



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



**ESTUDIO DE LA TRANSLOCACIÓN DE LA
PROTEÍNA STAT 1 Y SUS INTERACCIONES
MOLECULARES DURANTE LA INFECCIÓN
CON EL VIRUS DE DENGUE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

Q.F.B. ANENSKI GUADALUPE GARCÍA RAMÍREZ

ASESORES DE TESIS:

D.C. JULIO ROBERTO REYES LEYVA

D.C. ALBERTO RAMÍREZ MATA

PUEBLA, PUE.

ENERO, 2017



BUAP

Puebla, Pue. a 23 de enero 2017.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Anenski Guadalupe García Ramírez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Estudio de la translocación de la proteína STAT1 y sus interacciones moleculares durante la infección con el virus de dengue"

A nuestro juicio, la alumna **Anenski Guadalupe García Ramírez** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.

"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia

D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona

D.C. Patricia Lozano Zarain



D.C. Verónica Vallejo Ruiz

Agradecimientos Institucionales.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) del Instituto Mexicano del Seguro Social, en Metepec Atlixco, Puebla y en el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en Puebla, Pue; bajo la dirección del D. en C. Julio Roberto Reyes Leyva y del D. en C. Alberto Ramírez Mata.

La realización de esta Tesis fue posible gracias a la beca para estudios de posgrado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro 209881; y el Programa de Formación de Recursos Humanos para la Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social, número de matrícula 98228623.

El autor de este trabajo y sus asesores agradecen el apoyo para Infraestructura otorgado al CIBIOR por el Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (CTFIS/IORD/012/2011), que hizo posible la adquisición de equipos utilizados en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

- A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por darme la gran oportunidad de crecer profesionalmente.
- Al Centro de Investigación Biomédica de Oriente, por permitirme iniciar mis pasos en la investigación.
- A mi asesor el Dr. Julio Reyes Leyva por abrirme las puertas del laboratorio de Virología del CIBIOR, por confiar en mí y por darme la gran oportunidad de formar parte de uno de sus proyectos de investigación. También le agradezco por dedicar tiempo a mi formación en el ámbito de la investigación, porque sin sus correcciones, experiencias y consejos no hubiera sido posible la elaboración de esta tesis.
- A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Alberto, la Dra Sandra y la Dra. Rosy, a quienes agradezco su apoyo y sus valiosas sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.
- A mis profesores de la maestría, por los conocimientos que me transmitieron a lo largo de estos dos años.
- A los doctores que forman parte del Centro de Investigación Biomédica de Oriente principalmente a las doctoras Verónica, Paola, Paulina, Maricruz y al doctor Gerardo por brindarme su apoyo, enseñanzas y colaboración.
- A mis compañeros de laboratorio y mi segunda familia Carolina, Luis, Kaleb, William y Verónica quienes me han visto crecer a lo largo de este tiempo. Gracias

por ayudarme y compartir conmigo parte de sus conocimientos y sobre todo su gran amistad.

- En especial, me gustaría agradecer a mi hermosa familia, a quienes dedico este logro.
- Gracias a mis queridos padres que me han brindado siempre su apoyo incondicional en cada decisión tomada a lo largo de mi vida. Por darme la oportunidad de tener una buena educación y por ser un gran ejemplo de vida.
- A mis hermanas Halenia, Karina, Limari y Itzumi quienes han sido mis grandes maestras para anhelar la superación cada día y por ser mis principales cimientos en la vida profesional al igual que mi madre.
- A mis sobrinos Edwin, Helian, Italia, Humberto, Dayana, Sofía, Ían y Agustín quienes me inspiran a superarme para ser parte de un ejemplo a seguir.
- A mi tía Lupe y a mis primas Ana y Mitzi por su apoyo moral y comprensión.
- A Felipe por ser una parte muy importante de mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, sobre todo por su paciencia y amor incondicional.
- A mi futura bebe Jasione por haberme permitido concluir esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1	RESUMEN	10
2	INTRODUCCIÓN	11
2.1	Antecedentes generales	11
2.1.1	Enfermedad.....	11
2.1.2	Epidemiología.....	13
2.1.3	Agente causal.....	14
2.1.3.1	<i>Proteínas estructurales</i>	16
2.1.3.2	<i>Proteínas no estructurales</i>	16
2.1.4	Ciclo replicativo del virus Dengue	18
2.1.4.1	<i>Unión y entrada</i>	18
2.1.4.2	<i>Síntesis proteica</i>	19
2.1.4.3	<i>Replicación</i>	20
2.1.4.4	<i>Ensamble y liberación</i>	20
2.1.5	Respuesta inmune innata	22
2.1.5.1	<i>Cascada de señalización JAK-STAT</i>	23
2.1.5.2	<i>Activación</i>	27
2.1.5.3	<i>Regulación</i>	28
2.2	Antecedentes particulares	29
2.2.1	Evasión de la respuesta inmune por el DENV.....	29
3	JUSTIFICACIÓN	32
4	HIPOTESIS	33
5	OBJETIVO GENERAL	33
5.1	Objetivos específicos	33
6	MATERIAL Y MÉTODOS	34

6.1	Cultivos celulares.....	34
6.2	Diferenciación de macrófagos	35
6.3	Replicación viral	35
6.4	Titulación viral.....	36
6.5	Infección de monocitos U-937 y U-937-DC.....	37
6.6	Tratamiento con Interferón- α	38
6.7	Preparación de extractos celulares	38
6.7.1	Extracción de la fracción citosólica:	38
6.7.2	Extracción de la fracción nuclear:.....	39
6.8	Cuantificación de proteínas.....	39
6.9	Inmunoprecipitación	39
6.10	Western blot.....	40
6.10.1	<i>Electroforesis de proteínas</i>	40
6.10.2	<i>Electrotransferencia de proteínas</i>	41
6.10.3	<i>Inmunodetección</i>	41
6.11	Inmunofluorescencia.....	41
7	RESULTADOS.....	45
8	CONCLUSIONES.....	68
9	PERSPECTIVAS	69
10	BIBLIOGRAFIA	70
11	ANEXOS	78

ABREVIATURAS

ADE	Respuesta exacerbada dependiente de anticuerpos
DENV	Virus del dengue
FD	Fiebre por Dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica por Dengue.
GAG	Glicosaminoglicanos
GAS	Secuencia activada por interferón gamma
HPSE	Heparanasa
HS	Heparán sulfato
HSP	Proteína de choque térmico
IFI	Proteína inducible por interferón
IFITM	Proteína transmembranal inducida por interferón
IFN	Interferón
IFNAR1	Receptor de interferón alfa 1
IFNAR2	Receptor de interferón alfa 2
IRF	Factor de respuesta a IFN
ISG	Genes estimulados por Interferón
IRES	Elementos de respuesta estimulados por interferón
JAK	Janus cinasa
MDA	Gen de diferenciación asociado a melanoma
MoDC	Células dendríticas derivadas de monocitos
MOI	Multiplicidad de infección
NK	Células asesinas naturales

NS	Proteína no estructural
NSL	Señal de localización nuclear
OMS	Organización Mundial de Salud
pDC	Células dendríticas plasmocitoides
PIAS	Proteínas inhibidoras de STAT activados
PKR	Cinasa activada por ácido ribonucleico de doble cadena
PMA	Forbol, 12 miristato,13-acetato
PTP	Tirosin fosfatasa
RIG	Gen inducible por ácido retinoico
SCD	Síndrome de choque por dengue
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SOCS	Supresor de la señalización de citocinas
STAT	Proteína transductora de señales y activadora de la transcripción
UTR	Región no traducidas

1 RESUMEN

El virus de dengue ha desarrollado mecanismos con el fin de evadir la respuesta inmune mediante la inhibición de la vía de señalización JAK-STAT, que es inducida por el interferón y que activa la transcripción y expresión de cientos de genes de respuesta antiviral.

Diversos estudios han demostrado que durante la infección con el virus de dengue, los componentes de esta vía son afectados por proteínas virales como NS2A, NS4A, NS4B y NS5, que activan la degradación de las proteínas STAT a fin de favorecer la replicación viral. Nuestro grupo identificó la disminución del importe nuclear de p-STAT1 en macrófagos U-937 infectados con DENV-2. Para investigar si este fenómeno ocurría de forma similar en macrófagos U-937- DC-SIGN que son más susceptibles a la infección, en este trabajo se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta a través de los cuales se demostró que el importe nuclear de p-STAT1 durante la infección con el DENV-2 se ve afectado pero no es totalmente detenido. Sin embargo, tras ensayos de *Western blot* se comprobó la disminución de la expresión de STAT1 y STAT2 en el citoplasma y núcleo celular, apreciándose la completa desaparición de STAT2. Por otro lado, se investigó la posible interacción de proteínas celulares (SOCS1 y SOCS3) y proteínas virales (NS4B y NS5) con p-STAT1 durante la infección. Aunque no son concluyentes, nuestros resultados muestran la presencia de SOCS3 y la proteína viral NS4B en el complejo molecular inmunoprecipitado por anticuerpos contra p-STAT1.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes generales

2.1.1 Enfermedad

El dengue es una enfermedad febril aguda de origen viral que se transmite a los humanos por la picadura de mosquitos de las especies *Aedes aegypti* y *A. albopictus* (Yung *et al.*, 2015; Carrington y Simmons, 2014). El dengue es causado por virus de la familia Flaviviridae y género Flavivirus; se conocen cuatro serotipos de dengue virus (DENV) denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (Yung *et al.*, 2015).

El dengue se presenta de forma asintomática en la mayoría de los casos, o puede dar lugar a un amplio cuadro de síntomas clínicos, que van desde la fiebre por dengue (FD) hasta la fiebre hemorrágica por dengue (FHD).

La FD es una enfermedad debilitante caracterizada por la aparición repentina de fiebre acompañada de cefalea frontal, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias, erupciones cutáneas y exantema (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005). Mientras que la FHD, se manifiesta mediante dolores intensos, fiebre alta, hepatomegalia y un aumento en la permeabilidad vascular acompañada por el incremento del hematocrito, que conlleva a la pérdida de plasma, hemorragias pleurales y gastrointestinales. Estas alteraciones pueden provocar algunas veces el síndrome de choque por dengue (SCD), que es la causa principal de la muerte de los pacientes que no logran controlar la infección (Perera y Kuhn, 2008). De acuerdo con recomendaciones de la OMS la nomenclatura que debe utilizarse para la descripción de la enfermedad es dengue para la FD y dengue grave para la FHD y el SCD.

Los mecanismos y factores que contribuyen al progreso del dengue grave aún no son muy claros. En este sentido se han planteado diversas teorías que tratan de explicar la incidencia de las formas graves de la enfermedad, entre ellas se conoce:

- 1) La teoría de Halstead y Simasthien propuesta en 1970, en la cual se plantea que los individuos que cursan con una infección secundaria debida a un serotipo de DENV distinto al de la primera infección, desarrollan un incremento en la infección dependiente de anticuerpos (fenómeno conocido por sus siglas en inglés, ADE), debido a que los anticuerpos no neutralizantes pre-existentes opsonizan el virus y favorecen su entrada a los monocitos y macrófagos lo que induce cambios en la síntesis y liberación de citocinas y mediadores vasoactivos, resultando en el aumento de la permeabilidad vascular que es característica de la FHD (Halstead y Simasthien, 1970).

- 2) La teoría de Rosen planteada en 1977, la cual expone que hay serotipos de virus muy agresivos, cuya virulencia se potencia en los pases sucesivos del mosquito al humano, ocasionando la FHD o el SCD (Rosen, 1986).

- 3) La teoría integral de Kouri propuesta en 1987, en la que se incluyen factores de riesgo individuales relacionados con la existencia de anticuerpos contra el DENV, la edad, el sexo, la raza y las enfermedades crónicas como el asma y la diabetes; factores de riesgo epidemiológico relacionados con el vector, el intervalo entre ambas infecciones, la amplia circulación viral y factores relacionados con el serotipo y la virulencia del agente (Kouri *et al.*, 1987).

2.1.2 Epidemiología

En las últimas tres décadas el dengue ha resurgido en el mundo como una de las más importantes arbovirosis que afectan al humano. La OMS estima que se producen 390 millones de casos de dengue cada año, de los cuales 96 millones (I.C. 95% 67-136 millones) se manifiestan clínicamente (OMS, 2016).

Existen más de 128 países afectados por esta enfermedad en las zonas tropicales y subtropicales alrededor del mundo; pero las regiones más afectadas son las Américas, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. Tan sólo en estas zonas, se registraron más de 1,2 millones de casos en 2008, los que ascendieron a más de 3,2 millones de casos en 2015. Ese año, se notificaron 2,35 millones de casos en la región de las Américas, de los cuales más de 10,200 casos fueron diagnosticados como dengue grave y provocaron 1,181 defunciones. En América Latina los países más afectados son Costa Rica, Honduras y México (OMS, 2016).

En México, en los últimos siete años el SINAVE registró un total de 1'059,530 casos probables de dengue y 239,260 casos de dengue confirmados; de estos últimos 171,460 casos se diagnosticaron como FD y 67,800 como FHD, presentándose un total de 623 defunciones (**Tabla I**). Dentro de los estados afectados en la República Mexicana por esta enfermedad encontramos a: Veracruz, Sonora, Jalisco, Guerrero, Michoacán, Baja California Sur, Sinaloa, Oaxaca, Tabasco, Tamaulipas, Nuevo León, Campeche, Chiapas, Morelos, Quintana Roo, Yucatán, Colima, Coahuila, Hidalgo, Puebla, San Luis Potosí, Nayarit, Guanajuato, Querétaro, Edo. de México, Chihuahua, Durango y Zacatecas; dando un total de 28 estados afectados; lo que indica que la mayoría del territorio nacional presenta las condiciones ecológicas apropiadas para la proliferación de los mosquitos, la

transmisión de esta enfermedad y la circulación de los diversos serotipos de DENV (SINAVE, 2016).

Tabla I. Número de casos de probables y confirmados de Dengue reportados por el SINAVE del año 2010 al año 2016

Año	No. Casos probables de Dengue	FD	FHD	Defunciones	No. de casos confirmados de FD y FHD
2010	121,499	23,608	6,548	62	30,156
2011	69,918	10,970	4,608	50	15,578
2012	165,749	33,408	18,720	170	52,128
2013	231,498	44,162	19,822	192	63,984
2014	124,505	23,760	8,856	76	32,616
2015	217,348	21,552	5,626	42	27,178
2016	129,013	14,000	3,620	31	17,620
Total	1,059,530	319,312	67,800	623	387,112

FD, fiebre por dengue; FHD, fiebre hemorrágica por dengue.

2.1.3 Agente causal

El virus del dengue está formado por partículas esféricas uniformes de aproximadamente 50-60 nm de diámetro, compuestas por una bicapa lipídica de 10 nm de espesor, proveniente de la membrana de las células del hospedero, en donde se encuentran insertadas la proteína de membrana (M) que se obtiene al madurar la partícula viral, a partir del precursor prM y la proteína de envoltura (E) responsable de la unión y entrada del virus a las células. En el interior del virión se observa una nucleocápside icosaédrica de 30

nm de diámetro, formada por la proteína de cubierta o Core (C) que protege el genoma viral (Perera y Kuhn, 2008).

El genoma viral está compuesto de una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva, con una longitud aproximada de 10.7 kb. El extremo 5' tiene una caperuza tipo 1 (m7GpppAmp) y carece de la cola poli(A) en el extremo 3'. En ambos extremos del genoma se encuentran regiones no traducidas (UTR), las cuales son necesarias para los procesos de replicación, transcripción y traducción del virus (Álvarez *et al.*, 2005; Guzmán y Harris, 2015). También, contiene un solo marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína que es procesada proteolíticamente para dar origen a tres proteínas estructurales que forman el virión (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) implicadas en la replicación del virus (**Figura 1**) (Lindenbach y Rice, 2003).

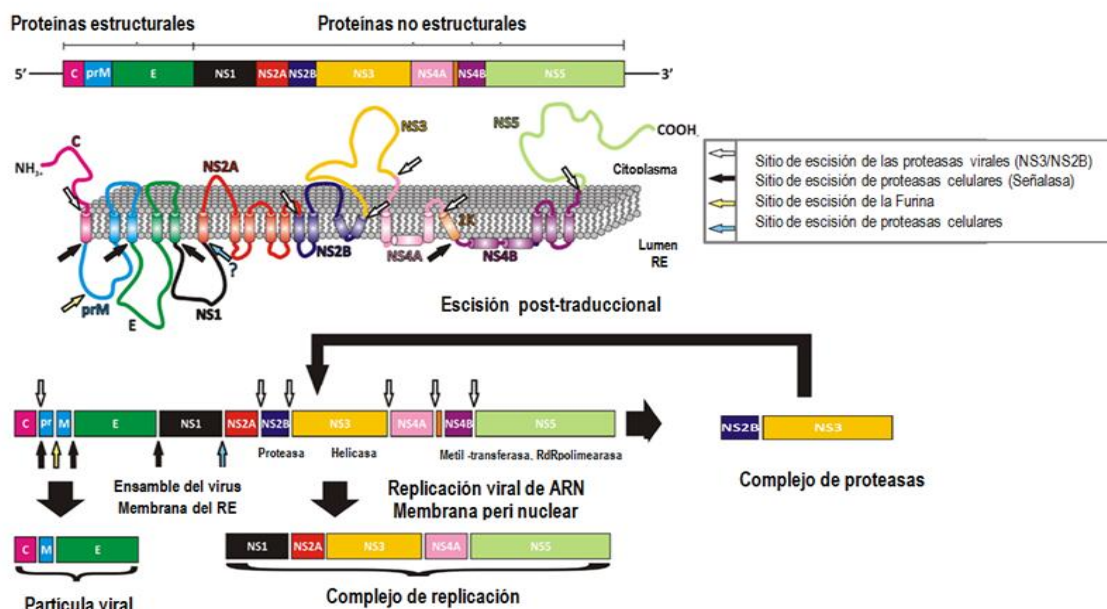


Figura 1. Organización del genoma de virus de dengue y de las proteínas estructurales y no estructurales dentro de la poliproteína. Las flechas pequeñas muestran los sitios de corte por proteasas celulares y virales. Las flechas grandes negras muestran diferentes

complejos que surgen en diferentes compartimientos celulares durante y después del procesamiento de la poliproteína (Modificado de Assenberg *et al.*, 2009).

2.1.3.1 Proteínas estructurales

La proteína C, es la primera proteína viral sintetizada, posee un peso molecular de 13.5 kDa. Es rica en residuos de lisina y arginina que le dan un alto carácter básico, que permite su interacción con el ARN viral, para formar la nucleocápside.

El precursor de la proteína de membrana (prM) tiene un peso molecular de 22 kDa, y es la isoforma glicosilada de la proteína M que tiene un peso molecular de 8 kDa, y se localiza en la cara extracelular de la membrana de viriones maduros.

La proteína E es una glicoproteína con un peso molecular entre 51-60 kDa, es la principal proteína de la envoltura y la más conservada. Se presenta como un homodímero en la superficie del virión maduro e intracelularmente se puede encontrar como un heterodímero junto a la proteína prM formando el complejo prM/M-E. Sus dominios están involucrados en la unión a los receptores celulares (Modis *et al.*, 2004; Mukopadhyay *et al.*, 2005; Velandia y Castellanos, 2011).

2.1.3.2 Proteínas no estructurales

Dentro de las proteínas no estructurales encontramos a:

la glicoproteína NS1, de 48 kDa, se sintetiza y se modifica en el retículo endoplásmico rugoso, para ser transportada al aparato de Golgi donde completa su glicosilación. Esta proteína puede tener localización intracelular, expresarse en la membrana plasmática o ser secretada por la célula. También puede intervenir en el ensamble y la maduración del virión facilitando la conformación apropiada de la proteína E.

La proteína NS2 se divide proteolíticamente en dos componentes independientes NS2A y NS2B. Ambas tienen carácter hidrofóbico, tienen pesos moleculares de 20 y 14.5 kDa, respectivamente. La proteína NS2A se localiza en los sitios de replicación del genoma viral, donde participa en el reclutamiento del ARN que será copiado por la replicasa que se encuentra unida a la membrana. También ayuda al procesamiento proteolítico del extremo C-terminal de NS1. Mientras que la proteína NS2B se encuentra asociada a la membrana, y actúa como cofactor en el complejo NS2B-NS3 que es responsable, junto con la peptidasa señal de las células hospederas, del procesamiento de las uniones entre las proteínas no estructurales NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5; así como de mediar la ruptura proteolítica del precursor E-prM-C.

