



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS**

**“PARTICIPACION DEL RECEPTOR
LRP1 EN LA INTERNALIZACION DEL
VIRUS DEL DENGUE EN
HEPATOCITOS HUMANOS HEPG2”.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICA)
P R E S E N T A
QUÍMICO LUIS EDGARDO
VIGUERAS RUEDA

TUTORA: DRA. BLANCA HAYDE RUIZ ORDAZ



MEXICO, D.F

NOVIEMBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR LRP1 EN LA INTERNALIZACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE EN HEPATOCITOS HUMANOS HEPG2”

R E C O N O C I M I E N T O S

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz en el laboratorio B035 del Departamento de Biología molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:
Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Marcela Lizano Soberón. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova. Facultad de Química, UNAM.

Se reconoce la colaboración de de la Dra. Alejandra Huerta Zepeda en los experimentos de citometría de flujo así como de la Dra. Verónica Monroy en los experimentos de manejo de marca radiactiva.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT. Se agradece al PAPPIT por el apoyo brindado para la ejecución de este proyecto

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

PRESIDENTE:

Dr. Alejandro García Carrancá.

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

VOCAL:

Dr. Fernando López Casillas.

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

SECRETARIO:

Dra. Marina Macías Silva.

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

SUPLENTE:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova.

Facultad de Química, UNAM.

SUPLENTE:

Dra. Xóchitl Pérez Martínez.

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

A G R A D E C I M I E N T O S

-A CONACYT por la beca otorgada.

-A mis buenos compañeros del laboratorio B035: Carlos Cabello y la Dra. Alejandra Huerta: muchas gracias por su ayuda, compañerismo y enseñanzas.

-Especialmente quiero agradecer a Jorge Cime, por toda su ayuda desinteresada en este trabajo, quien además es un excelente compañero y muy buen maestro. Gracias.

-Un agradecimiento a toda la comunidad del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. que me apoyó.

- Mi reconocimiento para esos investigadores inspiradores, pumas con vocación real en la investigación científica, de mente amplia, libre en todos los sentidos, estrellas nacieses privilegiadas, pues serán los verdaderos maestros de nosotros los mexicanos. ¡Gracias y hasta siempre!

- Gracias a mi Alma Mater: la Universidad Nacional Autónoma de México. Te debo todo lo que he aprendido.

Dedico este trabajo a:

Elsa Graciela Rueda Carrillo, José Arturo Viguera Ruiz y toda mi familia. ¡Gracias por apoyarme siempre!

**Luis Edgardo Viguera Rueda.
México, D. F. noviembre de 2008.**

I N D I C E

1.-Abreviaturas.....	3
2.-Resumen.....	5
3.-Antecedentes.....	8
3.1 Taxonomía en virología.....	8
3.2 Taxonomía de la familia <i>Flaviviridae</i>	9
3.3 Propiedades de la familia <i>Flaviviridae</i>	10
3.4 Aspectos taxonómicos dentro del género <i>Flavivirus</i>	13
3.5 Propiedades del género <i>Flavivirus</i>	16
3.6 Infección por el DENV.....	21
3.6.1 Aspectos epidemiológicos de la infección por el DENV.....	21
3.6.2 Manifestaciones clínicas de la infección por el DENV.....	23
4.-Planteamiento del problema.....	29
5.-Hipótesis.....	37
6.-Objetivos.....	38
7.-Diseño experimental.....	39
8.-Materiales y métodos.....	40
8.1 Cultivos celulares.....	40
8.2 Propagación de DENV.....	40
8.3 Titulación de DENV.....	41
8.4 Purificación del DENV.....	42
8.5 Extracción de RNA total de células HepG2.....	42
8.6 Detección de vRNA de DENV mediante RT-PCR.....	43
8.7 Detección de mRNA de LRP1 mediante RT-PCR. Purificación y secuenciación del producto de amplificación.....	45
8.8 Inmunofluorescencia indirecta para detectar la proteína LRP1 en HepG2.....	46
8.9 Determinación de la permisividad a la infección por DENV-2 de HepG2.....	47
8.10 Evaluación de los cambios en los niveles de membrana del receptor LRP1 en células HepG2 en presencia del DENV-2 mediante citometría de flujo.....	48
8.11 Detección <i>in vitro</i> de la interacción entre la β 2GPI y el DENV-2.....	49
8.11.1 Obtención de β 2GPI de plasma humano.....	49
8.11.2 Coinmunoprecipitación de β 2GPI y DENV-2.....	50

