dengue Virus Receptor

- Clec5a: Implications for Ligand Binding and Signaling." *J Biol Chem* 286, no. 27 (2011): 24208-18.
215. Weaver, S. C. and N. Vasilakis. "Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease." *Infect Genet Evol* 9, no. 4 (2009): 523-40.
 216. Weber, S., F. Maass, M. Schuemann, E. Krause, G. Suske and U. M. Bauer. "Prmt1-Mediated Arginine Methylation of Pias1 Regulates Stat1 Signaling." *Genes Dev* 23, no. 1 (2009): 118-32.
 217. Welsch, S., S. Miller, I. Romero-Brey, A. Merz, C. K. Bleck, P. Walther, S. D. Fuller, C. Antony, J. Krijnse-Locker and R. Bartenschlager. "Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites." *Cell Host Microbe* 5, no. 4 (2009): 365-75.
 218. Werme, K., M. Wigerius and M. Johansson. "Tick-Borne Encephalitis Virus Ns5 Associates with Membrane Protein Scribble and Impairs Interferon-Stimulated Jak-Stat Signalling." *Cell Microbiol* 10, no. 3 (2008): 696-712.
 219. Westaway, E. G., M. A. Brinton, Gaidamovich SYa, M. C. Horzinek, A. Igarashi, L. Kääriäinen, D. K. Lvov, J. S. Porterfield, P. K. Russell and D. W. Trent. "Flaviviridae." *Intervirology* 24, no. 4 (1985): 183-92.
 220. WHO. Dengue and severe dengue. Fact Sheet Number 117: World Health Organization, 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
 221. World Health Organization. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva, Switzerland: WHO, 2009
 222. World Health Organization (WHO). Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020. Geneva: WHO Press; 2012
 223. Williams, B. R. "Pkr; a Sentinel Kinase for Cellular Stress." *Oncogene* 18, no. 45 (1999): 6112-20.
 224. Winkler, G., S. E. Maxwell, C. Ruemmler and V. Stollar. "Newly Synthesized Dengue-2 Virus Nonstructural Protein Ns1 Is a Soluble Protein but Becomes Partially Hydrophobic and Membrane-Associated after Dimerization." *Virology* 171, no. 1 (1989): 302-5.
 225. Wormald, S. and D. J. Hilton. "Inhibitors of Cytokine Signal Transduction." *J Biol Chem* 279, no. 2 (2004): 821-4.
 226. Xagorari, A. and K. Chlichlia. "Toll-Like Receptors and Viruses: Induction of Innate Antiviral Immune Responses." *Open Microbiol J* 2, (2008): 49-59.
 227. Xiao, H., M. J. Killip, P. Staeheli, R. E. Randall and D. Jackson. "The Human Interferon-Induced Mxa Protein Inhibits Early Stages of Influenza a Virus Infection by Retaining the Incoming Viral Genome in the Cytoplasm." *J Virol* 87, no. 23 (2013): 13053-8.
 228. Yamshchikov, V. F. and R. W. Compans. "Regulation of the Late Events in Flavivirus Protein Processing and Maturation." *Virology* 192, no. 1 (1993): 38-51.