La proteína NS3 posee un peso molecular de 70 kDa, es una proteína hidrofóbica trifuncional con actividad de serin proteasa (sobre la poliproteína viral), helicasa y trifosfatasa de ARN, esta última responsable de la formación de la estructura 5'capping. Es una de las proteínas más conservadas de los Flavivirus.

La proteína NS4 es modificada postraduccionalmente dando origen a NS4A y NS4B. Ambas proteínas son hidrofóbicas y presentan pesos moleculares de 16 y 27 kDa, respectivamente. NS4A participa en la replicación del ARN, quizás anclando componentes de la replicasa a la membrana celular. Mientras que NS4B puede encontrarse en los sitios de replicación del ARN. Se sabe que la proteína NS4B interfiere con la respuesta mediada por IFN en células infectadas. También parece estar relacionada con la inducción de mediadores inmunes, tales como IL6, IL-8, IP-10, TNF- α e IFN- γ . Todo esto la hace un blanco terapéutico para inhibir la infección por el virus del dengue.

La proteína NS5 presenta un peso molecular de 103 a 105 kDa y se encuentra altamente conservada en todos los Flavivirus, al igual que la proteína NS3. Se caracteriza por ser una

proteína básica, posee un dominio C-terminal con actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN y un dominio N-terminal con actividad de metiltransferasa (Lescar y Lok, 2014; Perera y Kuhn, 2008; Velandia y Castellanos, 2011; Yabar, 2003).

2.1.4 Ciclo replicativo del virus Dengue

2.1.4.1 Unión y entrada

Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* en modelos animales y en humanos han demostrado que el DENV puede infectar a diversos tipos celulares; entre ellas se encuentran las células dendríticas, monocitos, macrófagos, linfocitos B y T, células endoteliales, hepatocitos y células neuronales (Anderson, 2003).

El primer paso del ciclo replicativo comienza con la interacción de la glicoproteína E del virus con los receptores presentes en la membrana plasmática de la célula hospedera (**Figura 2, etapa 2**), esto favorece el ingreso del virus mediante endocitosis, seguido del desnudamiento y liberación del genoma viral en el citoplasma.

Entre los probables receptores celulares que se han caracterizado se encuentran los glicosaminoglicanos (GAG), como el heparán sulfato (HS) que forma parte de la matriz extracelular de células hepáticas Hep-G2 y HUH-7, y que tienen gran afinidad por la glicoproteína E del virus. Diversas proteínas celulares que están relacionadas con el estrés como la chaperonina o proteína reguladora de glucosa de 78kDa (GRP78 o Bip) y el complejo receptor de proteínas de choque térmico de 70 y 90 kDa (HSP70/90) presentes en la superficie celular de células del hígado, monocitos y macrófagos. Del mismo modo, se han identificado a los receptores de manosa y la proteína asociada al antígeno de diferenciación mieloide CD14 como posibles receptores virales en monocitos y macrófagos; y a los componentes del receptor de laminina de 37 y 67 kDa presente en

células hepáticas. Otras proteínas identificadas como receptores virales son la lectina de unión a ICAM-3 (CD-50) y las proteínas de membrana de 26, 45, 67 y 87 kDa presentes en macrófagos humanos. Tiene una importancia particular como receptor viral la molécula CD209, también llamada DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3 (ICAM3)-Grabbing Non-integrin), que está presente en las células dendríticas humanas; y que incrementa notablemente la susceptibilidad a la infección por el DENV cuando es transfectada en células poco susceptibles. Todas estas proteínas de membrana poseen un dominio extracelular de lectina tipo C que une carbohidratos con alto contenido de manosa, los cuales son abundantes en la superficie del virus de dengue (Cruz-Oliveira *et al.*, 2015; Del Ángel, 2006).

La entrada del virus también puede ocurrir por la formación de complejos inmunes con anticuerpos no neutralizantes, que son reconocidos por receptores Fc en células susceptibles a la infección como macrófagos (**Figura 2, etapa 2**) (Myint *et al.*, 1991; Screaton *et al.*, 2015).

Una vez que el virus entra a la célula queda dentro de una vesícula endocítica (**Figura 2, etapa 3**) que se transforma en endosoma temprano y posteriormente en endosoma tardío. Este se fusiona con un lisosoma que acidifica el pH de la vesícula, lo que produce una fusión entre la envoltura viral y la membrana de la vesícula liberando la nucleocápside y el material genético al citoplasma (**Figura 2, etapa 4**) (Velandia y Castellanos, 2011; Screaton *et al.*, 2015).

2.1.4.2 Síntesis proteica

La poliproteína viral es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso y es acompañada por las proteínas chaperonas BiP, calnexina y calreticulina para ser organizada en la membrana

del retículo endoplásmico, donde es procesada por proteasas celulares como la furina y signalina o proteasas virales como NS2B/NS3 que liberan a todas las proteínas virales para ser modificadas después de la traducción (**Figura 2, etapa 5**) (Limjindaporn *et al.*, 2009; Velandia y Castellanos, 2011; Sreaton *et al.*, 2015).

2.1.4.3 Replicación

La actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN es realizada por la proteína viral NS5, que replica el genoma produciendo moléculas de ARN complementarias de polaridad negativa, que actúan como molde para la síntesis de nuevas cadenas de ARN de polaridad positiva (**Figura 2, etapa 6**) (Diamond, 2003; Sreaton *et al.*, 2015).

2.1.4.4 Ensamble y liberación

Las nuevas cadenas de ARN viral son encapsuladas por la proteína C y luego las proteínas prM/M y E se asocian a esta estructura para formar su envoltura en el lumen del retículo endoplásmico (**Figura 2, etapa 7-8**). Posteriormente, se lleva a cabo la maduración del virión mediante dos etapas: en la primera etapa se organizan en forma de heterodímeros las proteínas prM/M y E, después prM/M recubre a la proteína E dando un aspecto rugoso a la superficie de la partícula inmadura, la cual es transportada desde el retículo endoplásmico hasta las regiones *cis* y *trans* del aparato de Golgi donde se lleva a cabo la segunda etapa de maduración, que consiste en la producción de cambios conformacionales y de rotación de la proteína E para generar homotrímeros antiparalelos que le dan un aspecto liso a la superficie del virión. Después se lleva a cabo un proceso proteolítico causado por la furina sobre la proteína prM/M para separar el péptido precursor de la proteína M, proceso que estabiliza los homotrímeros de la proteína E y mantiene unido al péptido pr (**Figura 2,**

etapa 9), el cual se desprende debido al pH neutro cuando el virus es liberado de la célula por exocitosis al espacio extracelular y la proteína E adquiere su conformación final para ser reconocida por los receptores de la célula hospedera (**Figura 2, etapa 1**) (Velandia y Castellanos, 2011; Screatton *et al.*, 2015).

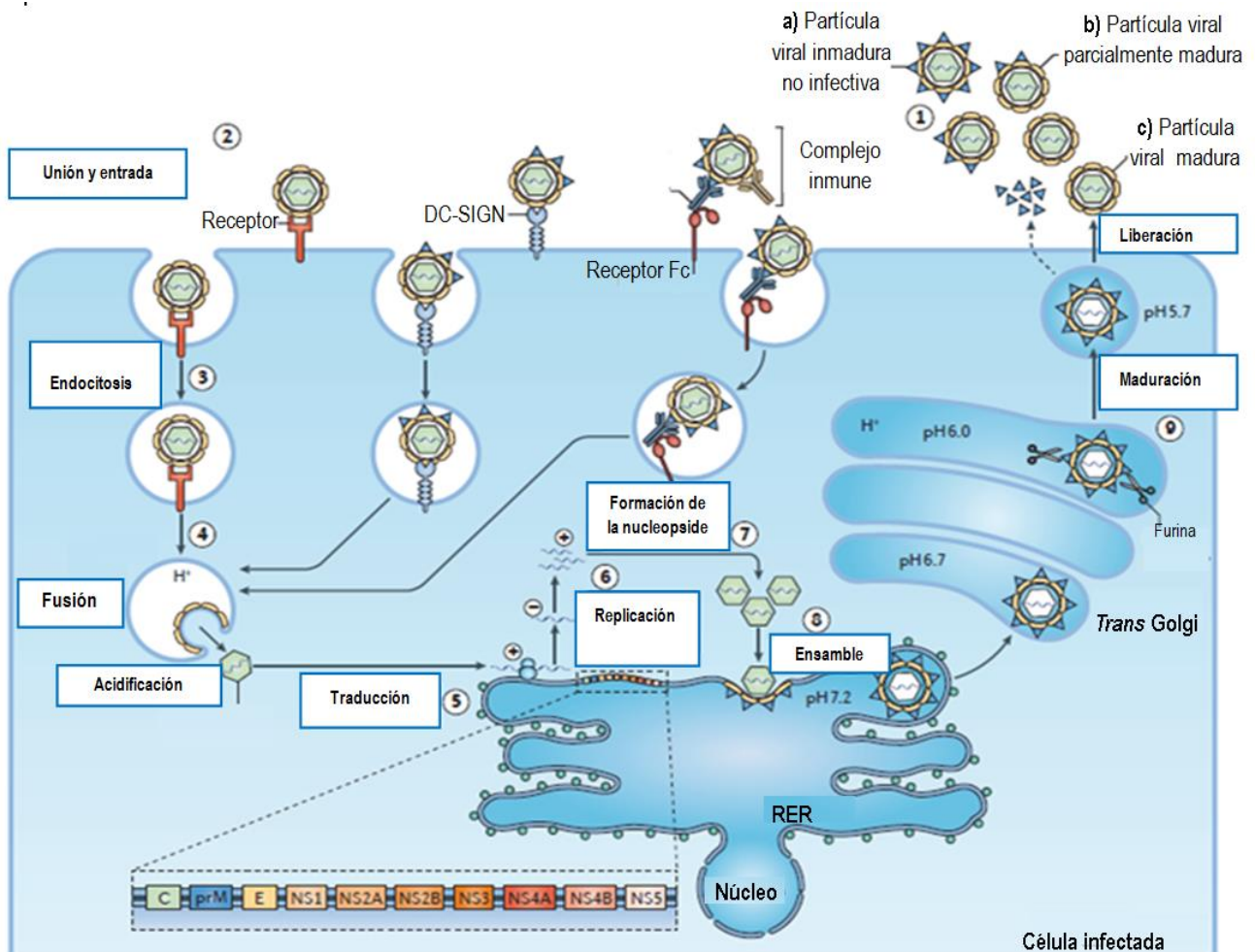


Figura 2. Ciclo replicativo del virus de dengue. El virus de dengue puede presentar tres tipos de partículas: **a)** partículas inmaduras que presentan a la proteína prM unida a la membrana y no son infecciosas, **b)** partículas parcialmente maduras o formas intermedias en las que la proteína prM forman parte de la membrana y se consideran infecciosas, **c)** partículas maduras en donde la proteína M se ha escindido completamente del péptido precursor y son consideradas infecciosas (Modificado de Screatton *et al.*, 2015).

2.1.5 Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del hospedero tras la infección con el virus de dengue. Uno de sus principales componentes es el interferón de tipo I que incluye a IFN- α e IFN- β , los cuales son capaces de controlar la replicación viral. Los interferones α y β se producen en respuesta directa a la infección viral en los leucocitos, las células dendríticas y los fibroblastos (Platanias, 2005). Mientras que el IFN- γ o de tipo II, se sintetiza en respuesta al reconocimiento de las células infectadas por linfocitos T activados y células NK (Goodbourn *et al.*, 2000).

La respuesta innata se induce en etapas tempranas de la infección en respuesta al reconocimiento de componentes estructurales de los microorganismos patógenos, que se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs), este proceso es realizado por un grupo muy diverso de moléculas que se denominan receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) que están presentes en la superficie celular y en los endosomas. En el caso de infecciones virales, los PMAPs incluyen proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos virales, en particular los ARN virales de doble cadena (dsRNA) y de cadena sencilla (ssRNA) que son reconocidos por diversos RRP, entre los que se encuentran los receptores tipo Toll (TLR3, TLR7/8 y TLR9) y varios sensores citoplasmáticos como el gen inducible por ácido retinoico 1 (RIG-I), el gen de diferenciación asociada a melanoma 5 (MDA5) y los receptores similares a RIG-1 (RLR) que son miembros de la familia DExD/H y que contienen en su estructura la caja-RNA helicasa (Diamond *et al.*, 2000).

Tras el reconocimiento de la estructura viral por los RRP se induce la activación de distintas cascadas de señalización que incluyen la activación de IRF-3, IRF-7 y NF- κ B, lo cual resulta en producción de IFN- α/β , quimiocinas y citocinas proinflamatorias (Unterholzner *et al.*, 2013).

Los IFNs pueden actuar de forma autocrina o paracrina. La unión de los IFNs α/β a sus receptores (IFNAR1/IFNAR2) activan la cascada de señalización JAK-STAT que induce la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs) que a su vez codifican proteínas con actividad antiviral. Por ejemplo, las proteínas transmembranales inducidas por interferón 1, 2 y 3 (IFITM1, IFITM2, y IFITM3) que inhiben los primeros pasos en la replicación viral, mientras que la viperina, el gen estimulado por interferón 20 (ISG20) y la cinasa activada por dsRNA (PKR), inhiben la síntesis de macromoléculas producidas por el DENV (Hsu *et al.*, 2013; Bras *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010; Helbig, 2013;). Del mismo modo, se han descrito otros ISGs como inhibidores de la replicación, tales como la proteína inducible por IFN 6 (IFI6), heparanasa (HPSE), proteína de unión al factor α sensible a N-etilmaleimida (NAPA), la 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) y las proteínas Mx (Schoggins, 2012; Morrison y García Sastre, 2014).

2.1.5.1 Cascada de señalización JAK-STAT

La vía de señalización JAK-STAT se conforma por 4 proteínas cinasas homólogas de la familia Janus (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2) y siete proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6).

Las proteínas JAK, son tirosinas cinasas de aproximadamente 1100- 1200 aminoácidos y poseen un peso molecular de 120 a 140 kDa. Estructuralmente, se encuentran conformadas por 7 regiones conservadas nombradas como JH1 a JH7, desde el extremo C-terminal al N-terminal. La región JH1 representa al dominio cinasa que posee varios sitios de autofosforilación constituidos por residuos de tirosina conservados, como son Y1038/Y1039 en JAK1, Y1007/Y1008 en JAK2, Y980/Y981 en JAK3 y Y1054/Y1055 en

Tyk2 (Leonard y O'Shea, 1998). La región JH2, representa un dominio pseudocinasa que carece de residuos requeridos para la actividad catalítica y es necesario para la activación de la señalización inducida por citocinas. Las regiones JH3-JH4 contienen un dominio SH2. Las regiones JH6-JH7 del extremo N-terminal, constituyen dominios de homología FERM que le permiten a la proteína interactuar con otras proteínas o receptores de citocinas (**Figura 3a**) (Valle-Mendiola y Soto-Cruz, 2005; Shuai y Liu, 2003; Yamaoka *et al.*, 2004). Las proteínas STAT son transductores y activadores de las señales de transcripción, que poseen aproximadamente de 750 a 850 aminoácidos y tienen un peso molecular de 90 a 115 kDa, comparten en su estructura dominios conservados como el dominio N-terminal de interacción dímero-dímero que está involucrado en la regulación de la importación y exportación nuclear, en la unión al receptor y en la regulación de la dimerización de STAT en su estado inactivo; el dominio de "hélice súper enrollada" en el cual se da la interacción con otras proteínas como la proteína p48 o la proteína CBP/P300 y se encuentra involucrado en la unión al receptor y en la asociación a proteínas reguladoras; el dominio de unión a ADN en el que se unen estas proteínas en forma de dímeros a los elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE), cuya secuencia consenso es AGTTTNCNTTCC, y a las secuencias activadas por IFN gamma (GAS), cuya secuencia consenso es TTCNNGAA. El dominio "linker" que sirve como un espaciador para mantener la conformación apropiada entre los dímeros y el dominio de unión a ADN; el dominio SH2 que es un dominio altamente conservado, y posee diversos papeles importantes como son: la participación en el reclutamiento de las STAT al receptor de citocina a través del reconocimiento de tirosinas fosforiladas específicas, la asociación con las JAK activadas y la homo o heterodimerización de STAT. Finalmente el dominio TAD o de transactivación, que varía entre las STAT y modula la activación transcripcional de los genes diana (**Figura**

3b) (Jatiani *et al.* 2011; Leonard, 2001; Levy y Darnell, 2002; Morrison y García Sastre, 2014).

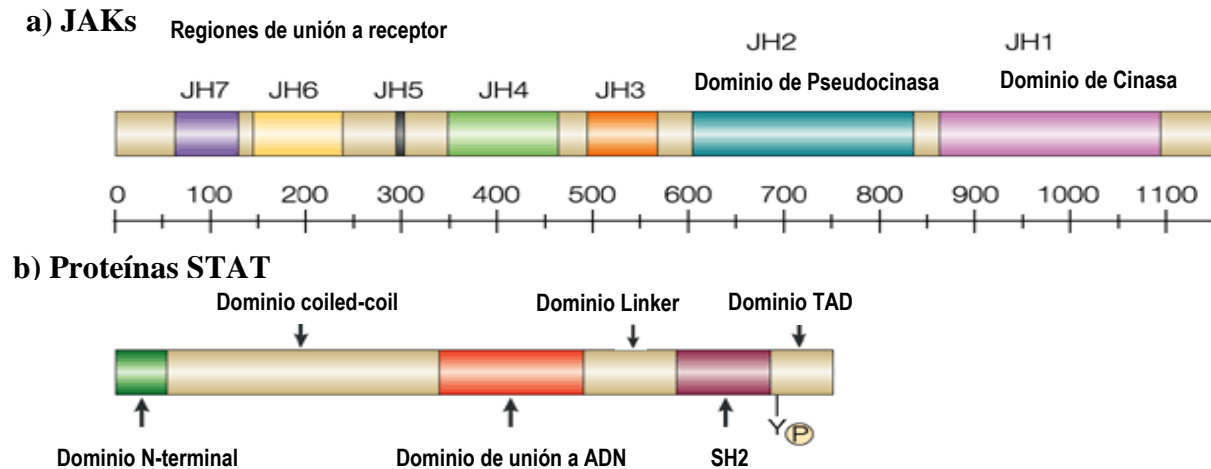


Figura 3. Dominios estructurales de las proteínas JAKs y STAT. **a)** Los dominios JH1-JH7 son regiones de secuencias similares entre las cuatro proteínas JAKs. El dominio JH1 representa el dominio cinasa y el dominio JH2 el dominio de pseudocinasa localizados en el extremo C-terminal. Los dominios JH6-JH7 presentes en el extremo N-terminal tienen los sitios de unión a receptores. **b)** Los dominios: N-terminal, de hélice súper enrollada, de unión a ADN, “linker” y SH2 son dominios conservados entre las siete proteínas STAT. El dominio TAD presente en el extremo C-terminal de estas proteínas es el más divergente en tamaño y secuencia (Modificado de Leonard, 2001).

Las proteínas STAT1, STAT3, STAT4, STAT5A y STAT5B forman homodímeros; mientras que las proteínas STAT1 y STAT2, así como STAT1 y STAT3 pueden formar heterodímeros dependiendo de la naturaleza y concentración del ligando que las activó. *In vitro*, la fosforilación de tirosina está acompañada por la formación de dímeros y no existen reportes de monómeros fosforilados en los residuos de tirosina de las proteínas STAT (Jatiani *et al.* 2011).

STAT1 y STAT2

La proteína STAT1 presenta dos isoformas STAT1 α de 91 kDa y STAT1 β de 84kDa. Estas proteínas se activan y forman homodímeros en respuesta al IFN- γ . El receptor para IFN gamma (IFNGR) consiste de dos cadenas polipeptídicas disociadas cuando no hay ningún ligando. La cadena α del receptor para IFN gamma (IFNGR1) está implicada en la unión con la citocina y se encuentra asociada con JAK1, mientras que la cadena β (IFNGR2) se encarga de la transducción de señales, jugando un papel secundario en la interacción con el ligando y está asociada con JAK2. Los homodímeros de la isoforma STAT1 β , se diferencian de los homodímeros de la isoforma STAT1 α , en que carecen de los últimos 38 aminoácidos del extremo C-terminal y no poseen actividad transcripcional, debido a su incapacidad para reclutar cofactores, como la histona acetiltransferasa CBP/p300 que participa en la remodelación de la cromatina (Semper *et al.*, 2014). También, STAT1 es capaz de formar heterodímeros con STAT2 en respuesta a la unión del IFN α/β con sus receptores (IFNAR1/IFNAR2) que tienen unidas a las proteínas Tyk2 y JAK1. Cuando se produce la estimulación por IFN α/β , STAT2 se une al receptor IFNAR2 para ser fosforilado por JAK2, mientras que Tyk2 crea en STAT2 un sitio de unión para STAT1, de forma que la unión de STAT1 a IFNAR2 depende de STAT2 (Li *et al.*, 1997).