8.12 Evaluación de la internalización de DENV-2 en HepG2 con modificaciones en los niveles de membrana del receptor LRP1.....	51
8.12.1 Marcaje radiactivo de DENV-2 con ³⁵ S-metionina.....	51
8.12.2 Generación de células HepG2 con interferencia en la expresión del mRNA de LRP1 mediante RNA de interferencia específico (siRNA).....	52
8.13 Detección de proteínas de unión de células HepG2 al DENV-2.....	53
8.13.1 Extracción de proteínas totales de células HepG2.....	53
8.13.2 Ensayo VOPBA.....	53
9.-Resultados.....	55
9.1 Verificación de la permisividad a la infección de HepG2 por DENV-2.....	55
9.2 Evaluación de la expresión del receptor LRP1 en las células HepG2.....	56
9.3 Determinación de los cambios en los niveles de LRP1 en la superficie celular en HepG2 en presencia del DENV-2.....	60
9.4 Evaluación de la internalización del ³⁵ S-DENV-2 en células HepG2 tratadas con RNA de interferencia para LRP1.....	62
9.5 Evaluación de la interacción del DENV-2 con β2GPI mediante coinmunoprecipitación.....	64
9.6 Detección de proteínas de unión de células HepG2 con el DENV-2.....	67
10.-Discusión.....	69
11.-Conclusiones.....	77
12.-Referencias.....	78
13.-Anexo 1: métodos experimentales.....	91

1.- ABREVIATURAS

A: absorbancia
a.a.: aminoácido
aFL: anticuerpos antifosfolípido
apoE: apolipoproteína E
BCA: ácido bicinconínico
β2GPI: β2-glicoproteína I
BiP(immunoglobulin heavy chain-binding protein): proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina
BVDV: virus de la diarrea viral bovina
cat.: catálogo
C4bBP (C4b binding protein): proteína de unión al componente C4b
CCP (complement control protein): proteína de control del complemento
cm: centímetro
cpm: cuentas por minuto
C-terminal: carboxilo terminal
Da: Daltones
DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol
DENV: virus del dengue
DENV-2: virus del dengue serotipo 2
DENV-2 NGC: virus del dengue serotipo 2 cepa Nueva Guinea C
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTP: desoxinucleótidos
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
EGF (epidermal growth factor): factor de crecimiento epidermal.
FD: fiebre del dengue
FHD: fiebre hemorrágica por dengue
fig: figura
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
g: gramo
g: gravedad
GRP(glucose regulated protein): proteína regulada por glucosa
h: hora
HCV: virus de la hepatitis C
HDL (high density lipoprotein): lipoproteína de alta densidad
HSP 70 (heat-shock protein-70): proteína de choque térmico 70
ICTV (International Committee on Taxonomy of viruses): Comité Internacional en Taxonomía de virus
IFI: inmunofluorescencia indirecta
Ig: inmunoglobulina
IgG: inmunoglobulina G
kDa: kilodaltones
LDL (low density lipoprotein): lipoproteína de baja densidad
LRP (LDL receptor related protein): proteína relacionada con el receptor de LDL
LRP1 (LDL receptor related protein-1): proteína 1 relacionada con el receptor de LDL
µg: microgramo
µL: microlitro
MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight):desorción/ionización láser asistida por matriz detectado por tiempo de vuelo
min: minuto
mL: mililitro