229. Yasukawa, H., H. Misawa, H. Sakamoto, M. Masuhara, A. Sasaki, T. Wakioka, S. Ohtsuka, T. Imaizumi, T. Matsuda, J. N. Ihle and A. Yoshimura. "The Jak-Binding Protein Jab Inhibits Janus Tyrosine Kinase Activity through Binding in the Activation Loop." *EMBO J* 18, no. 5 (1999): 1309-20.
230. Yasukawa, H., T. Yajima, H. Duplain, M. Iwatate, M. Kido, M. Hoshijima, M. D. Weitzman, T. Nakamura, S. Woodard, D. Xiong, A. Yoshimura, K. R. Chien and K. U. Knowlton. "The Suppressor of Cytokine Signaling-1 (Socs1) Is a Novel Therapeutic Target for Enterovirus-Induced Cardiac Injury." *J Clin Invest* 111, no. 4 (2003): 469-78.
231. Yeung, M. C., D. L. Chang, R. E. Camantigue and A. S. Lau. "Inhibitory Role of the Host Apoptogenic Gene Pkr in the Establishment of Persistent Infection by Encephalomyocarditis Virus in U937 Cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, no. 21 (1999): 11860-5.
232. Yokota, S., N. Yokosawa, T. Okabayashi, T. Suzutani, S. Miura, K. Jimbow and N. Fujii. "Induction of Suppressor of Cytokine Signaling-3 by Herpes Simplex Virus Type 1 Contributes to Inhibition of the Interferon Signaling Pathway." *J Virol* 78, no. 12 (2004): 6282-6.
233. Yoshimura, A., T. Naka and M. Kubo. "Socs Proteins, Cytokine Signalling and Immune Regulation." *Nat Rev Immunol* 7, no. 6 (2007): 454-65.
234. Zhang, J. G., D. Metcalf, S. Rakar, M. Asimakis, C. J. Greenhalgh, T. A. Willson, R. Starr, S. E. Nicholson, W. Carter, W. S. Alexander, D. J. Hilton and N. A. Nicola. "The Socs Box of Suppressor of Cytokine Signaling-1 Is Important for Inhibition of Cytokine Action in Vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, no. 23 (2001): 13261-5.
235. Zhang, W., P. R. Chipman, J. Corver, P. R. Johnson, Y. Zhang, S. Mukhopadhyay, T. S. Baker, J. H. Strauss, M. G. Rossmann and R. J. Kuhn. "Visualization of Membrane Protein Domains by Cryo-Electron Microscopy of Dengue Virus." *Nat Struct Biol* 10, no. 11 (2003): 907-12.
236. Zhang, Y., J. Corver, P. R. Chipman, W. Zhang, S. V. Pletnev, D. Sedlak, T. S. Baker, J. H. Strauss, R. J. Kuhn and M. G. Rossmann. "Structures of Immature Flavivirus Particles." *EMBO J* 22, no. 11 (2003): 2604-13.
237. Zhao, D. C., T. Yan, L. Li, S. You, C. Zhang. "Respiratory syncytial virus inhibits interferon-alpha-inducible signaling in macrophage-like U937 cells." *J Infect* 54, no 4 (2007): 393-398.
238. Zhong, B., Y. Yang, S. Li, Y. Y. Wang, Y. Li, F. Diao, C. Lei, X. He, L. Zhang, P. Tien and H. B. Shu. "The Adaptor Protein Mita Links Virus-Sensing Receptors to Irf3 Transcription Factor Activation." *Immunity* 29, no. 4 (2008): 538-50.
239. Zhou, A., J. Paranjape, T. L. Brown, H. Nie, S. Naik, B. Dong, A. Chang, B. Trapp, R. Fairchild, C. Colmenares and R. H. Silverman. "Interferon Action and Apoptosis Are Defective in Mice Devoid of 2', 5'-Oligoadenylate-Dependent RNase L." *EMBO J* 16, no. 21 (1997): 6355-63.

12 ANEXOS

12.1 ANEXO 1 Gráficas densitometría STATs.

Se muestran las gráficas del incremento relativo obtenido por densitometría, de la inmunodetección mostrada en la figura 12, obtenidos mediante el ensayo de western blot, de las proteínas STAT1 y STAT2 total y su forma fosforilada (STAT1p y STAT2p) a diferentes tiempos p.i., en los distintos tratamientos a los que fueron sometidos las células **A.** Células tratadas con IFN- α (IFN), **B.** Células infectadas con el virus de dengue (DENV) y **C.** Células infectadas después de un pretratamiento con IFN- α (IFN+DEVN) y **D.** Células tratadas con el virus inactivado con luz UV (DUV).