La proteína STAT2 tiene un peso molecular de 113 kDa y al parecer, sólo está implicada en la señalización activada por los IFNs α/β (Darnell *et al.*, 1994). A diferencia de otras proteínas STAT, STAT2 requiere de STAT1 y de la proteína p48 o IRF-9 para formar el complejo ISGF3 para introducirse al núcleo e interactuar con el ADN. Esto debido a que es la única proteína que no forma homodímeros y por tanto no es capaz de unirse a los elementos GAS del ADN. Sin embargo, es capaz de formar heterodímeros con las dos isoformas STAT1- α y STAT1- β (Horvath, 2000).

2.1.5.2 Activación

La vía de señalización JAK-STAT se activa cuando el ligando (IFN α/β) se une a sus receptores (IFNAR1/IFNAR2) provocando su dimerización y acercamiento de sus regiones intracelulares, a las cuales se encuentran unidas de forma no covalente las cinasas Tyk2 y JAK1. Este acercamiento de las JAK produce su autofosforilación y la fosforilación cruzada de ciertas tirosinas del receptor, como las tirosinas Y466 y Y481 en IFNAR1 así como Y337 y Y512 en IFNAR2, que sirven como sitios de anclaje para las proteínas STAT2. La unión de STAT2 al receptor IFNAR1 se da a través de su dominio SH2, lo que conduce a la fosforilación de la tirosina Y690 en su dominio TAD y da origen a un sitio de anclaje para el dominio SH2 de STAT1, que a su vez sufre fosforilación de su tirosina Y701 (Li *et al.* 1997). Este paso, ocasiona la disociación del receptor de las proteínas STAT fosforiladas y la dimerización de éstas a través de sus dominios SH2. Posteriormente, estos heterodímeros se asociarán con el factor regulador de IFN 9 (IRF9 o p48) para formar el complejo ISGF3 que se unirá a los elementos de respuesta IREs en las regiones promotoras de los genes estimulados por IFN (ISGs). La unión al ADN es mediada directamente por STAT1 e IRF9, mientras que STAT2 es responsable del reclutamiento de activadores co-transcripcionales a través de su dominio TAD (Steen y Gamero, 2013).

Cuando se forman los heterodímeros de STAT1 y STAT2 éstos cambian de su conformación antiparalela (inactiva) a una conformación paralela (activa), lo que expone las señales de localización nuclear (NSL) de STAT1 (L407, K410 y K413) y de STAT2 (R409 y K415) que son reconocidas por la 5 α -importina para su unión con la 1 β -importina y su transporte hacia el núcleo celular, donde actúan como reguladores transcripcionales (Reich, 2013).

2.1.5.3 Regulación

La activación de la vía de señalización JAK-STAT es rápida pero de corta duración. Existen varios mecanismos de control negativo de la misma que la desconectan rápidamente. Uno de los mejor definidos son los supresores de las señales de citocinas (SOCS), que son una familia de proteínas pequeñas compuesta de 7 miembros CIS, SOCS1-SOCS7. Estas proteínas poseen un dominio SH2 que les permite competir con las proteínas STAT por la unión a JAK fosforiladas, resultando en la inhibición directa de la actividad de JAK, tal como funciona SOCS1. El dominio SH2 se encuentra flanqueado por un dominio N-terminal y un dominio C-terminal conocido como caja SOCS, la cual se puede unir a las elonginas B y C que son componentes del complejo de la ubiquitin ligasa E3 encargada de marcar con ubiquitina a las proteínas que deben ser degradadas en el proteasoma. A diferencia de SOCS1, SOCS3 requiere unirse al receptor activado para inhibir a las proteínas JAK (Shuai y Liu; 2003).

Otras proteínas implicadas en la regulación negativa de la vía JAK-STAT son la familia de las proteínas inhibidoras de STAT activado, conocidas como PIAS. Esta familia, consta de cuatro miembros PIAS1, PIAS3, PIASX y PIASY. Todas ellas poseen un dominio SAP responsable de la unión a regiones y estructuras específicas del ADN, un dominio de dedos de zinc que les permite bloquear de forma competitiva los sitios de unión al ADN de las proteínas STAT, un dominio C-terminal que contiene al motivo SIM encargado de la interacción no covalente con proteínas SUMO y una región rica en serinas y treoninas conocida como región S/T de la cual se desconoce su función (Shuai y Liu, 2003; Shuai, 2006).

La última familia de proteínas con capacidad para inhibir la vía JAK-STAT son las tirosina fosfatasas (PTPs) que se localizan en el núcleo y el citoplasma celular. Algunas de ellas,

como las SHPs cuentan, al igual que las proteínas SOCS, con un dominio SH2 asociado al dominio fosfatasa, que les permite unirse a los residuos de tirosina fosforilados en los diferentes transductores de señales, tal es el caso de las proteínas TC45 y SHP2 que pueden desfosforilar directamente a STAT1 en el núcleo (Shuai y Liu; 2003).

2.2 Antecedentes particulares

2.2.1 Evasión de la respuesta inmune por el DENV

Los IFNs α/β actúan como la primera línea de defensa para controlar la replicación viral durante las primeras etapas de la infección. Es por ello, que la mayoría de los virus suelen atacar estos elementos con el fin de evitar ser reconocidos por las células y establecer eficazmente la infección.

Diversos virus son capaces de inhibir la producción de IFN- α/β en las células infectadas, al igual que su señalización como una estrategia de evasión de la respuesta inmune innata. Entre estos virus, se encuentra el DENV, el cual inhibe la producción de IFN en células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs) (Rodríguez-Madoz *et al.* 2010) y en células dendríticas plasmocitoides (pDC), un tipo de células muy sensibles a los DENV y que son capaces de producir grandes cantidades de IFN- α (Pagni y Fernández-Sesma, 2014). Del mismo modo, se ha observado que la proteasa NS2B3 de DENV es capaz de inhibir la producción de IFN en células de riñón de feto humano 293T (Rodríguez-Madoz *et al.*, 2010).

Además de antagonizar la producción del IFN- α/β , el DENV también es capaz de inhibir su señalización. Este hecho se ha demostrado en diversos estudios.

En uno de ellos, se demostró que el DENV bloquea la señalización de IFN- α/β , pero no de IFN- γ , a través del bloqueo de la activación de STAT1 y STAT3 y la reducción de la

actividad cinasa de Tyk2 en células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica (Ho *et al.*, 2005).

En otro estudio se identificó que las proteínas no estructurales NS2A, NS4A, NS4B y NS5 de DENV2 son capaces de prevenir las señales mediadas por IFN, favoreciendo así la replicación viral en la línea celular A549 (células epitelio alveolar humano). En ese mismo estudio se probó que en células Vero (de riñón de mono verde Africano *Chlorocebus*) la expresión de la proteína NS4B y en menor medida NS2A y NS4A, inhiben la activación de dos promotores, ISRE-54 e ISRE-9-27, en respuesta a IFN- β ; y en la línea celular LLCMK2 (de riñón de mono Rhesus) transfectada con la proteína NS4B, se inhibió la expresión de la proteína p-STAT1 a pesar de ser tratadas previamente con IFN- β e IFN- γ , lo que sugiere que NS4B bloquea la vía de señalización del IFN evitando la activación de la proteína STAT1 (Muñoz-Jordán *et al.*, 2003). En otro estudio, se demostró que la proteína NS5 de DENV-2 induce la degradación de STAT2 en células 293T (Morrison *et al.*, 2013). En condiciones normales, las proteínas SOCS regulan la respuesta inflamatoria llevando a cabo la ubiquitinación que induce la degradación de mediadores de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, cuando las células son infectadas por virus, como el DENV-2, las proteínas SOCS son usadas para evadir la respuesta inmune a través de la inhibición de la vía JAK-STAT y mejorar así su replicación. Este hecho se observó en la línea celular de monocitos humanos U-937 que mostraron un aumento notable en SOCS1 y SOCS3 durante la infección con DENV-2, lo que se correlacionó con una reducción en el ingreso de la proteína p-STAT1 al núcleo y por ende, con la disminución de la expresión de genes antivirales como MxA y OAS (Estrada-Jiménez *et al.*, 2016).

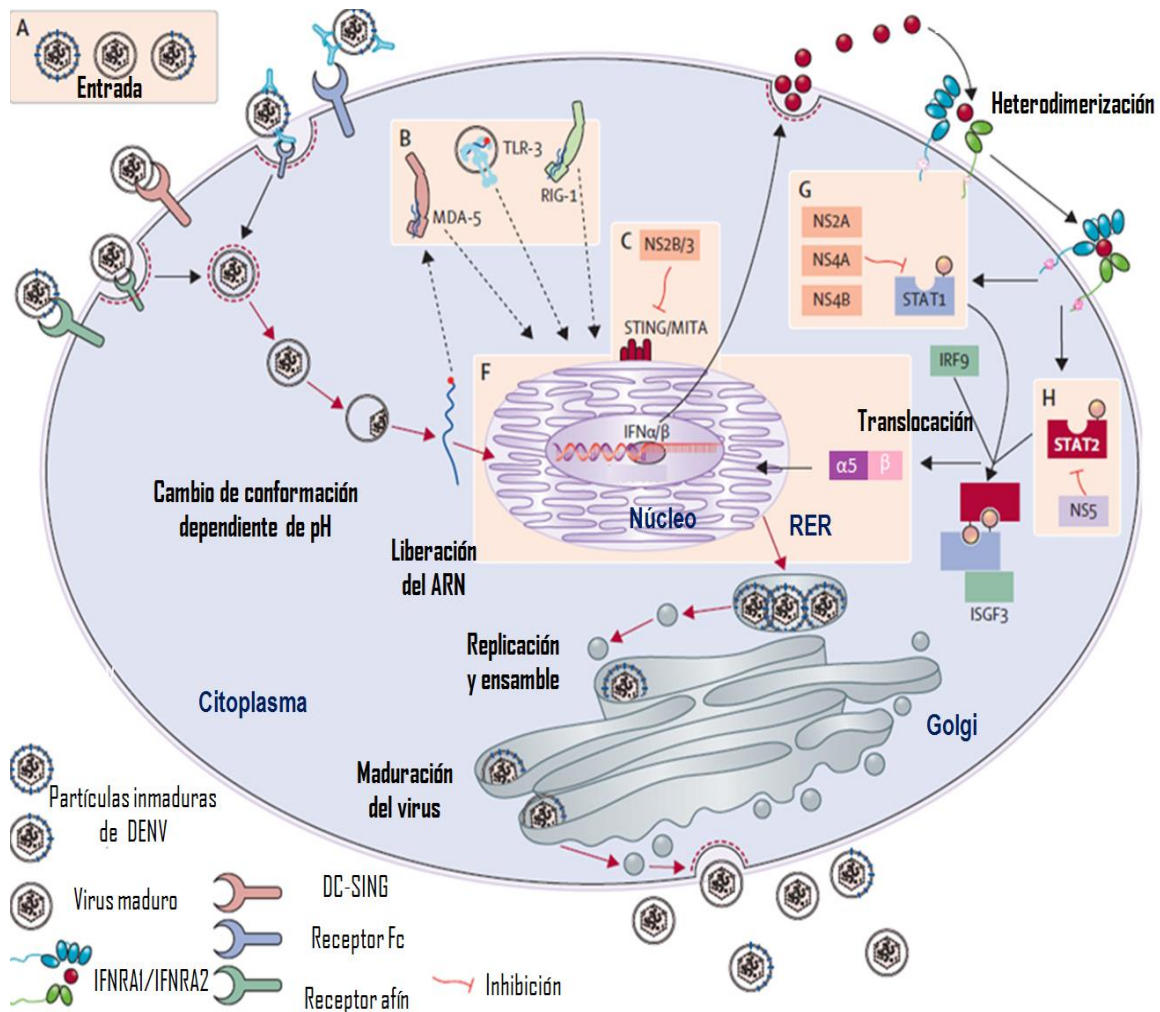


Figura 4. Respuesta antiviral celular producida por el virus de dengue. En flechas rojas se representa al ciclo replicativo del DENV. La respuesta inmune celular se indica en cuadros, tras el reconocimiento del virus ya sea mediante receptores anclados a la membrana plasmática (A), receptores TLR presentes en la membrana endosomal (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) o sensores presentes en el citoplasma como RIG-1 o MDA-5 (B) o en el retículo endoplásmico dentro de los que encontramos a STING/MITA (C) que es una proteína mediadora en la activación de las vías de señalización que activan a IRF3 y la producción de IFN α/β (F). El IFN α/β producido por la célula infectada es secretado y actúa de forma autocrina o paracrina. En ambos casos, se une a su receptor presente en la superficie celular, el cual se heterodimeriza y produce la autofosforilación de las JAK cinasas que se encuentran unidas a él, dichas proteínas activan a las proteínas STAT1 y STAT2 que forman el complejo ISGF3, el cual se transloca al núcleo mediante su unión con las importinas $\alpha 5$ y β para activar genes de respuesta antiviral. Sin embargo, STING/MITA, STAT1 y STAT2 pueden ser inhibidas por proteínas virales no estructurales tales como NS2B/3 (C), NS2A, NS4A, NS4B (G) y NS5 (H). (Modificado de Guzmán and Harris, 2015).

3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el dengue representa uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. La necesidad de conocer más acerca de esta enfermedad se ve reflejada en el aumento del número de casos de FHD/SCD por año. En este sentido, se han realizado estudios para tratar de entender cómo se llegan a producir los casos severos de esta enfermedad. Entre los factores determinantes se ha encontrado que la respuesta inmune contra el virus juega un papel importante en el curso de la infección y la presentación de las formas graves de la enfermedad. En este sentido, se ha identificado que las proteínas virales no estructurales son capaces de contrarrestar la respuesta antiviral para que el virus se siga replicando en las células del hospedero.

Sin embargo, aunque existen diversos estudios sobre este tema, el conocimiento que se ha adquirido en los últimos años no logra responder a todas las interrogantes planteadas, por lo que la información que existe hoy en día acerca de las estrategias que emplea el virus de dengue para evadir la respuesta inmune del hospedero continua siendo incompleta. Es por ello que para conocer más acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la evasión de la respuesta inmune mediante el bloqueo de la vía de señalización JAK-STAT, se planteó el presente trabajo, el cual trata de responder si el virus es capaz de inhibir la entrada al núcleo de la proteína STAT1, una proteína que es responsable de activar genes que codifican productos con actividad antiviral.

4 HIPOTESIS

La inhibición de la translocación de p-STAT1 durante la infección con el virus de dengue podría ocurrir por alguno de los siguientes mecanismos:

- Las proteínas SOCS1 y SOCS3 interactúan con p-STAT1 inhibiendo su translocación.
- Las proteínas no estructurales del virus dengue actúan directa o indirectamente sobre el complejo de importe nuclear deteniendo el tránsito de p-STAT1.

5 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar las interacciones moleculares de la proteína p-STAT1 con otras proteínas involucradas en su translocación al núcleo durante la infección por el virus de dengue.

5.1 Objetivos específicos

1. Estudiar el proceso de translocación nuclear de p-STAT1 en células U-937-DC-SIGN mediante inmunofluorescencia y *Western blot*.
2. Identificar las proteínas celulares que forman parte del complejo de importación nuclear de pSTAT1 y los cambios que sufren durante la infección con el virus de dengue.
3. Identificar la interacción de las proteínas supresoras de señales SOCS-1 y SOCS-3 con la proteína pSTAT1 y su probable papel en la inhibición de la translocación nuclear.
4. Identificar la posible interacción de proteínas virales no estructurales con la proteína p-STAT1 y su efecto en la translocación nuclear.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivos celulares

6.1.1 Células C6/36

Las células C6/36 (ATCC N° CRL-1660), fueron generadas a partir de larvas de mosquito *Aedes albopictus* a mediados de 1960. Estas células se cultivaron a 27°C sin CO₂, en medio mínimo esencial MEM (Minimum Eagle's Medium, GIBCO) suplementado con 2mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin y 10% de suero fetal bovino (SFB, previamente inactivado a 56°C por 30 min).

6.1.2 Células BHK-21

Las células BHK-21(ATCC N° CCL-10), son fibroblastos de riñón de hámster bebé (*Mesocricetus auratus*). Se cultivaron en MEM (GIBCO), enriquecido con 2 mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, 10 nM de NaHCO₃, HEPES y 10% de SFB. Se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo al 5% de CO₂.

6.1.3 Células U-937 y U-937- DC-SIGN

Las células U937 (ATCC N° CRL-1593.2) son monocitos cancerosos obtenidos en 1974 de la efusión pleural de un paciente con linfoma histiocítico. Estos monocitos fueron transfectados establemente con el gen que codifica la molécula CD209 o DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesión Molecule Grabbing Nonintegrin); éste es un receptor con actividad de lectina tipo C, que es reconocido como factor de adherencia del DENV y aumenta la susceptibilidad celular a la infección. La línea celular resultante de la transfección se conoce como U-937-DC-SIGN(ATCC N° CRL-3253); sin embargo, a partir de este momento utilizaremos la abreviatura U-937-DC para referiremos a estas células. Ambas líneas celulares se mantuvieron como monocitos en suspensión, en medio

de cultivo RPMI 1640 (Caisson Labs) suplementado con 2 mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 10 nM de NaHCO₃ y 5% de SFB. Las células se incubaron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C, realizando cambios de medio cada dos días. Estas células fueron donadas por la Dra. Rosa María del Ángel del CINVESTAV.

6.2 Diferenciación de macrófagos

Los monocitos U-937 y U-937-DC se diferenciaron a 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 estreptomicina, 10 nM de NaHCO₃ y 5% de SFB durante 24 horas. Después de este tiempo, se realizó el cambio de medio RPMI al 5% de SFB y se dejaron reposando otras 24 horas en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

6.3 Replicación viral

Para la replicación viral, se trabajó con el DENV serotipo 2, cepa 16681 proveniente de New Guinea, donado por el Dr. Álvaro Aguilar Setién del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Las células C6/36 se cultivaron en botellas p25 hasta alcanzar una confluencia del 90%. Los cultivos fueron inoculados con muestras del DENV durante 1 hora a 27°C sin CO₂, transcurrido este tiempo se retiró el medio y se lavaron las células con PBS a pH 7.4. Después, se agregó medio nuevo con 5% de SFB y se dejaron en incubación durante 72 horas, monitoreando diariamente las células para observar los

efectos causados por el virus. Transcurrido el tiempo de incubación, se recuperó el sobrenadante de las células infectadas y se almacenó a -80°C.

6.4 Titulación viral

Para la titulación viral se realizó el método de placas líticas en células BHK-21 cultivadas en medio MEM suplementado con glutamina, NaHCO₃, antibiótico y SFB al 5% en placas para cultivo celular de 24 pozos. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 horas, para obtener una confluencia del 90%. Posteriormente, las células se inocularon con el sobrenadante de las células C6/36 infectadas con DENV2, realizando diluciones seriadas en base 10 (1:10, 1:100, 1:1000, etc.) en medio de cultivo MEM sin SFB y se incubaron durante 1 hora a 37°C en un ambiente húmedo al 5% de CO₂. Después, se retiró el sobrenadante, se lavaron las células con PBS y se agregó una mezcla en proporción 1:1 de MEM al 5% de SFB y agarosa al 0.7%. Los cultivos se incubaron en un ambiente húmedo al 5% de CO₂ y se analizó la aparición de placas líticas a las 24, 48 y 72 horas p.i.

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 añadió el colorante cristal violeta al 0.1% disuelto en etanol al 20% durante 10 minutos, después se lavó con agua corriente y se dejó secar.