mM: milimolar
m.o.i.: multiplicidad de infección
MOPS: ácido 3-(*N*-morfolino)propilsulfónico
mRNA: RNA mensajero
nm: nanómetro
No.: número
nt: nucleótidos
N-terminal: amino terminal
pmol: picomoles
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
PAI-1: inhibidor 1 del activador del plasminógeno
p.b.: pares de bases
PBA: albúmina en amortiguador salino de fosfatos
PBS: amortiguador salino de fosfatos
PCR (polymearse chain reaction): reacción en cadena de la polimerasa
PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PEG: polietilenglicol
p.f.u.: unidades formadoras de placa
p.m.: peso molecular
p/v: peso sobre volúmen
ref: referencia
rLDL: receptor de LDL
RNA: ácido ribonucleico
r.p.m.: revoluciones por minuto
RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction): reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
s: segundo
SCD: síndrome de choque por dengue
SCR (short consensus repeat): repetido consenso corto
³⁵S: isótopo de azufre 35
³⁵S-DENV: virus del dengue marcado radiactivamente con ³⁵S.
SDS: dodecilsulfato de sodio
SFB: suero fetal bovino
siRNA: RNA silenciador
TBE: tris-borato-EDTA
TEMED: *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina
TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular
tPA: activador del plasminógeno tipo tisular
Tris-base: tris(hidroximetil)aminometano
Tris-HCl: hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano
uPA: activador del plasminógeno tipo urocinasa
uPAR: receptor del activador del plasminógeno tipo urocinasa
U. V.: ultravioleta
V: volts
VHB: virus de la hepatitis B
VLDL (very low density lipoprotein): lipoproteína de muy baja densidad
VOPBA (virus overlay protein binding assay): ensayo de unión a proteínas con virus superpuesto,
vRNA: RNA viral
v/v: volumen sobre volumen

2.-RESUMEN

En el presente trabajo se demostró la participación del receptor LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1; proteína 1 relacionada con el receptor de LDL) durante la infección por el virus del dengue (DENV) serotipo 2 (DENV-2) en la línea celular de hepatoma humano HepG2.

La infección por el DENV puede ocasionar fiebre del dengue o fiebre hemorrágica por dengue (FHD). El DENV es capaz de infectar los hepatocitos ocasionando disfunción hepática.

Se ha reportado que la proteína de choque térmico GRP78/BiP sirve como receptor hepático para el DENV. Se conoce que el receptor LRP1 participa en la internalización celular de la proteína GRP78/BiP unida a su ligando, la proteína α_2 -macroglobulina. Con base en lo anterior, proponemos que el receptor multiligandos LRP1 forma parte del complejo molecular de internalización del DENV-2 en el hepatocito. La proteína LRP1 es un receptor endocítico multiligandos de 600 kDa miembro de la superfamilia del receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL).

Por otro lado, los pacientes infectados con DENV presentan anticuerpos que reconocen a la proteína plasmática β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI). Se ha descrito que la β_2 GPI es un ligando del receptor LRP1. Lo anterior sugiere una interacción física entre el DENV y la β_2 GPI, la cual podría

ser parte de un complejo molecular de internalización en el hepatocito.

En este trabajo se detectó la presencia del LRP1 en la línea celular HepG2 mediante inmunofluorescencia, RT-PCR y secuenciación. Se confirmó la permisividad de las células HepG2 a la infección por el DENV-2. Se evaluó el nivel de LRP1 presente en la superficie de las células HepG2 mediante citometría de flujo durante la infección por DENV-2, mostrando que durante la infección las células HepG2 presentan un incremento en los niveles del LRP1 en la superficie celular debido a su interacción con el DENV. La disminución del nivel en la membrana celular de la proteína LRP1 en células HepG2 mediante silenciamiento genético del mRNA del LRP1 con RNA de interferencia específico demostró una disminución en la internalización celular del DENV-2 marcado radiactivamente. Observamos la interacción física del DENV-2 y la β 2GPI mediante coimmunoprecipitación con anticuerpos anti-E (proteína de la envoltura) del DENV-2. Esta interacción podría ser importante en la internalización celular del DENV. Ensayos de espectrometría de masas MALDI-TOF con extractos celulares totales de células HepG2 mostraron la interacción del DENV-2 con la proteína GRP78/BiP, como se había informado previamente en la literatura. Los resultados

obtenidos permiten concluir que el receptor LRP1 participa en el complejo molecular de internalización hepático para el DENV-2.

3.-ANTECEDENTES

3.1 Taxonomía en virología.

Los virus son biosistemas elementales que poseen algunas de las propiedades de los sistemas vivos, como son: tener un genoma y ser capaces de adaptaciones a cambios en el medio ambiente. Sin embargo, no son seres vivos por lo que ocupan una posición única en Biología (1). Los virus son biológicamente inactivos en ausencia de una célula huésped y utilizan los sustratos celulares para su multiplicación (2).

La clasificación taxonómica en virología es una valiosa herramienta científica que permite relacionar, comparar y predecir las propiedades de los virus.

Por acuerdo internacional desde 1966, el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV)), de la División de Virología de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas, nombra y clasifica a los virus. Este comité ha establecido que las categorías taxonómicas reconocidas en virología son: orden, familia, subfamilia, género y especie (3). El concepto de especie de virus es de importancia crítica en virología y su definición ha sido objeto de mucho debate, en particular entre los virólogos de plantas. Afortunadamente, desde 1991 se cuenta con la siguiente definición internacionalmente aceptada de especie

en virología: Una especie viral es una clase politética* de virus que constituye un linaje replicativo y que ocupa un nicho ecológico particular (1).

Actualmente se encuentran reconocidos tres órdenes virales:

Mononegavirales (4 familias),

Caudovirales (3 familias) y

Nidovirales (3 familias).

Es posible que se acepten dos órdenes más oficialmente: los *Picornavirales* y los *Herpesvirales*. El resto de los virus no incluidos en los órdenes mencionados se agrupan en 64 familias no asignadas a un orden (4). Entre ellas encontramos a la familia *Flaviviridae* dentro de la cual se encuentra el género *Flavivirus* en el cual se clasifica el virus del dengue (DENV).

3.2 Taxonomía de la familia *Flaviviridae*.

La familia *Flaviviridae* (del latín flavus, amarillo) comprende tres géneros:

1) *Flavivirus*. Con 70 especies.

2) *Pestivirus* (del latín pestis, plaga). Con cuatro especies: *virus de la diarrea viral bovina 1* (BVDV-1), *virus de la diarrea viral bovina 2* (BVDV-2), *virus de la enfermedad de Border* y *virus de la fiebre clásica de cerdos* (CSFV).

* Una clase politética se define como una clase cuyos miembros siempre presentan varias propiedades en común aunque ninguna característica común única está presente en todos y cada uno de sus miembros.

3) *Hepacivirus* (del griego hepar, hepato, hígado). Con sólo una especie: *virus de la hepatitis C* (HCV).

Los miembros de esta familia comparten similitudes en: la morfología del virión, organización genómica y forma de replicación; sin embargo muestran diversidad en sus propiedades biológicas; se presentan reacciones serológicas cruzadas entre especies pero no entre géneros (5).

3.3 Propiedades de la familia *Flaviviridae*.

Los viriones son esféricos o pleomórficos y miden de 40 a 60 nm de diámetro. La masa molecular de los viriones es de 60 MDa. En condiciones *in vitro* los viriones son estables en un medio alcalino de pH 8; son sensibles al tratamiento con calor, disolventes orgánicos y detergentes. Los viriones consisten en una nucleocápside poliédrica de 25-30 nm de diámetro y presentan una envoltura que la rodea; la envoltura está compuesta por una bicapa lipídica con uno o más tipos de glicoproteínas (6).