En los sitios donde se perdieron células por la acción del virus se observaron zonas no teñidas, conocidas como placas líticas, estas placas se contaron y se calculó el título viral expresándolo en unidades formadoras de placas (UFP) mediante la siguiente ecuación:

$$UFP/ml = \frac{(No\ de\ placas)\ (inverso\ de\ la\ dilución\ viral)}{volumen\ de\ infección\ en\ ml}$$

6.5 Infección de monocitos U-937 y U-937-DC

En placas para cultivo celular de 24 pozos se sembraron monocitos U-937 o U-937-DC, colocando 5×10^5 células en un volumen final de 200 μ l por pozo de medio RPMI 1640 sin SFB. Las células se diferenciaron a macrófagos con PMA como se mencionó anteriormente, y se infectaron con DENV-2 previamente titulado (33.75×10^7 UFP/ml), colocando el volumen equivalente a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01, 0.1, 1 y 10. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C con 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo se centrifugaron las placas a 1500 rpm durante 7 minutos, se retiró el sobrenadante para quitar las partículas virales que no entraron a las células, y se adicionó 1ml de medio RPMI 1640 al 5% de SFB a cada pozo y se incubaron las placas durante 72 horas a 37°C. Pasado el tiempo, las placas se centrifugaron a 3200 rpm durante 7 minutos a 4°C, esto con el fin de precipitar restos celulares y dejar limpio el sobrenadante, el cual se recuperó y almacenó en refrigeración para su posterior titulación en células BHK-21. En todos los experimentos se colocaron como controles negativos cultivos de células sin infectar y como controles positivos de activación células tratadas con IFN (ver más adelante) que se procesaron de la misma manera.

También se realizaron ensayos con monocitos U-937 o U-937-DC sembrados y diferenciados, como se mencionó anteriormente, en placas Petri p100 a una concentración de 5×10^6 células/placa, inoculando el volumen equivalente a una MOI de 1 UFP/célula de DENV-2. Los cultivos se incubaron durante 1 hora a 37°C al 5% de CO₂ en RPMI 1640 sin SFB. En todos los experimentos se colocaron como control negativo cultivos de células sin infectar y como control positivo de activación células tratadas con IFN (ver adelante), que se procesaron de la misma manera.

6.6 Tratamiento con Interferón- α

Para obtener un control positivo de activación de la respuesta mediada por IFN, en todos los experimentos se utilizaron células U-937 o U-937-DC, previamente diferenciadas a macrófagos, que se trataron con 1000 UI de IFN- α por cada 10^6 células durante 6 horas en medio RPMI 1640 sin SFB. Estas células se cultivaron simultáneamente con las células infectadas haciendo coincidir el inicio de la infección con el inicio del tratamiento con IFN, excepto en los ensayos que se describa un tratamiento en tiempos diferentes.

6.7 Preparación de extractos celulares

Para analizar los cambios en la expresión y activación de proteínas se utilizaron extractos totales de los cultivos de macrófagos diferenciados en placas p100, correspondientes a las tres condiciones del ensayo: infectados con DENV-2, células sin infectar tratadas con IFN- α (control positivo de activación) y células sin infectar y sin IFN (control negativo).

Los cultivos celulares se lavaron 2 veces con PBS 1x pH7.4 y después se trataron con un amortiguador para inducir lisis (NE-PER, Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo scientific, USA), adicionado con un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (78442; Thermo scientific, USA) y Na_3VO_4 1 mM a pH 10 (S6508, Sigma Aldrich, St. Lous MO, USA).

6.7.1 Extracción de la fracción citosólica

Para obtener las proteínas citoplasmáticas se añadió a cada muestra el reactivo CER I del amortiguador de lisis NE-PER (1 mL de CER I / 10×10^6 células, adicionado con 10 μL de inhibidor de proteasas y fosfatasas y 10 μL de Na_3VO_4) y se procedió a su lisis mediante agitación en vortex por 30 segundos e incubación en hielo durante 10 minutos, para

permitir la rotura y disolución de las membranas celulares. Posteriormente se añadió el reactivo CER II (100 μ L), se agitó en vortex 5 segundos y se incubó 1 minuto en hielo. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 16,000 xg a 4°C, separándose el botón y el sobrenadante para su uso posterior.

6.7.2 Extracción de la fracción nuclear

El botón de la centrifugación de cada muestra se resuspendió con el reactivo NER (500 μ L) y se agitó en vortex 15 segundos cada 10 minutos durante un lapso total de 40 minutos. Después se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 16,000 xg 4°C para obtener el sobrenadante que contenía el extracto nuclear de cada muestra.

6.8 Cuantificación de proteínas

Las proteínas obtenidas de cada fracción se cuantificaron por el método de Bradford (1976). Se realizaron alícuotas de 5 μ l de muestra de cada extracto, se diluyeron en 95 μ L de H₂O destilada y 1 mL de reactivo de Bradford (ver Anexo 1). Como estándares de comparación se utilizaron distintas concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA). La lectura de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 595 nm en el lector de placas Synergy 4 (BioTek).

6.9 Inmunoprecipitación

Esta técnica se llevó a cabo utilizando el kit de Inmunoprecipitación de Proteína G (IP50, Sigma-Aldrich). Cuando fue posible se trabajó con 200 μ g de proteína total. Se realizó una fase de lavado de la muestra con 5 μ L de proteína G-agarosa, con lo que se

disminuye el pegado inespecífico de la muestra. A continuación los extractos celulares se incubaron con 0.4 µg del anticuerpo contra p-STAT1 durante toda la noche a 4°C en agitación suave por inversión. Después, se añadieron 30 µL de las perlas de agarosa-proteína G en la solución amortiguadora del kit IP 1x, las cuales fueron previamente lavadas 3 veces con 1 mL de la solución IP 1x y se dejaron durante 2 horas en las mismas condiciones que la incubación con el anticuerpo. Posteriormente se lavaron las muestras cinco veces con la solución amortiguadora de IP 1x para proceder a resuspenderlas en 10 µL del tampón de Laemmli y calentarlas durante 5 minutos a 95°C, para cargarlas en un gel de acrilamida.

6.10 Western blot

6.10.1 Electroforesis de proteínas

Los extractos proteicos o las inmunoprecipitaciones se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970, ver anexo 2). Las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos en solución amortiguadora de carga (Tris-HCl 240 mM a pH 6.8, 8% SDS (p/v), 40% glicerol (v/v), azul de bromofenol 0.04% (p/v) y β-mercaptoetanol 5% (v/v)). En cada carril del gel se cargó la misma cantidad de proteínas (50 µg). Las electroforesis se efectuaron en una solución de corrida convencional (ver anexo 3), aplicándose un voltaje 100 V durante 30 minutos y de 90 V por 2 horas a temperatura ambiente.

6.10.2 Electrotransferencia de proteínas

Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF. Para ello se empleó un sistema de transferencia semi-húmeda (Semi-dryblot, BioRad) utilizando una solución amortiguadora de transferencia (ver anexo 4). La transferencia se efectuó aplicando un voltaje constante de 24V, durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente.

6.10.3 Inmunodetección

Una vez realizada la transferencia, se bloqueó la membrana mediante inmersión de ésta en una solución de leche descremada al 5% (p/v). Es importante mencionar que no debe utilizarse leche cuando se emplean anticuerpos frente a formas fosforiladas de las proteínas, ya que la leche contiene numerosas proteínas fosforiladas que causan reacción cruzada. En este caso debe usarse BSA al 3% en TBS (Tris 1 M, NaCl 5M y Tween 20 al 0.1% (v/v), pH 7.5) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Después, se incubó la membrana con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y con agitación constante. Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó con TBS tres veces, durante 10 minutos cada vez, y se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, diluido en la solución de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante.

6.11 Inmunofluorescencia

Para determinar la localización de STAT1, STAT2 y sus isoformas fosforiladas, se sembraron 2×10^5 monocitos U-937 o U-937-DC en cada pozo de una cámara para cultivo sobre laminillas Tissue Tek Chamber Slides (Thermo Scientific). Las células se

diferenciaron a macrófagos con PMA, como ya se mencionó y se siguieron 5 condiciones experimentales: a) células control de la diferenciación sin ningún otro tratamiento, b) células tratadas 6 horas con IFN- α , c) células tratadas 6 horas con IFN- α y posteriormente infectadas 1 hora con DENV, d) células infectadas 1 hora con DENV y posteriormente tratadas 6 horas con IFN- α , e) células infectadas 1 hora con DENV. Al cumplirse el equivalente a 12 y 24 horas p.i. las células se lavaron con solución salina de fosfatos (PBS 1x, pH 7.4; ver anexo 5) y se fijaron con solución de paraformaldehído al 4% en PBS pH 7 por 10 minutos a 4°C. Luego, las células se lavaron 3 veces en PBS frío (5 minutos por lavado) y se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma) al 0.1% por 5 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados en PBS (5 minutos por lavado). Las laminillas se incubaron con el anticuerpo respectivo durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación en PBS con 1% de BSA y 2% de SFB (Sigma). A continuación, las células fueron incubadas con anticuerpo primario contra pSTAT1 en una dilución 1:100 en una solución de BSA al 1% y 0.2% de SFB en PBS por 2 horas a 37°C y en agitación constante. Después se realizaron cuatro lavados con PBS frío (5 minutos por lavado). Se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario IgG de cabra contra IgG de conejo conjugado al fluorocromo FITC (F0382) diluido 1:80 en una solución al 1% de BSA y SFB. Las muestras se incuban 90 minutos con el anticuerpo. Se realizaron tres lavados con PBS frío para eliminar el anticuerpo no acoplado. Finalmente, los núcleos se tiñeron con el reactivo de Hoechst a una dilución 1:100 en PBS durante 5 minutos, después de lavar tres veces con PBS se desmontó la cámara y se agregó solución de montaje para observar las células usando el microscopio invertido de fluorescencia Axiovert 200 (Carl Zeiss). Los fluorocromos FITC y Hoechst fueron excitados utilizando filtros de longitud

de onda de 488 y 430 nm, respectivamente. Las fotografías fueron capturadas con el programa Axiovision SE64 (versión 4.8.3, Carl Zeiss).

El mismo procedimiento se siguió para la detección de la proteína prM, solo que en este caso la solución de bloqueo fue al 5% de SFB disuelto en PBS y las células se incubaron con el anticuerpo primario contra la proteína prM (ab41473) perteneciente al DENV-2 en una dilución 1: 10 en una solución de SFB al 5% en PBS; y el anticuerpo secundario IgG de cabra contra IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor® 647 (ab150115) se utilizó en una dilución 1:200 con PBS con 5% de SFB.

Tabla I. Anticuerpos primarios fosfo-específicos y totales

Anticuerpo primario	PM (kD)	Clonalidad	Tipo de Ig y Origen	Casa Comercial	No. de catálogo
Anti-pSTAT1-Y701	94	Policlonal	IgG de Conejo	R&D Systems	AF-2894
Anti-phospho-STAT2	113	Policlonal	IgG de Conejo	R&D Systems	AF2890
Anti-STAT1 p91	91	Policlonal	IgG de Cabra	R&D Systems	PAF-ST1
Anti-hSTAT2	115	Monoclonal	IgG ₁ de Ratón	R&D Systems	MAB1666
Anti-SOCS1	23	Policlonal	IgG de Conejo	Abcam	ab135718
Anti-SOCS3	27	Policlonal	IgG de Conejo	Abcam	ab3693
Anti-KPNA1 humana	65	Policlonal	IgG de Oveja	R&D Systems	AF6206
Anti-NS4A	16	Policlonal	IgG de Conejo	Thermo Fisher scientific	PA5-32197
Anti-NS4B	27	Policlonal	IgG de Conejo	Thermo Fisher scientific	PA5-32198
Anti-NS5	103	Policlonal	IgG de Conejo	Thermo Fisher scientific	PA5-32200
Anti-prM	21	Monoclonal	IgG de Ratón	Abcam	ab41473

Tabla II. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo secundario	Conjugado	Clonalidad	Origen	Casa Comercial	No. de catálogo
Anti- IgG de Conejo	HRP	Policlonal	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	sc-2004
Anti-IgG de Ratón	HRP	Policlonal	Conejo	abcam	ab97046
Anti-IgG de Cabra	HRP	Policlonal	Conejo	abcam	ab6741
Anti-IgG de Conejo	FITC	Policlonal	Cabra	Thermo Fisher scientific	F0382
Anti-IgG de Ratón	Alexa Fluor® 647	Policlonal	Cabra	abcam	ab150115

7 RESULTADOS

7.1. Replicación viral en células C6/36.

Para producir el virus que sería utilizado en los experimentos se infectaron células C6/36 de mosquitos *A. albopictus* con el virus de dengue serotipo 2. Las células C6/36 infectadas muestran un efecto citopático característico con abundancia de vacuolas, acumulación de cuerpos de inclusión en el citoplasma y fusión de las membranas celulares, lo que da origen a células multinucleadas de gran tamaño. También se observa desprendimiento celular y aumento de los espacios intercelulares debido a la lisis de las células infectadas (Figura 5B). Mientras que en los cultivos sin infectar se observa la integridad del cultivo formado por células ovaladas y fusiformes (Figura 5A).

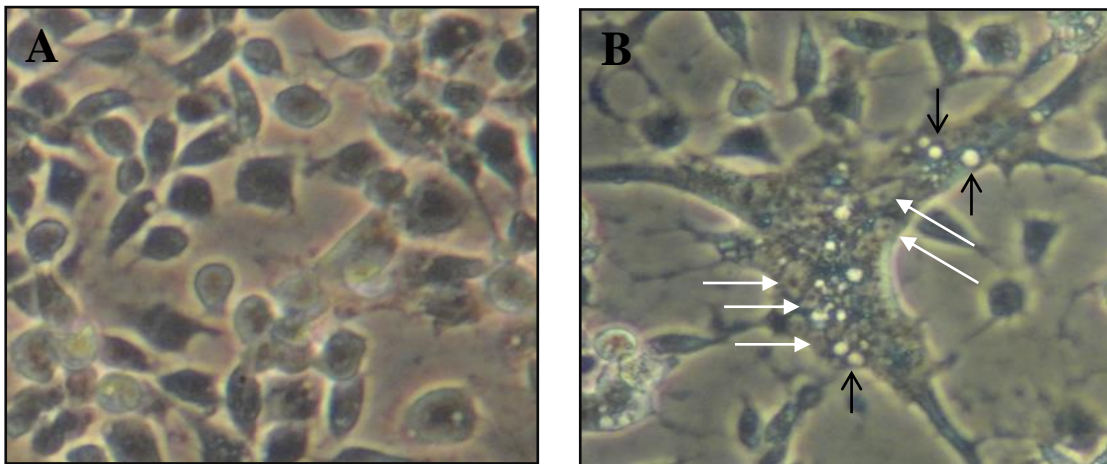


Figura 5. Micrografía de contraste de fases, donde se aprecia el efecto citopático causado por el DENV-2 en células C6/36. A) Cultivo sin infectar, las células se observan bien definidas, ovaladas y separadas unas de otras. **B)** Células infectadas con DENV-2 (MOI=1) a las de 48 horas p.i. Se observa una célula gigante con múltiples núcleos (flechas blancas) y abundantes vacuolas (flechas negras). Aumento 40x.

7.2 Diferenciación de monocitos a macrófagos.

Una constante en nuestros experimentos es el proceso de diferenciación de los monocitos a macrófagos; ya que es bien conocido que las células U-937 diferenciadas son más susceptibles a la infección con el virus del dengue que las no diferenciadas. Como no conocíamos las características de la línea celular U-937-DC empezamos por identificar los cambios que sufre durante el proceso de diferenciación. Para esto, las células U-937-DC se estimularon con 10 ng/ μ L de PMA, como se mencionó anteriormente. Los cambios fenotípicos se muestran en la figura 6. La morfología de las células no diferenciadas es consistente con su carácter de monocitos, son esféricas, independientes y están en suspensión (Figura 6A). Mientras que las células diferenciadas a macrófagos adquieren morfología estrellada con prolongaciones celulares que les confieren capacidad de adherirse a la superficie y se agrupan entre ellas.

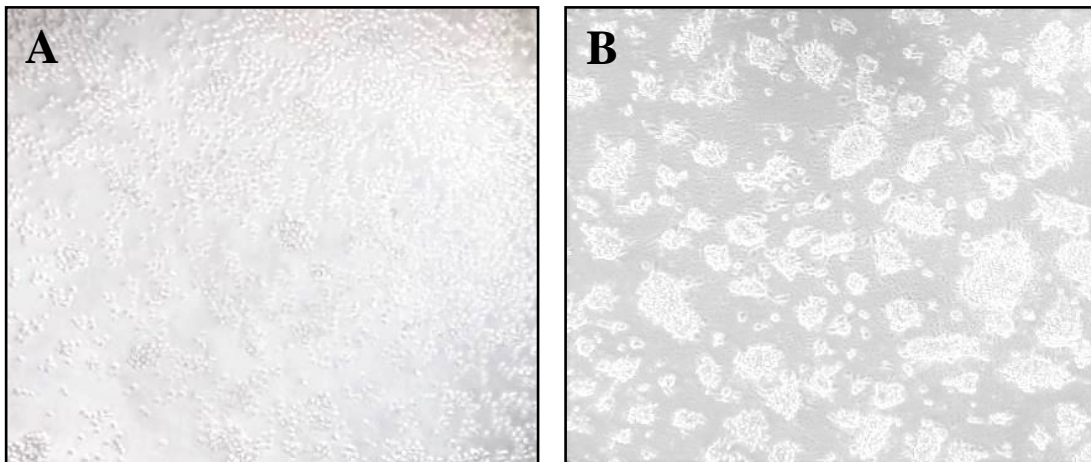


Figura 6. Línea celular U-937-DC. A) Cultivo no diferenciado, se ven células esféricas independientes. **B)** Cultivo diferenciado, 48 horas después del tratamiento con PMA; las células tienen contorno estrellado con múltiples prolongaciones y se ven adheridas a la superficie. Aumento 25x.

7.3 Evaluación de la infección en macrófagos.

Con el fin de comparar la eficiencia de replicación viral en las líneas celulares U-937 y U-937-DC se realizaron ensayos de infección con DENV-2 a diferentes MOI. Los sobrenadantes de células infectadas se colectaron a las 72 horas p.i. para ser inoculados en células BHK-21 y determinar el título viral mediante ensayos de placas líticas (Figura7). Las células BHK-21 inoculadas con sobrenadante de monocitos no infectados (NI) muestran una superficie homogénea teñida de azul. En las células infectadas las placas líticas se observan como zonas más claras o sin color, generalmente de forma circular. Sólo los sobrenadantes procedentes de células U-937 infectadas con una MOI de 1 y 10 produjeron placas. Mientras que todos los sobrenadantes procedentes de células U-937-DC, infectadas con MOI de 0.01 a 10, produjeron placas en células BHK-21. Con base en los resultados mostrados en la Figura 7 y considerando solamente las células infectadas con una MOI=1, el título viral en los monocitos U937 fue de 10^1 UFP/mL, mientras que el de las células U-937-DC fue de 10^3 UFP/mL. Estos resultados muestran que el virus de dengue se replica cien veces más en monocitos que expresan el receptor DC-SIGN; lo que sugiere que este receptor no sólo mejora el ingreso del DENV-2 a las células, también favorece la liberación de mayor número de viriones al sobrenadante.

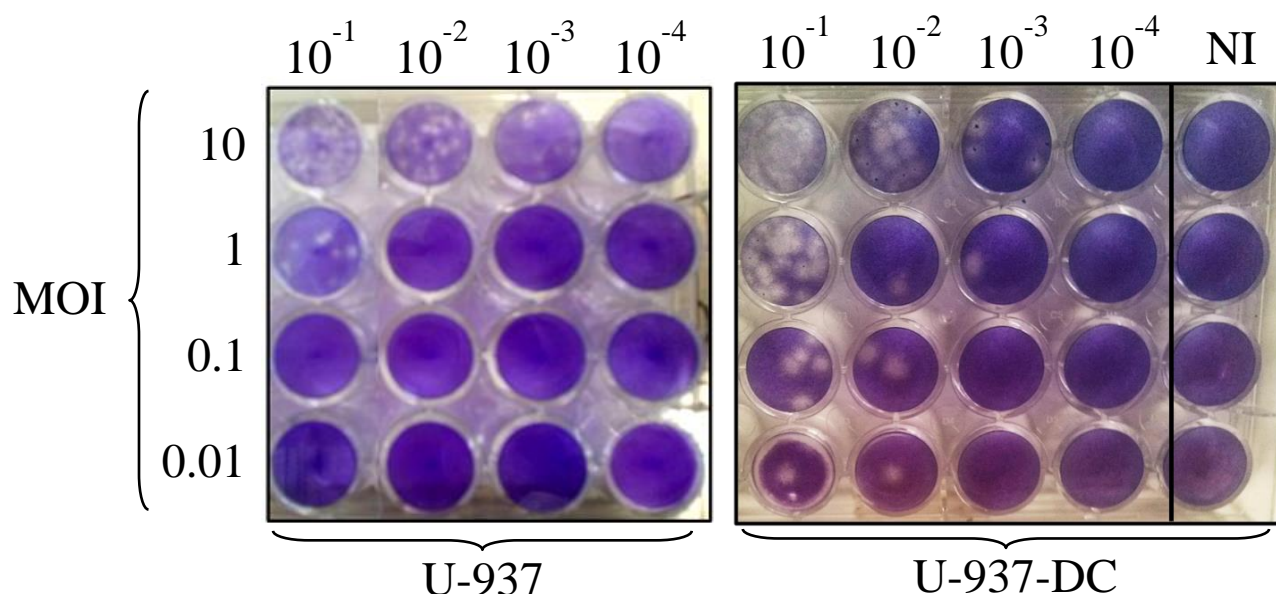


Figura 7. Ensayo de placas líticas en células BHK-21 inoculadas con sobrenadantes de monocitos U-937 o U-937-DC que fueron infectados con diferentes concentraciones (MOI) de DENV-2. Las células BHK-21 fueron inoculadas 1 hora con diferentes diluciones (10^{-1} a 10^{-4}) de los sobrenadantes obtenidos de monocitos y después de seguir los procedimientos descritos en la metodología, fueron teñidas con cristal violeta a las 72 horas p.i. NI: células no infectadas.