La organización del genoma es similar en los tres géneros. Consiste en una única molécula lineal de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva; tiene un tamaño de 9,500 a 12,500 nucleótidos de longitud. En su extremo 5', el genoma posee un cap el cual tiene un nucleótido metilado o una proteína ligada; el extremo 3' no posee cola de poliadenilato o puede tenerla en algunas cepas de *flavivirus*

pertenecientes al complejo de encefalitis transmitida por garrapatas. El genoma viral, que por si mismo es infeccioso (6), cumple con tres propósitos en el ciclo de vida de estos virus: sirve como RNA mensajero para la traducción de las proteínas virales, como molde para la replicación del RNA y como material genético. El genoma viral codifica proteínas estructurales y no estructurales. En su extremo 5' se encuentran los genes que codifican proteínas estructurales y hacia el extremo 3' los que codifican las proteínas no estructurales entre las que se incluyen: una proteasa, una helicasa y una polimerasa. Todas las proteínas virales se sintetizan como parte de una única poliproteína de más de 3000 aminoácidos la cual es procesada mediante una combinación de proteasas virales y celulares. Las proteínas estructurales se localizan en el extremo amino terminal de la poliproteína y las no estructurales en el extremo carboxilo terminal (5).

La unión e internalización del virus ocurre mediante un mecanismo de endocitosis mediada por receptor en el que participan receptores específicos de la célula y proteínas virales de la envoltura (7). La disminución del pH del endosoma internalizado conteniendo al virus, induce la fusión de la membrana de la envoltura del virión con la membrana de la vesícula endocítica liberando la

nucleocápside al citoplasma (fig. 3.1); después el genoma de RNA es liberado al citoplasma al desensamblarse la nucleocápside. La replicación del RNA viral ocurre en complejos asociados a la membrana perinuclear dentro del citoplasma mediante la síntesis de un intermediario genómico de RNA de polaridad negativa (5). La progenie de viriones es ensamblada mediante un mecanismo de gemación en el retículo endoplásmico. Posteriormente los viriones transitan a través de la vía secretora de la célula y son liberados en la superficie celular (8).

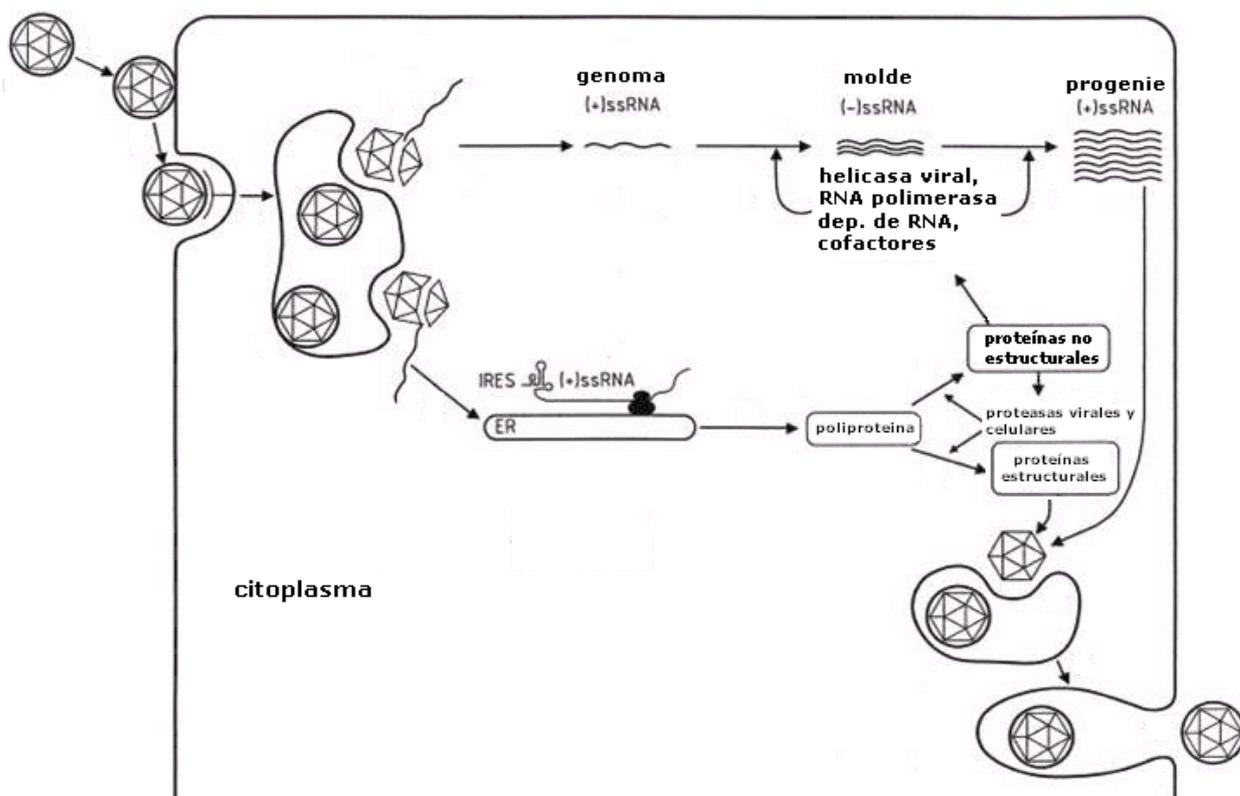


Figura 3.1 Representación del ciclo biológico de Flaviviridae.

A continuación se describen particularidades del género *Flavivirus* al cual pertenece el DENV.

3.4 Aspectos taxonómicos dentro del género *Flavivirus*.

El género *Flavivirus* comprende más de 70 especies. Muchas son transmitidas a vertebrados, incluyendo al hombre mediante mosquitos o garrapatas (artrópodos), fenómeno conocido como transmisión biológica (9). Los criterios de delimitación de especies dentro de este género son (3):

- 1.- Datos de secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que se deducen a partir de los primeros.
- 2.- Características antigénicas.
- 3.- Asociaciones geográficas.
- 4.- Asociación con vectores.
- 5.- Asociación con huéspedes.
- 6.- Asociación con enfermedades.
- 7.- Características ecológicas.

Los flavivirus transmitidos por mosquitos y por garrapatas aunque son distintos, han evolucionado a través de una línea común ancestral la cual divergió a partir de virus que no requerían vector o por lo menos no tienen vector artrópodo conocido (10). Basándose en análisis filogenéticos de los genes virales no estructurales (ver fig. 3.2) NS5 (gen que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA y

una metiltransferasa) o NS3 (gen que codifica diversos dominios catalíticos: serin proteasa, helicasa, nucleósido trifosfatasa y 5' trifosfatasa) (11), estos virus se agrupan taxonómicamente en dos grandes complejos en función del vector artrópodo transmisor y en un complejo adicional, del cual se desconoce el vector artrópodo. A continuación se presenta una lista completa (tabla 3.1) de las especies dentro del género *Flavivirus* (12).

Tabla 3.1. Listado de especies del género *Flavivirus*

1.-Complejo de virus transmitidos por garrapatas
Grupo virus transmitidos por garrapatas en mamíferos
<i>Virus Gadget Gully</i>
<i>Virus de la enfermedad del bosque Kyasanur</i>
<i>Virus Langat</i>
<i>Virus Louping ill</i>
<i>Virus de la fiebre hemorrágica Omsk</i>
<i>Virus Powassan</i>
<i>Virus Karshi</i>
<i>Virus Royal Farm</i>
<i>Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas subtipo europeo</i>
<i>Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas subtipo Far Eastern</i>
<i>Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas subtipo siberiano</i>
Grupo virus transmitidos por garrapatas en aves marinas
<i>Virus Kadam</i>
<i>Virus Meaban</i>
<i>Virus Saumarez Reef</i>
<i>Virus Tyuleniy</i>
2.-Complejo de virus transmitidos por mosquitos
Grupo del virus Aroa
<i>Virus Aroa</i>
<i>Virus Bussuquara</i>
<i>Virus Iguape</i>
<i>Virus Naranjal</i>