7.4 Detección de antígenos virales en macrófagos

Para verificar la infección con DENV-2 y la presencia de antígenos virales en los macrófagos U-937 DC-SIGN, se hicieron ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos primarios contra de la proteína prM, que forman parte de la partícula viral, y anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 647. Los ensayos se realizaron a las 24 horas p.i. La Figura 8A muestra la ausencia de fluorescencia con el anticuerpo prM en las células no infectadas (NI). Mientras que se observa una amplia distribución intracelular de la proteína prM en las células infectadas con DENV-2 (Figura 8B).

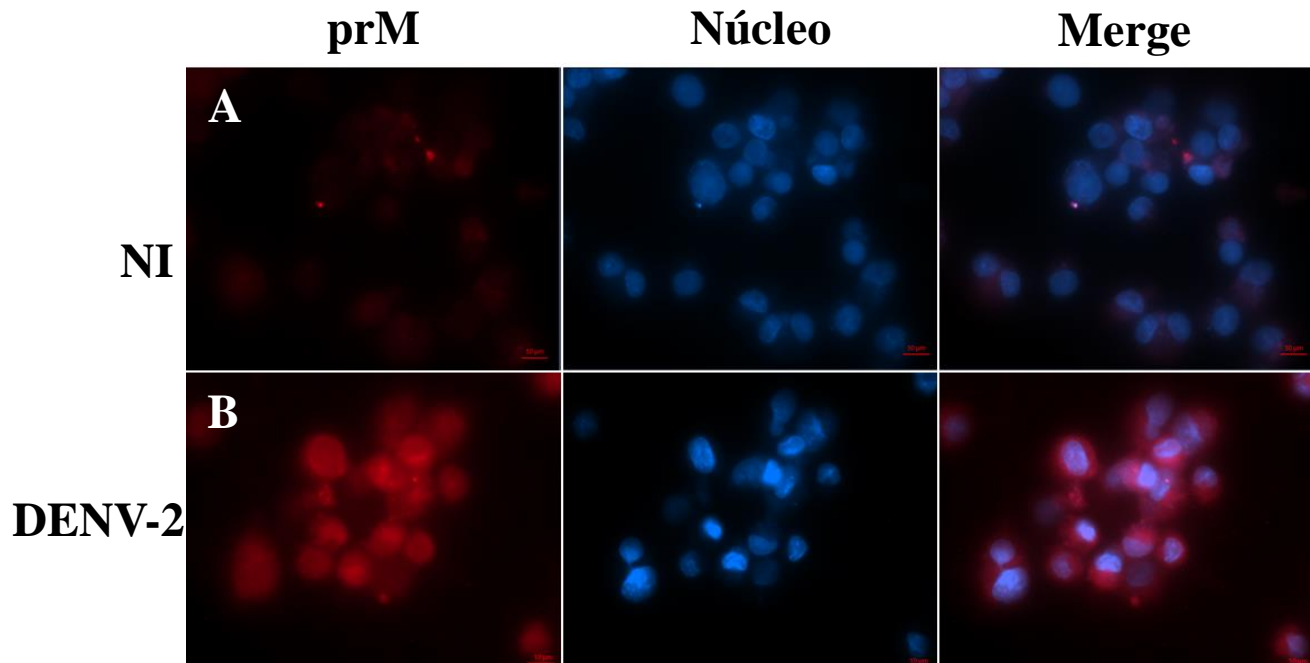


Figura 8. Inmunofluorescencia en macrófagos U-937-DC infectados con DENV-2. La presencia de la infección fue comprobada usando anticuerpos específicos contra la proteína prM reconocidos con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647 (rojo). Los núcleos se tiñeron con colorante de Hoechst (azul). A. En el panel superior se ven las células no infectadas (NI). B. En el panel inferior están las células infectadas con DENV-2. Ver anexo 6.

7.5 Distribución celular de la proteína p-STAT1 en macrófagos infectados.

En un estudio previo de nuestro grupo, Estrada Jiménez identificó que la infección con DENV-2 inhibe la translocación al núcleo de p-STAT1 en macrófagos U-937 (Estrada-Jiménez *et al.*, 2016). Con el fin de conocer si este evento se presenta de manera similar en las células U-937-DC, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia bajo diversas condiciones experimentales. Para la detección se utilizó un anticuerpo primario específico contra la proteína p-STAT1 fosforilada en el amino ácido Y701 (AF-2894) y un anticuerpo secundario conjugado a FITC (Sigma F0382). En estos ensayos se logró ver que la proteína p-STAT1 es escasa en el citoplasma de células diferenciadas con PMA (Figura 9A), pero se incrementó su presencia en células tratadas con IFN- α (Figura 9B) y cuando se trataron con IFN antes de la infección con DENV-2 (Figura 9C). La fluorescencia nuclear asociada con la proteína p-STAT1 se redujo en las células que fueron infectadas con DENV y después tratadas con IFN- α (Figura 9D); así como en las células que sólo fueron infectadas con DENV-2 (Figura 9E). Esto indica que el efecto de la infección con DENV-2 es distinto en las células U-937-DC, a lo observado previamente en la línea parental U-937; ya que no se observa que se detenga completamente la translocación de p-STAT1 al núcleo. No obstante, se observa una disminución de la fluorescencia que podría asociarse con una menor respuesta antiviral y por ende mayor permisividad a la infección en esta línea celular.

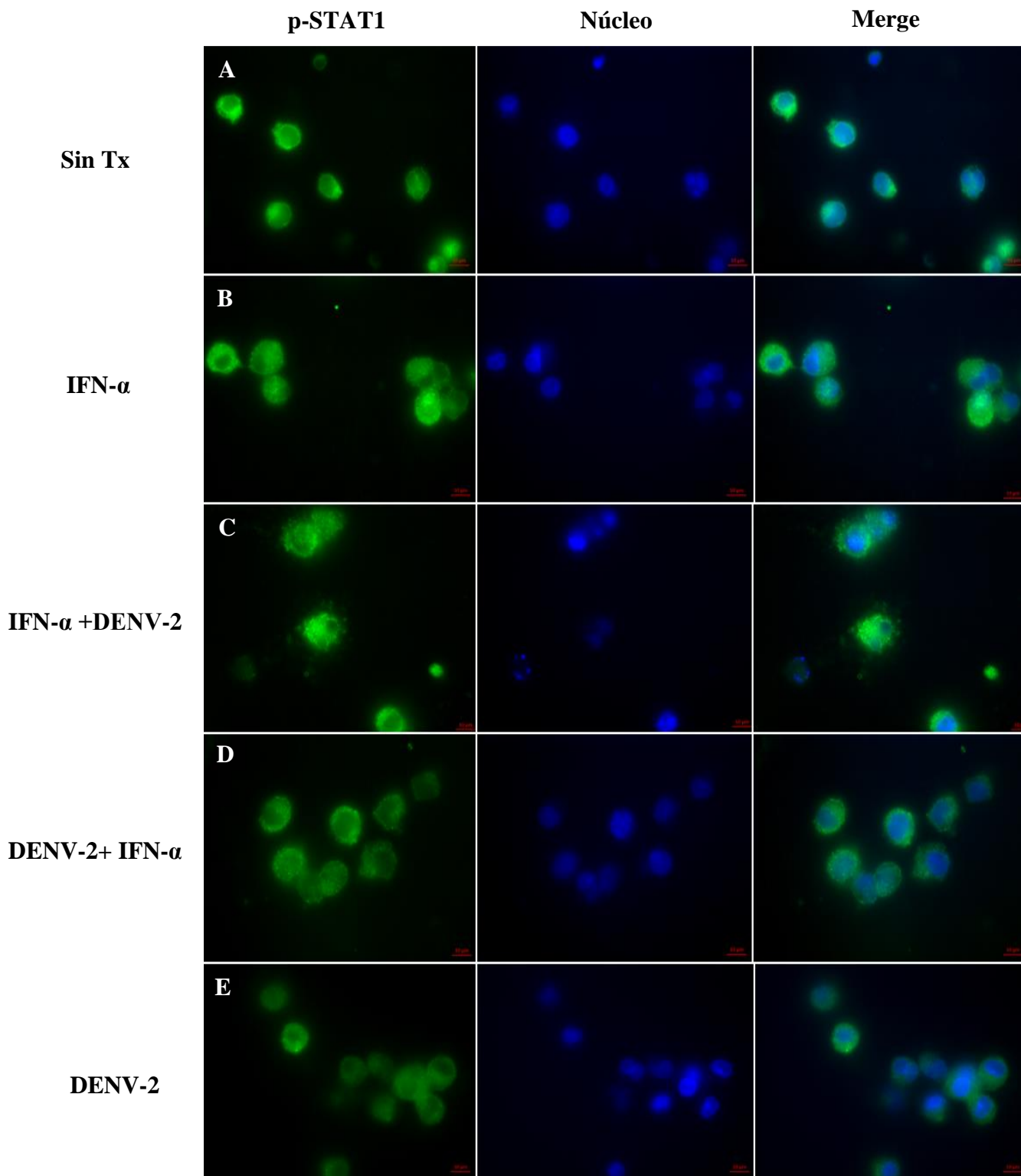


Figura 9. Distribución de p-STAT1 en macrófagos U-937-DC. La activación de la vía de señalización JAK-STAT se analizó utilizando anticuerpos primarios contra la proteína p-STAT1 y anticuerpos secundarios conjugados a FITC (verde). Los núcleos se tiñeron con colorante de Hoechst (azul). **A)** Células sin IFN- α y sin infectar. **B)** Células tratadas con IFN- α . **C)** Células con IFN- α 6 horas antes de infectarlas. **D)** Células infectadas 1 hora y tratadas con IFN después de la infección. **E)** Células infectadas con DENV-2. Ver anexo 6.

7.6 Análisis de la distribución celular de las proteínas STAT1 y STAT2.

Para analizar la distribución de las proteínas STAT1 y STAT2 se realizaron ensayos de *Western blot* (WB) con las fracciones citosólicas y nucleares de los extractos celulares, comparando mediante densitometría los niveles de expresión de estas proteínas contra la proteína β -actina, que se usó como control endógeno.

7.6.1 Expresión de STAT1 y STAT2 en células tratadas con IFN.

En la Figura 10 se presentan los resultados de WB para la proteína STAT1 en las células U937-DC tratadas con IFN- α . Se observa la banda correspondiente a la proteína STAT1 (88 kDa) en todos los carriles de las fracciones citosólicas (10A) y nuclear (10B), incluyendo el control negativo al tratamiento y los diferentes tiempos analizados posteriores al tratamiento con IFN. El análisis de densitometría (Figura 10C) muestra que la expresión de STAT1 sufre un incremento significativo en ambas fracciones a las 24 horas posteriores al tratamiento con IFN. Al respecto, la expresión basal de STAT1 al inicio del tratamiento es 8.6 veces mayor en el citosol que en el núcleo; pero a las 24 horas es solo 2.9 veces mayor, a pesar del incremento observado, lo que indica que hay mayor movilidad de la proteína STAT1 del citosol al núcleo en esos tiempos.

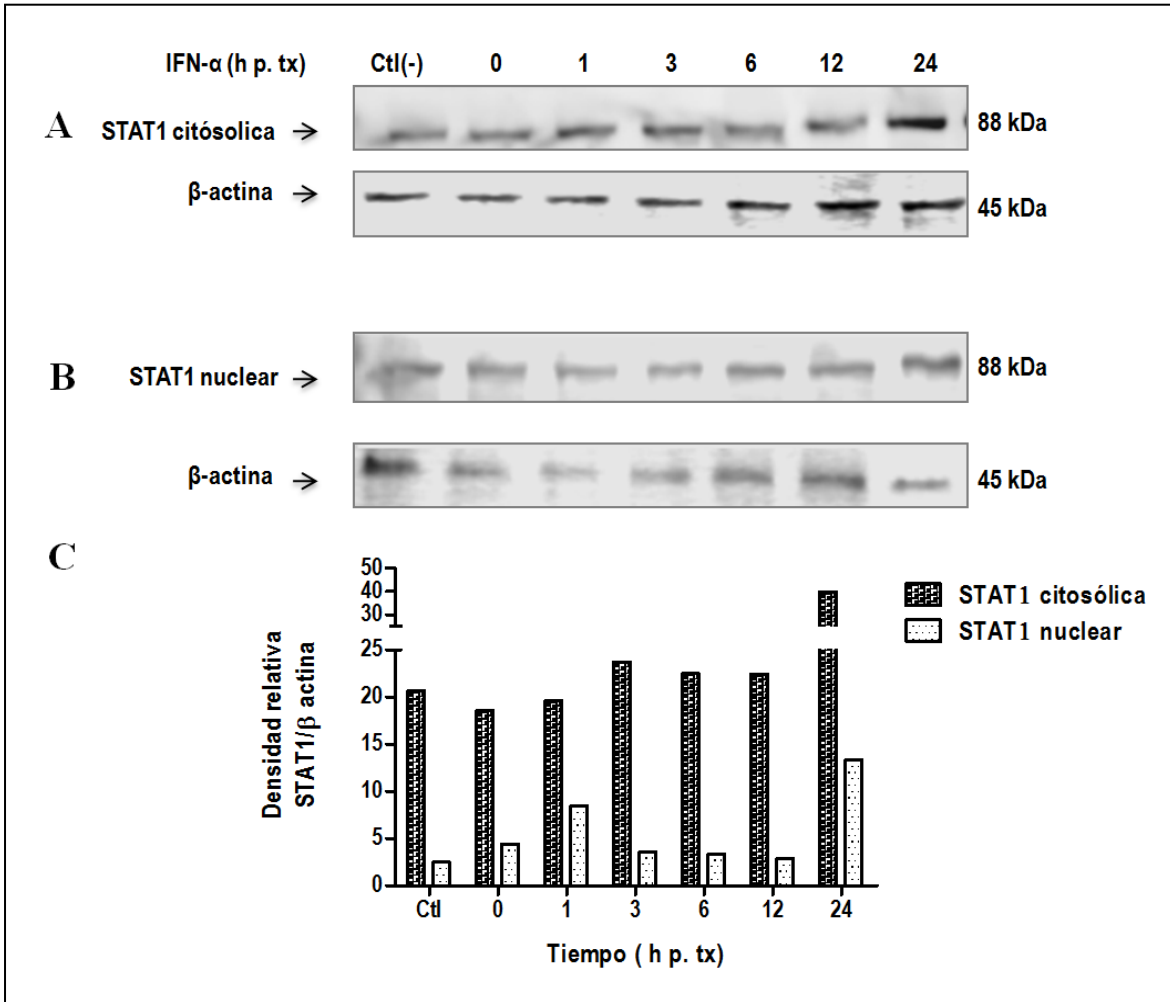


Figura 10. Cinética de expresión de la proteína STAT1 en células tratadas con IFN- α , analizada por Western blot. A) Fracción citosólica. B) Fracción nuclear. C) Valores de densitometría de STAT1 normalizados respecto a β -actina. Ctl (-) control negativo células sin IFN; los carriles 0, 1, 3, 6, 12 y 24 indican horas posteriores al tratamiento (h.p. tx) con IFN- α .

En la Figura 11 se presentan los resultados de WB para la proteína STAT2 en las células U-937-DC tratadas con IFN- α . Se observa la banda correspondiente a la proteína STAT2 (113 kDa) en los carriles de células tratadas con IFN, pero no el control negativo al tratamiento, en las fracciones citosólicas (11A) y nuclear (11B). El análisis de densitometría (Figura 11C) muestra un aumento gradual en la expresión de STAT2 en el citoplasma, alcanzando la máxima expresión a las 6 horas posteriores al tratamiento. Mientras que la máxima expresión de STAT2 se observa 1 hora después del tratamiento en el núcleo. En general la expresión de STAT2 es muy baja (59 veces menor) si se compara con los valores de STAT1 mostrados en la Figura 10C.

7.6.2 Expresión de STAT1 y STAT2 en células infectadas con DENV-2.

En la Figura 12 se presentan los resultados de WB para la proteína STAT1 en las células U-937-DC infectadas con DENV-2. Se puede observar la banda correspondiente a la proteína STAT1 (88 kDa) en las fracciones citosólicas (12A) y nuclear (12B) en todos los carriles, incluyendo el control negativo a la infección (NI). El análisis de densitometría (Figura 12C) muestra que la expresión de STAT1 en las células infectadas con DENV-2 es relativamente menor (34 veces) que la inducida por el tratamiento con IFN (Figura 10C). Sin embargo, la presencia de bandas proteicas claras indica que el virus es un buen inductor de esta proteína, que muestra un pico de máxima expresión a las 6 horas p.i. en el citoplasma y una tendencia al incremento en el núcleo de las 3 a las 24 horas p.i. Estos resultados sugieren que hay poca movilidad de STAT1 hacia el núcleo al inicio de la infección, y que ésta se incrementa a las 24 horas en células U-937-DC infectadas.

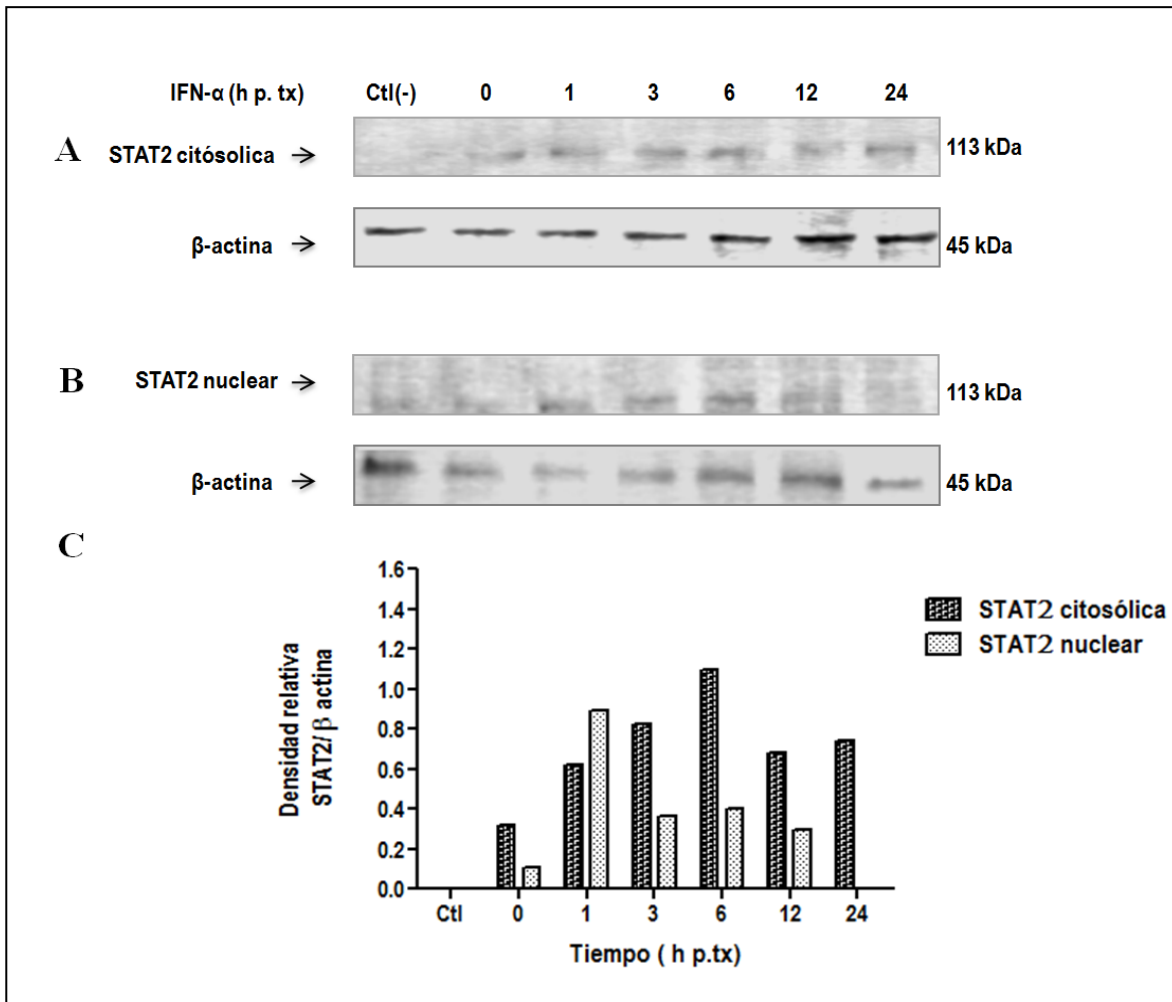


Figura 11. Cinética de expresión de la proteína STAT2 en células tratadas con IFN- α . **A)** Fracción citosólica. **B)** Fracción nuclear. **C)** Valores de densitometría de STAT2 citosólica y nuclear normalizados con respecto a β -actina. Carriles: Ctl (-), control negativo sin IFN. Los carriles 0, 1, 3, 6, 12 y 24 indican horas posteriores al tratamiento (h.p. tx) con IFN- α .