Grupo del virus Dengue
<i>Virus Dengue serotipo 1</i>
<i>Virus Dengue serotipo 2</i>
<i>Virus Dengue serotipo 3</i>
<i>Virus Dengue serotipo 4</i>
<i>Virus Kedougou</i>
Grupo del virus de la encefalitis japonesa
<i>Virus Cacipacore</i>
<i>Virus de la encefalitis japonesa</i>
<i>Virus Koutango</i>
<i>Virus Alfuy</i>
<i>Virus de la encefalitis Murray Valley</i>
<i>Virus de la encefalitis San Luis</i>
<i>Virus Usutu</i>
<i>Virus Kunjin</i>
<i>Virus West Nile</i>
<i>Virus Yaounde</i>
Grupo del virus Kokobera
<i>Virus Kokobera</i>
<i>Virus Stratford</i>
Grupo del virus Ntaya
<i>Virus Bagaza</i>
<i>Virus Ilheus</i>
<i>Virus Rocio</i>
<i>Virus de la meningoencefalomielitis Israel turkey</i>
<i>Virus Ntaya</i>
<i>Virus Tembusu</i>
Grupo del virus Spondweni
<i>Virus Spondweni</i>
<i>Virus Zika</i>
Grupo del virus de la fiebre amarilla
<i>Virus Banzi</i>
<i>Virus Bouboui</i>
<i>Virus Edge Hill</i>
<i>Virus Jugra</i>
<i>Virus Potiskum</i>
<i>Virus Saboya</i>
<i>Virus Sepik</i>
<i>Virus Uganda S</i>
<i>Virus Wesselsbron</i>
<i>Virus de la fiebre amarilla</i>
3.-Complejo de virus con vector artrópodo desconocido
Grupo del virus del murciélago Entebbe
<i>Virus del murciélago Entebbe</i>
<i>Virus Sokoluk</i>

<i>Virus Yokose</i>
<i>Virus Apoi</i>
<i>Virus Cowbone Ridge</i>
<i>Virus Jutiapa</i>
<i>Virus Modoc</i>
<i>Virus Sal Vieja</i>
<i>Virus San Perlita</i>
<i>Virus del murciélago Bukalasa</i>
<i>Virus islas Carey</i>
<i>Virus del murciélago Dakar</i>
<i>Virus de la leucoencefalitis Montana myotis</i>
<i>Virus Batu Cave</i>
<i>Virus del murciélago Phnom Penh</i>
<i>Virus Rio Bravo</i>
Especies tentativas en <i>Flavivirus</i>
<i>Virus CFA (cell fusing agent)</i>
<i>Virus del murciélago Tamana</i>

3.5 Propiedades del género *Flavivirus*.

Los viriones maduros son esféricos; miden de 40 a 50 nm de diámetro y muestran una superficie relativamente lisa. Las partículas inmaduras del virus son más grandes (60 nm) y presentan picos en su superficie. La envoltura de las partículas virales contiene dos tipos de glicoproteínas virales: proteína E y proteína prM (en el caso de las partículas de virus inmaduras); o proteína E y proteína M (resultante del corte proteolítico de la proteína prM) en el caso de partículas virales extracelulares maduras (12). La proteína E es el principal determinante antigénico en las partículas virales; participa en los procesos de unión celular y fusión de membranas durante la internalización del virus a la célula (13, 14). Los diferentes flavivirus muestran un

40% en la conservación de aminoácidos de la proteína E por lo que se espera que el plegamiento global y el de los dominios de esta proteína sean parecidos entre estos virus (15). La proteína M se produce durante la maduración de las partículas virales; es un fragmento pequeño proteolítico de la proteína precursora prM (16). La nucleocápside está constituida por la proteína de la cápside C y por el genoma de RNA de polaridad positiva. Se ha demostrado que varias moléculas de la superficie celular interactúan con los flavivirus y se han caracterizado algunos receptores. En el caso particular DENV se han sugerido como receptores primarios: DC-SIGN, GRP78/BiP, y moléculas asociadas a CD14, entre otros. Además, el heparán sulfato y otros glicosaminoglicanos han sido propuestos como receptores de baja afinidad para algunos flavivirus, incluido al DENV (17). La proteína de la envoltura, la proteína E, es la principal proteína en la superficie de los viriones; su peso molecular es de aproximadamente 53 kDa; contiene 12 cisteínas conservadas formando puentes disulfuro (fig.3.2). Interviene en la unión al receptor celular y en la fusión de membranas para la internalización viral en la célula. En el virión, la proteína E forma homodímeros.