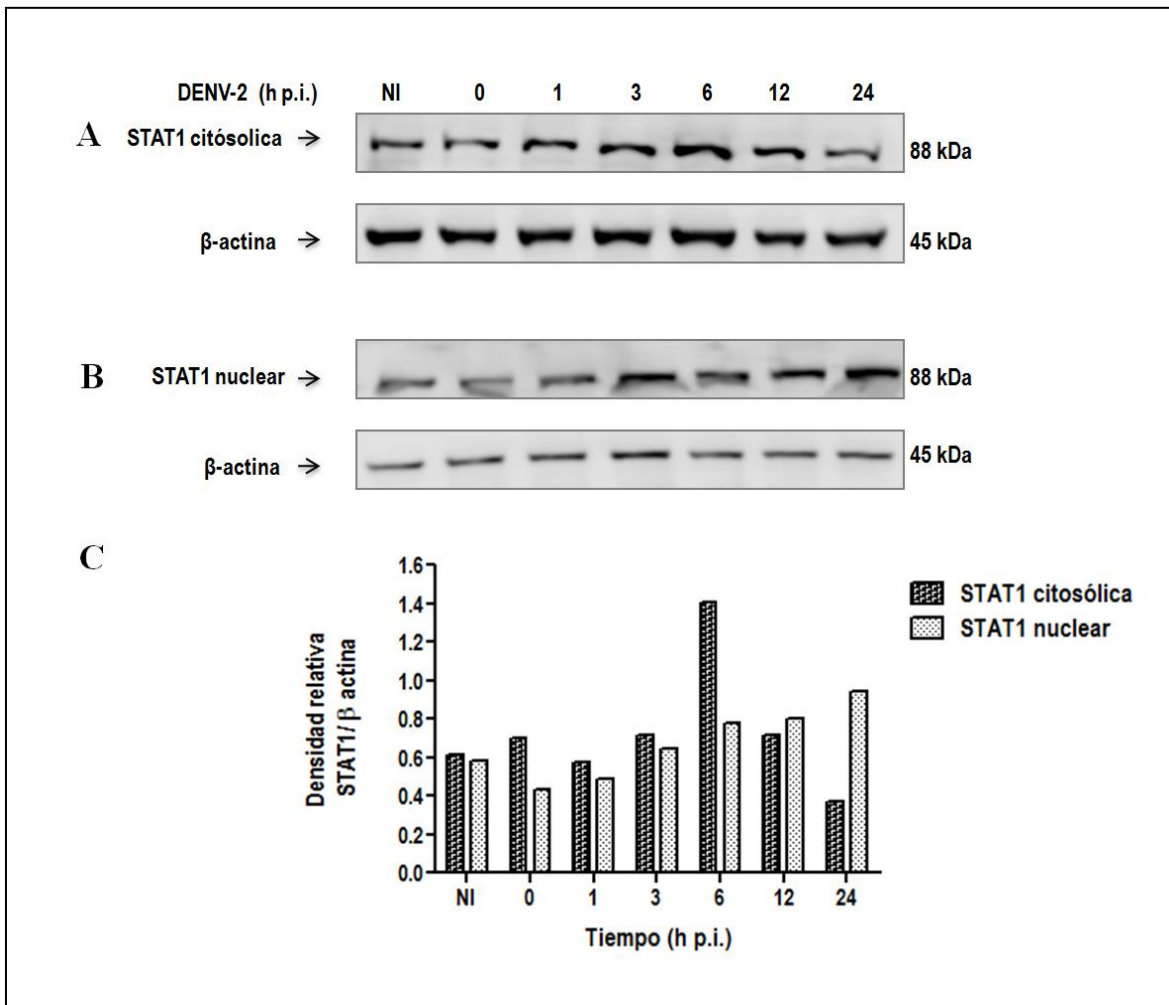


Figura 12. Cinética de expresión de la proteína STAT1 en células infectadas con DENV-2. A) Fracción citosólica. B) Fracción nuclear. C) Valores de densitometría de STAT1 citosólica y nuclear normalizados con respecto a β-actina. NI, no infectado. Los carriles 0, 1, 3, 6, 12 y 24 indican horas post infección.

En la Figura 13 se presentan los resultados de WB para la proteína STAT2 en las células U-937-DC infectadas con DENV-2. Se puede observar la ausencia total de la banda correspondiente a la proteína STAT2 (113 kDa) en todos los carriles de las fracciones citosólicas (13A), incluyendo el control negativo a la infección (NI). Sin embargo, se observan bandas muy tenues de STAT2 en el núcleo (13B). El análisis de densitometría (Figura 13C) muestra que hay expresión nuclear de STAT2 en las primeras 6 horas de infección; sin embargo, ésta es considerablemente menor que la inducida por el tratamiento con IFN (Figura 11C). La ausencia de la proteína STAT2 en el citoplasma es congruente con estudios que muestran que la proteína STAT2 es degradada a consecuencia de la infección con DENV.

7.6.3 Análisis comparativo de la expresión de STAT1 y STAT2.

Realizamos un análisis comparativo de la expresión entre las células U-937-DC tratadas con IFN- α y las infectadas con DENV-2. En la Figura 14 se aprecia que la expresión de las proteínas STAT1 es mayor en las células tratadas con IFN- α que en las infectadas: en promedio 34 veces en la fracción citosólica y 9 veces en la fracción nuclear. Pero presentan un nivel muy similar de expresión de STAT2 en la fracción nuclear. La baja expresión de STAT1 en células U-937-DC infectadas es congruente con su alta susceptibilidad a la infección por DENV.

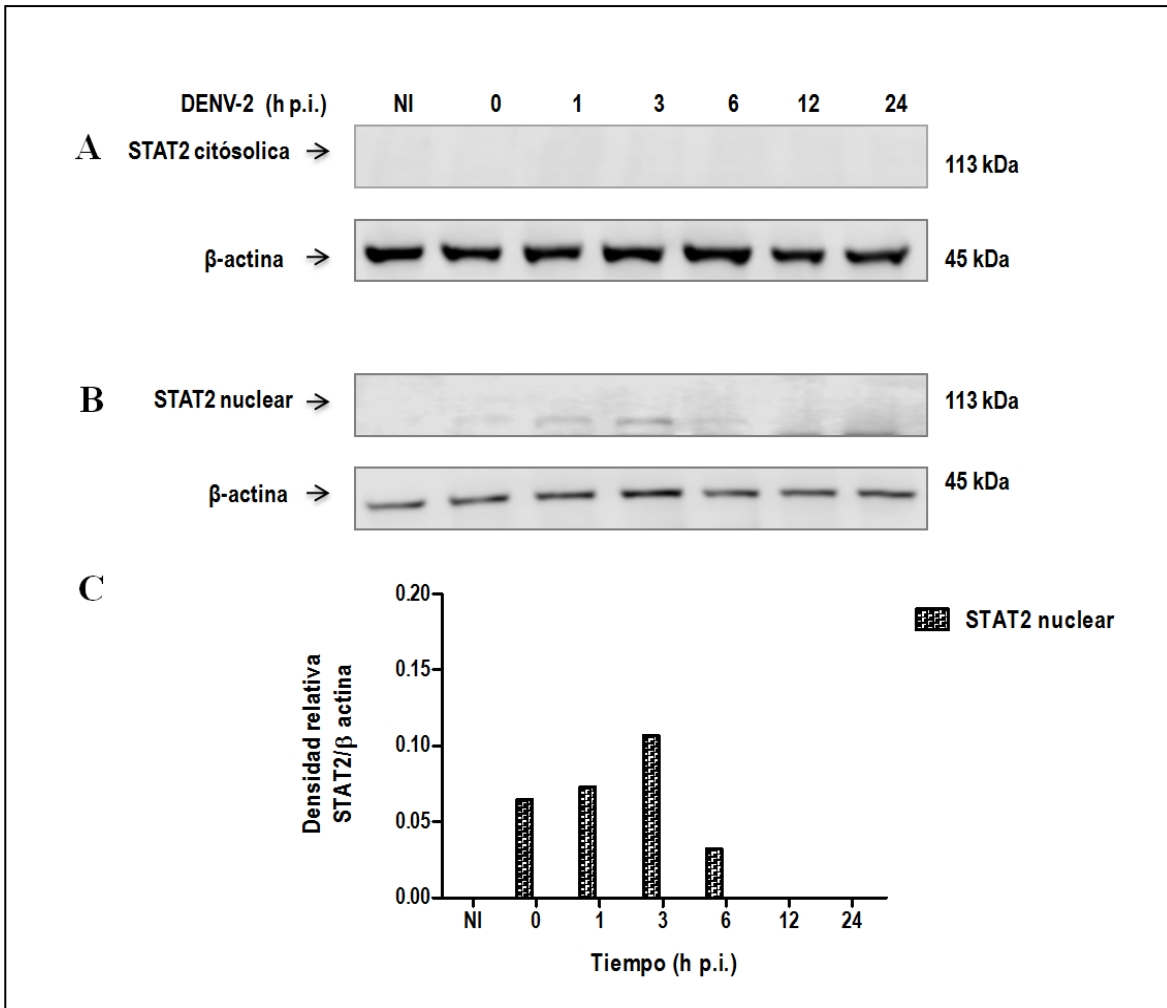


Figura 13. Cinética de expresión de la proteína STAT2 en células infectadas con DENV-2. A) Fracción citosólica. B) Fracción nuclear. C) Valores de densitometría de STAT2 normalizados contra β-actina. NI, no infectado. Los carriles 0, 1, 3, 6, 12 y 24 indican horas post infección.

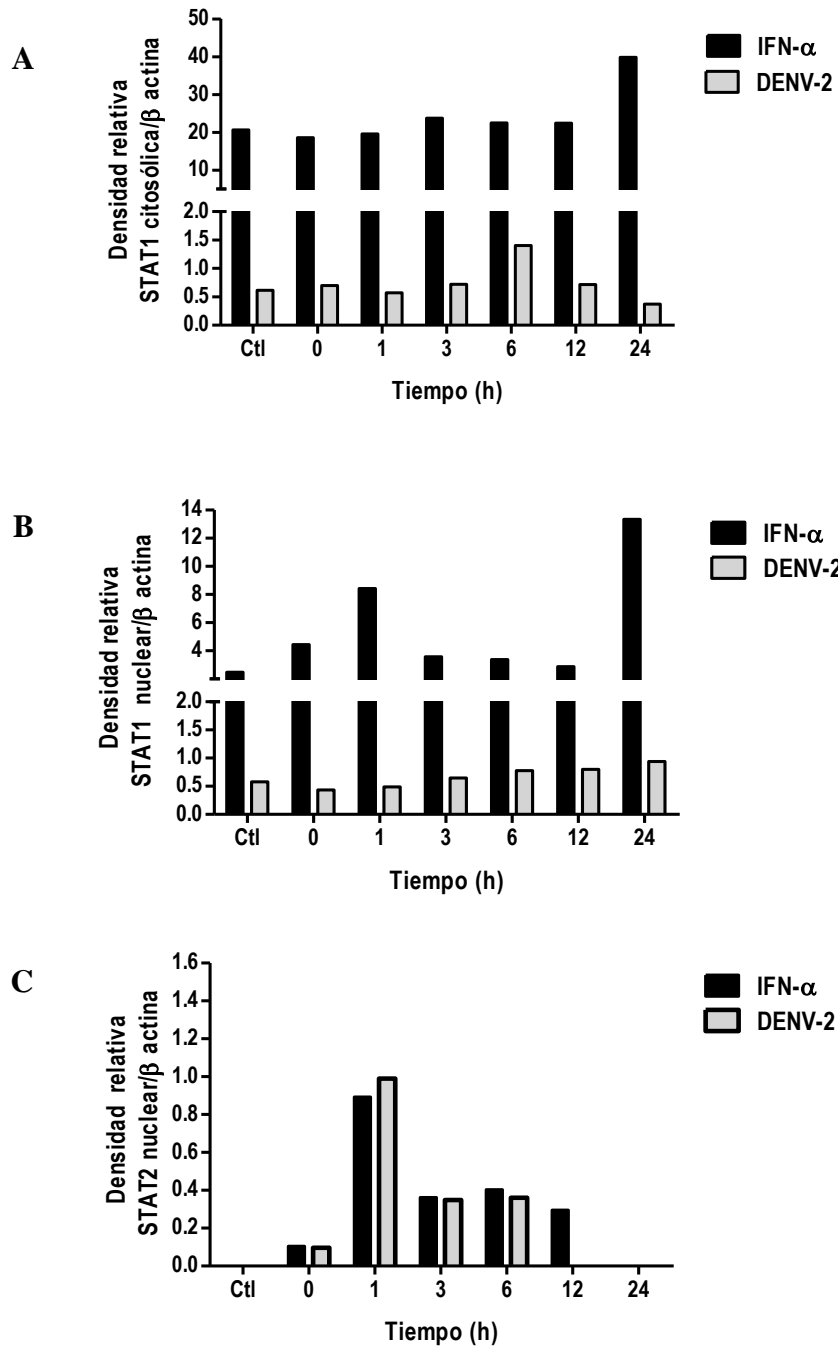


Figura 14. Análisis comparativo de los valores de densitometría para STAT1 citosólica (A) y nuclear (B) y para STAT2 nuclear (C). Se resaltan las diferencias en expresión entre las células tratadas con IFN- α y las células infectadas con DENV-2.

7.7 Identificación de proteínas que interactúan con p-STAT1

Con el objetivo de identificar proteínas celulares que forman complejos moleculares con p-STAT1 se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo contra p-STAT1 a partir de extractos de las fracciones citosólicas y nucleares de células U-937-DC tratadas con IFN- α durante 6h y de células infectadas con DENV-2 a las 12 horas p.i. Posteriormente se realizaron ensayos de *Western Blot* utilizando diversos anticuerpos contra proteínas celulares en la inmunodetección.

En la figura 15A se muestran las reacciones de reconocimiento con anticuerpos contra p-STAT2, se observan dos bandas tenues de ~150 kDa en la fracción nuclear de células con ambas condiciones. Estas bandas no corresponden al peso molecular esperado para la proteína p-STAT2 (113 kDa); pero son congruentes con la participación de p-STAT2 en la formación de heterodímeros con la proteína p48 o IRF9 que favorece el ingreso de las proteínas STAT al núcleo.

En la figura 15B se muestran las reacciones de reconocimiento con un anticuerpo contra p-STAT1; se observan las bandas correspondientes a la proteína p-STAT1 (93 kDa) en el núcleo de ambas condiciones y en el citoplasma de las células infectadas.

Con el fin de identificar la interacción de p-STAT1 con proteínas encargadas de la importación al núcleo de complejos moleculares, se realizó la inmunodetección con anticuerpos contra la 5 α -Importina; teóricamente encargada de la importación del complejo ISGF3 compuesto por p-STAT1, p-STAT2 e IRF-9. La Figura 15C muestra la ausencia de bandas correspondientes a la 5 α -Importina (65 kDa).

Debido a que durante la infección con DENV-2 se ha observado sobreexpresión de las proteínas supresoras de señales de citocinas SOCS1 y SOCS3 que inhiben la actividad de

las JAK cinasas que fosforilan a STAT, se pensó que podrían establecer interacciones estables con p-STAT1 inhibiendo su entrada al núcleo. En la Figura 15D se observan bandas muy tenues de reacción con el anticuerpo contra SOCS3 (27 kDa) en la fracción nuclear de células tratadas con IFN y en las fracciones nuclear y citoplásmica de células infectadas con DENV-2. Sin embargo, no se observan bandas correspondientes a SOCS1 (23 kDa) en la Figura 15E.

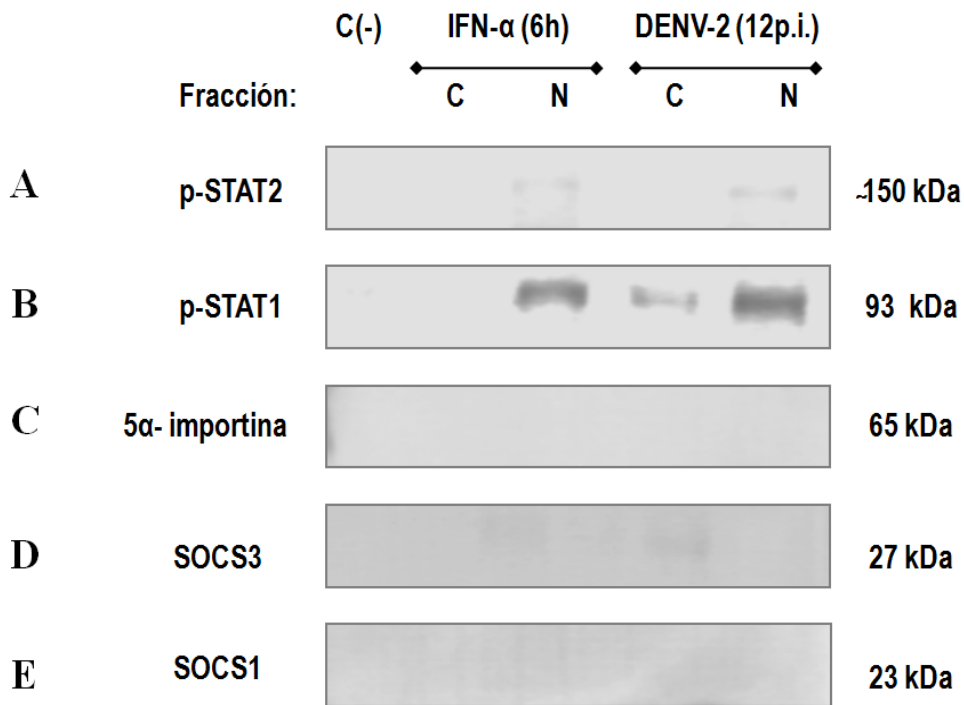


Figura 15. Ensayos de inmunoprecipitación (IP) de las fracciones citoplásmicas (C) y nucleares (N) de células U-937-DC tratadas con IFN- α o infectadas con DENV-2. Para la IP se utilizaron anticuerpos contra p-STAT1. La inmunodetección se realizó con anticuerpos contra: **A.** p-STAT2 (113 kDa), **B.** p-STAT1 (91 kDa), **C.** 5 α -Importina (65 kDa), **D.** SOCS3 (27 kDa) y **E.** SOCS1 (23 kDa). C(-) Control negativo sin anticuerpo de IP.

Finalmente, se trató de identificar la posible interacción de las proteínas virales NS4B y NS5 con la proteína p-STAT1. En la Figura 16A se muestra que la proteína STAT1 se encuentra presente tanto en el citoplasma como en el núcleo de células infectadas con DENV-2 a las 12h p.i. No se observaron bandas correspondientes a la proteína NS5 (103 kDa) (Figuras 16B). Sin embargo, en la Figura 15C se logra apreciar la presencia de una banda muy tenue que posee un peso molecular de 25.7 kDa, esto no descarta la posibilidad de que se trate de la proteína NS4B con peso molecular de 27 kDa.

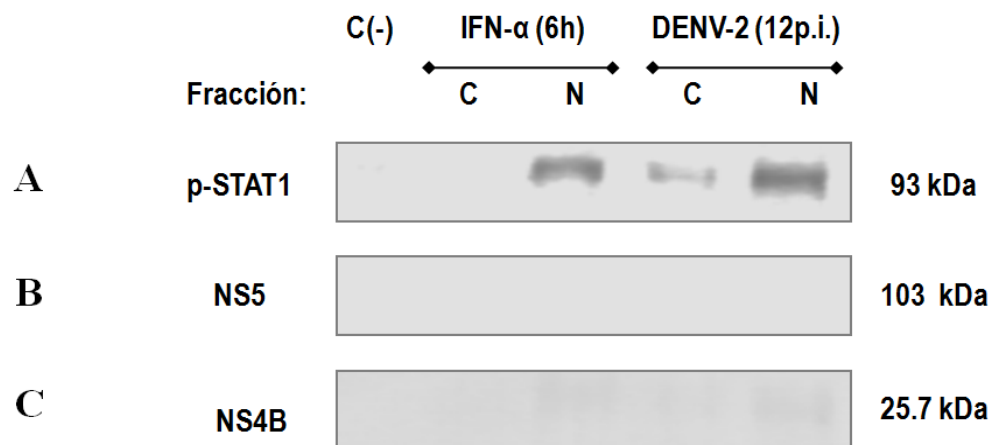


Figura 16. Ensayos de Inmunoprecipitación (IP) de las fracciones citoplásmicas (C) y nucleares (N) de células U-937-DC tratadas con IFN- α o infectadas con DENV-2. Para la IP se utilizaron anticuerpos contra p-STAT1. La inmunodetección se realizó con anticuerpos contra **A.** p-STAT1 (93 kDa), **B.** NS5 (103 kDa) y **C.** NS4B (27 kDa). C(-), Control negativo sin anticuerpo de IP.

8. DISCUSIÓN

Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune durante la infección con el virus de dengue son actualmente un gran tema de estudio. Estos mecanismos dan la pauta al entendimiento de la patogenicidad causada por el DENV y sirven para identificar posibles blancos terapéuticos para controlar la infección.

Hoy en día diversos estudios han demostrado como las proteínas virales NS2A, NS4A, NS4B y NS5 son capaces de inhibir las señales inducidas por IFN, a través de su interacción con proteínas celulares como son STAT1 y STAT2.

Del mismo modo, se ha logrado identificar el secuestro de estas proteínas, en especial de STAT1 en el citoplasma en macrófagos U-937 (Estrada-Jiménez *et al.*, 2016). A fin de corroborar este suceso en macrófagos U-937-DC-SIGN, primero se evaluó la capacidad de replicación del DENV-2 en células U-937-DC-SIGN comparada con la línea celular parental U937 (que le dio origen). Se sabe que las células U-937 tienen baja permisividad a la infección con DENV-2 (7.3%) en comparación con otras líneas celulares como C6/36 que son altamente permisivas (74.8%) (Diamond *et al.*, 2000; Lambeth *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos corroboran que el DENV-2 se replica en forma ineficiente en macrófagos U-937 en comparación con lo observado en células U-937-DC-SIGN donde utilizando la misma concentración de partículas virales para inocular las células se obtienen 100 veces más UFP, lo que hace a esta línea altamente permisiva a la infección. Esto es debido a que la línea celular U-937-DC-SIGN fue transfectada establemente con el receptor DC-SIGN (CD209), una lectina tipo C presente constitutivamente en las células dendríticas y que vuelve a los macrófagos U-937 más susceptibles a la infección por el DENV (Tassaneetrithep *et al.*, 2003).

A fin de evidenciar la infección en macrófagos U-937-DC-SIGN se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, para identificar la presencia de la proteína prM. Simultáneamente se realizó la localización celular de la proteína STAT1 mediante inmunofluorescencia. De esta forma, se evidenció que durante la infección viral p-STAT1 entra al núcleo en la línea celular U-937-DC-SIGN a diferencia de lo encontrado en la línea U-937 (Estrada-Jiménez *et al.*, 2016).

Con el fin de determinar si las proteínas STAT1 y STAT2 eran retenidas en el citoplasma de los macrófagos infectados con DENV-2, se realizaron ensayos de *Western blot* a diferentes tiempos post-infección, comparando contra la activación de la vía inducida por IFN- α . Se conoce que STAT1 a diferencia de STAT2 se encuentra de forma basal en el citoplasma, pero necesita ser fosforilada y formar dímeros para poder ser importada al núcleo, en donde una vez cumplida su función se desfosforila para ser exportada nuevamente al citoplasma por la exportina CRM1 (por sus siglas en inglés Chromosome Region Maintenance 1) y Ran GTP a fin de evitar su acumulación nuclear (Darnell, 1997; Reich and Liu, 2006). Con base a lo anterior, se logró determinar la presencia de STAT1 tanto en el citoplasma como en el núcleo celular en las dos condiciones antes mencionadas, hecho que demuestra la entrada de STAT1 al núcleo. Sin embargo, a diferencia de STAT1, STAT2 sólo se encontró en el núcleo de las células infectadas con DENV-2 de 1 a 6 horas después de la infección. Pero estuvo presente en citoplasma y núcleo de las células tratadas con IFN- α . Los análisis de densitometría permitieron identificar una reducción notable en la expresión de las proteínas STAT en las células infectadas. Lo que concuerda con estudios realizados en diversas líneas celulares THP1, K562, 293T, A549 y macrófagos U-937 que demuestran que los niveles de expresión de la proteína STAT2 se reducen o desaparecen por completo en las células infectadas con el DENV-2, mientras que los niveles de STAT1

se mantienen sin cambio (Jones *et al.*, 2005; Ashour *et al.*, 2009; Morrison *et al.*, 2013; Estrada-Jiménez *et al.*, 2016). En nuestro estudio los niveles de expresión de STAT1 muestran una disminución muy marcada en las células infectadas. Estos datos concuerdan con evidencias que demuestran que el DENV es capaz de disminuir los niveles de la proteína STAT1 en su forma fosforilada en las líneas celulares A549, K562, THP1, U-937, LLCMK2 y Vero a fin de evitar su entrada al núcleo y por ende, la transcripción de genes con funciones antivirales (Muñoz-Jordán *et al.*, 2003; Estrada-Jiménez *et al.*, 2016).

Nuestros resultados mostraron que STAT2 es el principal transductor de señales afectado por la infección con DENV-2 en la línea celular U-937-DC-SIGN. Esto sugiere que la susceptibilidad de esta línea celular se debe a que se está llevando a cabo un mecanismo de evasión de la respuesta mediada por IFN. Es importante recalcar que se necesita de la unión de STAT2 activado por fosforilación para que STAT1 pueda unirse a ella y ser activada para formar el complejo ISGF3 que actuará como factor de transcripción de genes de respuesta antiviral; esto hace a STAT1 dependiente de STAT2, pero no viceversa (Leung, 1995).

Por otro lado, se trató de identificar la posible interacción de proteínas celulares que interactúan con el complejo de importación de STAT1 entre ellas STAT2 y la 5 α -Importina también conocida como KPNA-1 ó NPI-1 (por sus siglas en inglés karyopherin subunit alpha 1). Considerando que esta proteína reconoce y se une a las señales de localización nuclear (NLS) presentes en los dominios de unión a ADN de los dímeros de STAT1; para posteriormente heterodimerizarse a través de su dominio N-terminal con la β -importina, proteína que interacciona con el complejo del poro nuclear para transportar los dímeros de STAT1 al núcleo (Nardozzi *et al.*, 2010). En nuestros ensayos de IP no logramos identificar la presencia de p-STAT2 en el complejo molecular precipitado con el anticuerpo p-STAT1,

esto puede deberse por un lado a que las células infectadas presentaban nula expresión de STAT2 como ya se ha mencionado. Sin embargo, en los ensayos de IP detectados con anticuerpos contra p-STAT2 se observaron dos bandas con un peso molecular superior a 150 kDa, esto hace sugerir que se formaron complejos de STAT2 (113 kDa) con la proteína IRF-9 que tiene un peso molecular de 48 kDa. Sin embargo, esto debe confirmarse experimentalmente.

En nuestros ensayos no logramos detectar a la 5 α -importina. Esto puede explicarse por datos obtenidos con la proteína VP24 del virus del Ebola que indican que actúa como un inhibidor competitivo de la unión de STAT1 con la 5 α -importina interfiriendo de forma directa con su importación (Daugherty and Malik, 2014). Además, hay estudios donde se ha encontrado que la proteína NS5 es capaz de unirse al complejo 5 α -importina/ β -importina para translocarse al núcleo con el fin de reducir la producción de la IL-8 que afecta a su vez la replicación viral (Johansson *et al.*, 2001; Rawlinson *et al.*, 2009).

Por otra parte, tratamos de identificar si las proteínas supresoras de señales SOCS1 y SOCS3 estaban formando parte del complejo de importación con p-STAT1 durante la infección con DENV-2. Esta hipótesis surgió en estudios previos de nuestro grupo en los que se encontró que las proteínas SOCS1 y SOCS3 fueron fuertemente inducidas durante la infección con DENV-2, lo que coincidió con el hallazgo de que la translocación de p-STAT1 se detenía en macrófagos U-937 infectados con DENV (Estrada-Jiménez *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos en la IP muestran que no hubo interacción con SOCS1, pero sugieren que la proteína SOCS3 se encuentra formando parte del complejo con p-STAT1. Sin embargo, la baja señal observada en los experimentos con SOCS3 no nos

permite sacar conclusiones irrefutables. Al respecto, es necesario repetir y mejorar las condiciones de estos experimentos para confirmar la información.

Se ha visto que SOCS1 se une directamente al bucle de activación de las cuatro JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2) a través de su dominio SH2 que interactúa con la tirosina 1007 fosforilada presente en el dominio JH1 de JAK (Auernhammer and Melmed, 2001). A diferencia de SOCS1, SOCS3 sólo es capaz de inhibir a las proteínas JAK1, Tyk2 y en menor afinidad a JAK2. Esto se debe a la presencia de un motivo conservado de tres residuos (GQM, en la posición 1071-1073) que se encuentra en el asa de inserción de estas tres proteínas (Babon *et al.* 2012). Tanto SOCS1 como SOCS3 pueden inhibir directamente la actividad de tirosina-cinasa de las proteínas JAK, probablemente a través de su dominio KIR que puede funcionar como un pseudosustrato de JAK, por poseer un residuo de tirosina esencial para la unión de SOCS1 y SOCS3 con el dominio JH1 de JAK (Yoshimura and Yasukawa, 2012). Hasta donde abarca nuestro conocimiento, no existen experimentos ni predicciones de la estructura molecular que hayan explorado la posibilidad de que las proteínas SOCS3 interactúen directamente con p-STAT1, pero esto no descarta la probabilidad de que ocurra dicha interacción.

Otra serie de experimentos de IP se realizaron con el fin de identificar si la proteína p-STAT1 se encontraba interactuando con las proteínas virales NS4B y NS5. Nuestros resultados fueron negativos al respecto. Esta posible interacción se abordó por otros grupos en células 293T en donde se confirmó que NS5 no es capaz de unirse a STAT1, pero sí se une específicamente a STAT2. Esta interacción conduce al marcaje de STAT2 con ubiquitinas y promueven su degradación por vía proteasomal (Ashour *et al.*, 2009; Morrison *et al.*, 2013). En cuanto a NS4B, solamente se ha demostrado el secuestro de STAT1 en el citoplasma celular, mediante ensayos de inmunofluorescencia en células Vero transfectadas

con el plásmido de expresión de NS4B de DENV-2, junto con un segundo plásmido que expresa una proteína de fusión (GFP) unida a STAT1 (Muñoz-Jordán *et al.*, 2003; Muñoz-Jordán *et al.*, 2005).

8 CONCLUSIONES

- La línea celular U-937-DC-SIGN es más permisible a la infección con el virus de dengue comparada con la línea celular U-937 porque muestra una baja expresión de proteínas STAT1 fosforiladas y nula presencia de STAT2, lo cual no le permite establecer una respuesta antiviral efectiva.
- La expresión de STAT2 se ve afectada durante la infección con el DENV-2.
- Los resultados obtenidos muestran que el importe de la proteína p-STAT1 al núcleo no es inhibido por el virus de dengue.
- Los resultados obtenidos no permiten concluir si la proteína supresora de señales de citocinas SOCS3 forma complejos con la proteína p-STAT1.
- La proteínas NS4B y NS5 no forman complejos con la proteína p-STAT1 durante la infección con el DENV-2.

9 PERSPECTIVAS

- Definir la interacción precisa entre los componentes de la vía JAK- STAT y las proteínas del DENV-2 mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas MALDI-TOF.
- Identificar las proteínas celulares y nucleares con las que interacciona la proteína p-STAT1, que podrían ser reguladores negativos sobre expresados durante la infección con el DENV-2 tales como PIAS o algunas fosfatasa presentes tanto en el núcleo como en el citoplasma.
- Diseñar otras estrategias experimentales para identificar las proteínas celulares o virales que forman complejos y afectan las funciones de las proteínas STAT durante la infección viral.

10 BIBLIOGRAFIA

Acosta-Bas C y Gómez-Cordero I. 2005. Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Revista Biomédica*. 16:113-137.

Álvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S and Gamarnik AV. 2005. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*. 339: 200-212.

Anderson R. 2003. Manipulation of cell surface macromolecules by flavivirus. *Advances in Virus Research*. 59: 229-274.

Ashour J, Rolle ML, Shi PY and García-Sastre A. 2009. NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation. *Journal of Virology*. 83:5408–5418

Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, Stuart DI, Grimes JM and Mancini EJ. 2009. Crystal Structure of Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication. *Journal of Virology*. 83:12895-12906.

Auernhammer CJ and Melmed S. 2001. The central role of SOCS-3 in integrating the neuro-immunoendocrine interface. *The Journal of Clinical Investigation*. 108:1735–1740.

Babon JJ, Kershaw NJ, Murphy JM, Varghese LN, Laktyushin A, Young SN, Lucet IS, Norton RS and Nicola NA. 2012. Suppression of Cytokine Signaling by SOCS3: Characterization of the Mode of Inhibition and the Basis of Its Specificity. *Immunity*. 36: 239–250.

Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, van der Weyden L, Fikrig E, Adams DJ, Ramnik JX, Farzan M and Elledge SJ. 2009. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*. 139:1-22.23.

Bode JG, Brenndörfer DE and Häussinger D. 2007. Subversion of Innate Host Antiviral Strategies by the Hepatitis C Virus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 462: 254-265.

Carrington LB and Simmons CP. 2014. Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Frontiers in Immunology*. 5: 1-8

Coccia EM, Del Russo N, Stellacci E, Testa U, Marziali G and Battistini A. 1999. STAT1 activation during monocyte to macrophage maturation: role of adhesion molecules. *International Immunology*. 11: 1075–1083.

Cruz Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MA, and Da Poian AT. 2015. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*. 39: 155-170.

Darnell JE. 1997. STATs and Gene Regulation. *Science*. 277:1630-1635.

Darnell JE, Kerr IM, and Stark GR. 1994. Jak-STAT Pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 264: 1414-1421.

Daugherty MD and Malik HS. 2014. How a Virus Blocks a Cellular Emergency Access Lane to the Nucleus, STAT. *Cell Host & Microbe*. 16:150-152.

Del Ángel RM. 2006. Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral. *Cinvestav*. 38-43.

Diamond, MS. 2003. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by Flavivirus. *Immunology and Cell Biology*. 81: 196-206.

Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B and Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *Journal of Virology*. 2000;74:7814–7823.

Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J and Harris E. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *Journal of Virology*. 74: 4957–4966.

Estrada-Jiménez T, Millan-Pérez L, Flores-Mendoza L, Sedeño-Monge V, Santos-López G, Rosas-Murrieta N, Reyes-Carmona S, Terán-Cabanillas E, Hernández J, Herrera-Camacho I, Vallejo-Ruiz V, and Reyes-Leyva J. 2016. Upregulation of the Suppressors of Cytokine Signaling 1 and 3 Is Associated with Arrest of Phosphorylated-STAT1 Nuclear Importation and Reduced Innate Response in Dengue virus Infected Macrophages. *Viral Immunology*. 29: 1-10.

Goodbourn S, Didcock L and Randall RE. 2000. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*. 81: 2341–2364.

Guzmán GM and Harris Eva. 2015. Dengue. *The lancet*. 385:453-465.

Halstead SB and Simasthien P. 1970. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale Journal Biology and Medicine*. 42: 276-292.

Helbig KJ, Carr JM, Calvert JK, Wati S, Clarke JN, Eyre NS, Narayana SK, Fiches GN, McCartney EM and Beard MR. 2013. Viperin is induced following dengue virus type-2 (DENV-2) infection and has anti-viral actions requiring the C-terminal end of viperin. *PLOS Neglected Tropical Diseases*.7: 1-14.

Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, Chang DM, Tai TY and Lai JH. 2005. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk-2 STAT signaling in the human dendritic cell. *The Journal of Immunology*. 174: 8163-8172

Horvath CM. 2000. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Elsevier Science*. 25:496-502.

Hsu YL, Shi SF, Wu WL, Ho LJ, Lai JH. 2013. Protective Roles of Interferon-Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 3 (IFIT3) in Dengue Virus Infection of Human Lung Epithelial Cells. *PLOS ONE*. 8: 1-13.

Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR , and Red EP. 2011. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes y Cancer*. 1:979-993.

Jerke U, Tkachuk, Kiyan J, Stepanova V, Kusch A, Hinz M, Dietz R, Haller H, Fuhrman B and Dumler I. 2009. Stat1 Nuclear Translocation by Nucleolin upon Monocyte Differentiation. *PLOS ONE*. 4:1-13.

Jiang D, Weidner JM, Qing M, Pan XB, Guo H, Xu C, Zhang X, Birk A, Chang J, Shi PY, Block T and Guo JT. 2010. Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections. *Journal of Virology*. 84:8332–8341.

Johansson M, Brooks AJ, Jans DA and Vasudevan SG. 2001. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- β and the viral helicase, NS3. *Journal of General Virology*. 82: 735–745.

Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, Foster GR and Jacobs M. 2005. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *Journal of Virology*. 79:5414-5420.

Kouri GP, Guzman MG and Bravo JR. 1987. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba. An integral analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 81: 821-823.

Lambeth CR, White LJ, Johnston RE, De Silva AM. 2005. Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:3267–3272

Leonard WJ and O'Shea JJ. 1998. Jaks and STATs: Biological implications. *Annual Review of Immunology*. 16: 293-322.

Leonard WJ. 2001. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nature Reviews Immunology*. 1:200-208.

Lescar J and Lok SM. 2014. The Structural Biology of Dengue Virus. *Research Gate*. 366-376.

Leung S, Qureshi SA, Kerr IM, Darnell JE and Stark G. 1995. Role of STAT2 in the Alpha Interferon Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 15: 1312–1317.

Levy DE and Darnell JE. 2002. STATS: Transcriptional control and biological impact. *Molecular Cell Biology*. 3: 651-662.

Li X, Leung S, Kerr IM and Stark GR. 1997. Functional Subdomains of STAT2 Required for Preassociation with the Alpha Interferon Receptor and for Signaling. *Molecular Cellular and Biology*. 17: 2048-2056.

Limjindaporn T, Wongwiwat W, Noisakran S, Srisawat C, Netsawang J, Puttikhunt C, Kasinrerk W, Avirutnan P, Thiemmecca S, Sriburi h R, Sittisombut N, Malasit P and Yenchitsomanus P. 2009. Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 379: 196–200.

Lindenbach BD and Rice CM. 2003. Molecular biology of Flaviviruses. *Advances in Virus Research*. 59: 23-61.

McBride KM, Banninger G, McDonald C and Reich NC. 2002. Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- α . *The EMBO Journal*. 21: 1754–1763.

Modis Y, Ogata S, Clements D and Harrison SC. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 427: 313-319.

Morrison J and García-Sastre A. 2014. STAT2 signaling and dengue virus infection. *Landesbioscience*. 3:e27715-1 -e27715-6.

Morrison J, Rolle LM, Maestre AM, Rajsbaum R, Pisanelli G, Simon V, Mulder LC, Fernández-Sesma A and García-Sastre A. 2013. Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLOS Pathogens*. 9:1-13.

Mukopadhyay S, Kuhn RJ and Rossman MG. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature*. 3: 13-22.

Muñoz-Jordán JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *PNAS USA*. 100:14333–14338.

Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin I and García-Sastre A. 2005. Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. *Journal of Virology*. 79: 8004-8013

Myint KS, Nisalak A, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Innis BL. 1991. Six hour laboratory confirmation of dengue. Antigen detection in peripheral blood mononuclear cells by immunohistochemistry. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 63:173-181.

Nardoizzi JD, Lott K and Cingolani G. 2010. Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Communication and Signaling*. 8:1-17.

Organización Mundial de la Salud. Dengue y dengue grave 2016. [Consultado diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>

Oshansky CM, Krunkosky TM, Barber J, Jones LP and Tripp RA. 2009. 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 Immunology*. 22: 147-161.

Pagni S and Fernandez-Sesma A. 2012. Evasion of the human innate immune system by dengue virus. *Immunologic research*. 54: 152-159.

Perera R and Kuhn R. 2008. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Current Opinion in Microbiology*. 11: 369-377.

Platanias LC. 2005. Mechanisms of type-I- and type II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*. 5:375-386.

Pothlichet J, Chignard M and Si-Tahar M. 2008. Cutting Edge: Innate Immune Response Triggered by Influenza A Virus Is Negatively Regulated by Socs1 and Socs3 through a Rig-I/Ifnar1-Dependent Pathway. *The Journal of Immunology*. 180: 2034-2038.

Rawlinson S M, Pryor M J, Wright PJ and Jans DA. 2009. CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. *The Journal of Biological Chemistry*. 284, 15589–15597.

Reich NC. 2013. STATs get their move on. *Landes Bioescience*. 2:1-9

Reich NC and Liu L. 2006. Tracking STAT nuclear traffic. *Nature Reviews Immunology*. 6:602-612.

Rodríguez-Madoz JR, Belicha-Villanueva A, Bernal-Rubio D, Ashour J, Ayllon J, Fernandez-Sesma A. 2010. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. *Journal of Virology*. 84:9760–9774.

Rodríguez-Madoz JR, Bernal-Rubio D, Kaminski D, Boyd K, Fernández-Sesma A. 2010. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. *Journal of Virology*. 84:4845–50.

Rosen L. 1986. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever: a critical appraisal of current hypotheses. *The South African Medical Journal*. 40-42.

Schoggins JW, Dorner M, Feulner M, Imanaka N, Murphy MY, Ploss A and Rice CM. 2012. Dengue reporter viruses reveal viral dynamics in interferon receptor-deficient mice and sensitivity to interferon effectors in vitro. *PNAS*. 109:14610–14615.

Semper C, Leitner NR, Lassnig C, Parrini C, Mahlaköiv T, Rammerstorfer M, Lorenz K, Rigler D, Müller S, Kolbe T, Vogl C, Rüllicke T, Staeheli P, Decker T, Müller M, and Strobl B. 2014. STAT1 Is Not Dominant Negative and Is Capable of Contributing to Gamma Interferon-Dependent Innate Immunity. *Molecular and Cellular Biology*. 34:2235-2248.

Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S and Roberts C. 2015. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews Immunology*. 15:745-759.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), Secretaría de Salud. PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE DENGUE 2010-2016. [Consultado diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/panodengue/>

Shuai K. 2006. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Research*. 16:196-202.

Shuai K and Liu B. 2003. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 3:900-910.

Steen HC and Gamero AM. 2013. STAT2 phosphorylation and signaling. 2 : e25790-1-e25790-8.

Sundström C and Nilsson K. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer*. 17:565-577.

Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, and Marovich MA. 2003. DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 197: 823–829.

Valle-Mendiola A y Soto-Cruz I. 2005. Vía JAK-STAT: Una visión general. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 8:14-25.

Velandia ML y Castellanos JE. 2011. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*.15: 33-43.

Walker T, Jeffries C, Mansfield K and Johnson N. 2014. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasites & Vectors*. 7:1-9.

Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt V, Silvennoinen O and O'Shea Y. 2004. The Janus kinases (Jaks). *Genoma Biology*. 5: 1-6.

Yabar BV. 2003. Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación del ARN. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 20: 51-56.

Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Miura S, Jimbow K and Fujii N. 2004. Induction of Suppressor of Cytokine Signaling-3 by Herpes Simplex Virus Type 1 Contributes to Inhibition of the Interferon Signaling Pathway. *Journal of Virology*. 78: 6282-6286.

Yung CF, Lee KS, Thein TL, Tan LK, Gan V, Wong J, Lye DC, Ng LC and Leo Y. 2015. Dengue Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestation, Laboratory Parameters and Risk of Severe Disease in Adults, Singapore. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 92: 999–1005.

11 ANEXOS

ANEXO 1

- **Reactivo de Bradford**

Reactivos	1 L
Azul de Coomassie G-250	100 mg
Etanol al 95%	50 mL
Acido ortofosfórico al 85%	100 mL
dH2O	c.b.p. 1L

ANEXO2

MÉTODO DE LAEMMLI

- Gel separador al 10% de acrilamida:

Reactivos	c.b.p. 5mL
dH ₂ O	1.9mL
30% acrilamida	1.7mL
1.5 M Tris (pH8.8)	1.3mL
10% SDS	50 µL
10% Persulfato de Amonio	50 µL
TEMED	2 µL

- Gel concentrador :

Reactivos	c.b.p. 1.8 mL
dH ₂ O	712 µL
30% acrilamida	417 µL
1 M Tris (pH 6.8)	625 µL
10% SDS	25 µL
10% Persulfato de Amonio	15 µL
TEMED	6 µL

- Buffer de carga o Laemmli 4X:

Reactivos
240 mM Tris HCl pH 6.8
40% Glicerol
8% SDS
5% β-mercaptoetanol
0.04% azul de bromofenol

ANEXO 3

- **Tampón de corrida:**

Reactivos	500 mL
Tris base	1.514 g
Glicina	7.2 g
SDS	0.5 g

ANEXO 4

- **Tampón de transferencia:**

Reactivos	1 L
Tris base	3.03 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 mL
SDS	0.5 g
dH₂O	c.b.p. 1L

- **TBS-Tween al 0.05%:**

Reactivos	500 mL
NaCl 5 M	15 mL
Tris 1 M pH 7.5-8	12.5 mL
0.1% Tween	500 µL
dH₂O	c.b.p. 500 mL

- **Soluciones de bloqueo:**

- a) **Leche en polvo Svelty al 5%**

TBS- Tween 0.05% (mL)	Leche (g)
1	0.05
2	0.1
3	0.15
4	0.2
5	0.25
10	0.5
15	0.75
20	1
30	1.5
40	2
50	2.5

- b) **BSA al 3%**

TBS- Tween 0.05% (mL)	BSA (g)
1	0.03
2	0.06
3	0.09
4	0.12
5	0.15
10	0.3
15	0.35
20	0.6
30	0.9
40	1.2
50	1.5

- **Solución de Stripping:**

Reactivos	1 L
Glicina pH 2.2	15 g
SDS	1 g
Tween 20	10 mL

- **Soluciones de tinción y desteñido**

- a) **Solución de Ponceau**

Reactivos	100 mL
Rojo de Ponceau	0.5 g
Ac. acético glacial	1 mL
dH₂O	c.b.p.100 mL

- b) **Solución de Coomassie:**

Reactivos	100 mL
Azul de Coomassie	0.25 g
Metanol	45 mL
Ac. acético glacial	10 mL
dH₂O	45 mL

- c) **Solución de desteñido:**

Reactivos	1L
Metanol (30%)	300 mL
Ac. acético (10%)	100 mL
dH₂O	600 mL

ANEXO 5

- **Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS):**

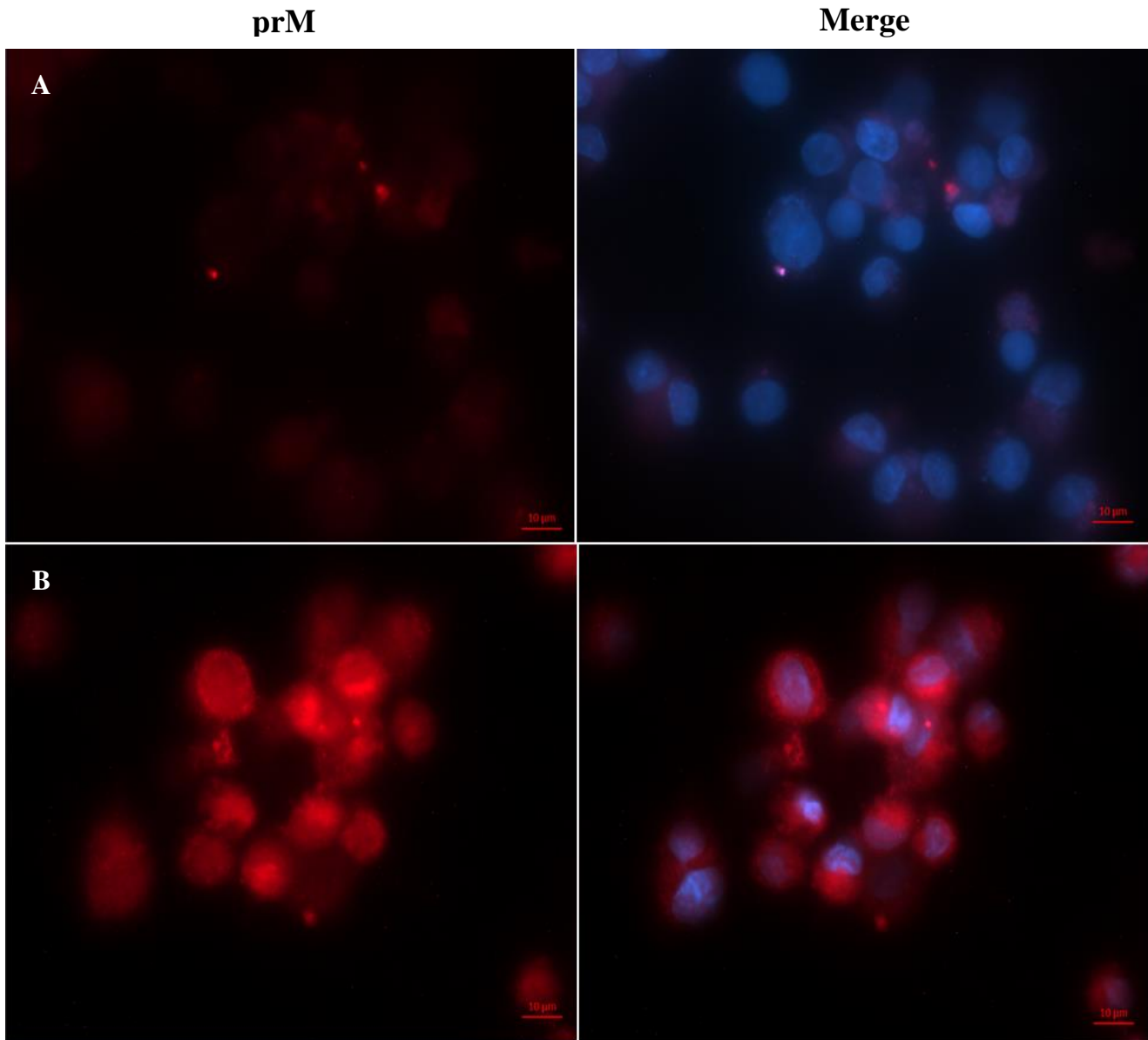
PBS 10x pH 7.2

Reactivos	1 L
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
dH ₂ O	c.b.p 1L

PBS 1x pH 7.2

Reactivos	1L
NaCl 137 mM	8 g
KCl 2.7 mM	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ 10 mM	1.44 g
KH ₂ PO ₄ 2 mM	0.24 g
dH ₂ O	c.b.p 1 L

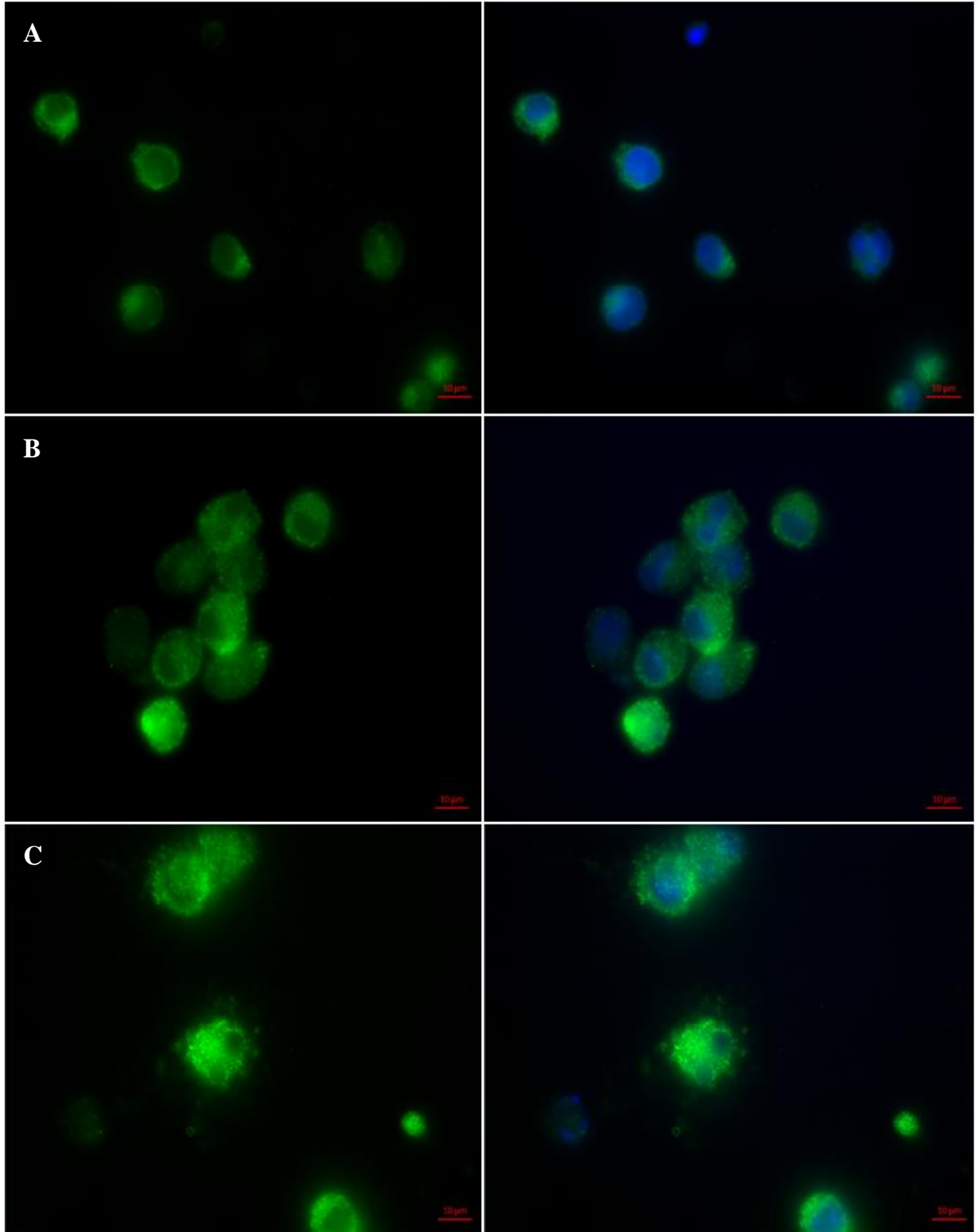
ANEXO 6

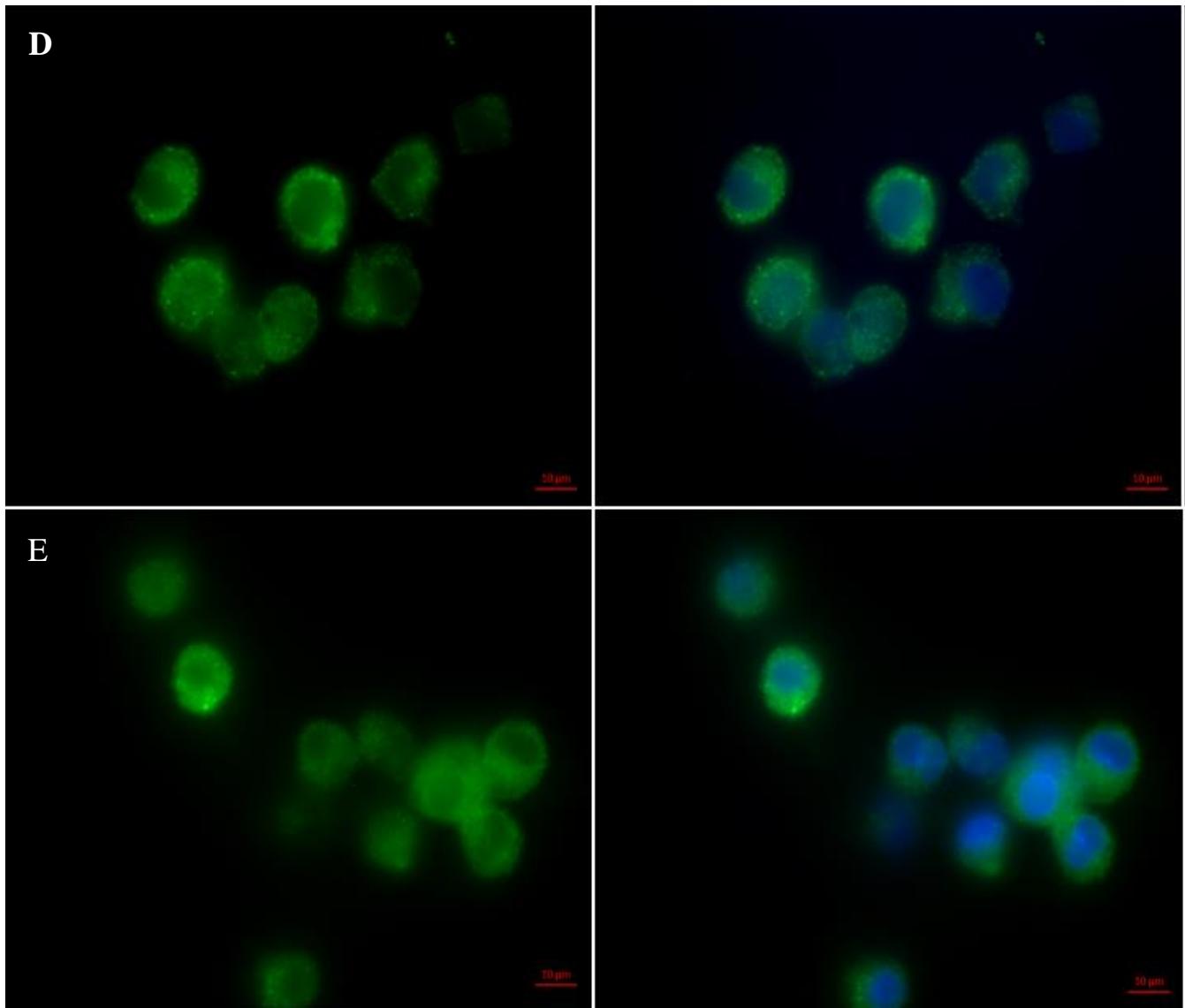


Amplificación de la figura 8. Inmunofluorescencia en macrófagos U937-DC infectados con DENV-2. La presencia de la infección fue comprobada usando anticuerpos específicos contra la proteína prM reconocidos con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647 (rojo). Los núcleos se tiñeron con colorante de Hoechst (azul). **A.** En el panel superior se ven las células no infectadas (NI). **B.** En el panel inferior están las células infectadas con DENV-2.

p-STAT1

Merge





Amplificación de la figura 9. Distribución de p-STAT1 en macrófagos U937-DC. La activación de la vía de señalización JAK-STAT se analizó utilizando anticuerpos primarios contra la proteína p-STAT1 y anticuerpos secundarios conjugados a FITC (verde). Los núcleos se tiñeron con colorante de Hoechst (azul). **A)** Células sin IFN- α y sin infectar. **B)** Células tratadas con IFN- α . **C)** Células con IFN- α 6horas antes de infectarlas. **D)** Células infectadas 1 hora y tratadas con IFN después de la infección. **E)** Células infectadas con DENV-2