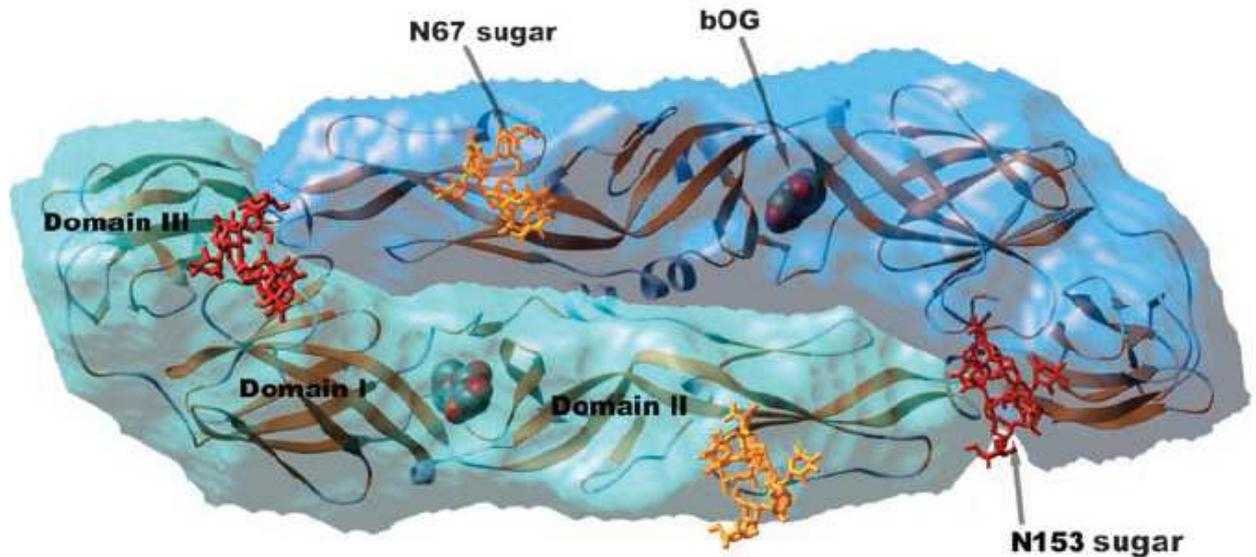


Figura 3.2 Representación del homodímero de proteína E de un flavivirus. Las dos subunidades en el homodímero están antiparalelas y se muestran los dominios de cada monómero. El dominio II tiene los péptidos de fusión clase II y el dominio III los sitios de reconocimiento del receptor. Los sitios de N-glicosilación mostrados no están conservados necesariamente en los flavivirus. La Asn-153 se encuentra glicosilada en muchos flavivirus pero la glicosilación de la Asn-67 es exclusiva del DENV. El beta-octilglucósido (bOG), es un detergente usado para la cristalización. Fig. tomada de ref.15.

En algunos flavivirus la proteína E se encuentra N-glicosilada. Presenta tres dominios (fig.3.2): El dominio estructural central (dominio I), contiene el extremo amino terminal de la proteína y está limitado por un lado por el dominio de dimerización (dominio II), el cual contiene en su extremo distal el péptido de fusión; en el otro extremo del dominio I encontramos el dominio III, el cual es un dominio tipo inmunoglobulina el cual se cree contiene los sitios de reconocimiento del receptor. En un dímero de proteína E el péptido de fusión de un monómero E se encuentra inmerso

entre los dominios I y III del monómero adyacente. Su plegamiento adecuado, estabilidad a pH ácido y secreción dependen de la coexpresión de la proteína viral prM (18).

El genoma de los flavivirus (fig. 3.3) consiste en una cadena sencilla de RNA de aproximadamente 11 kb de polaridad positiva. Contiene 3 genes que codifican para las tres proteínas estructurales: C, prM, E; y siete genes que codifican para las respectivas proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5.

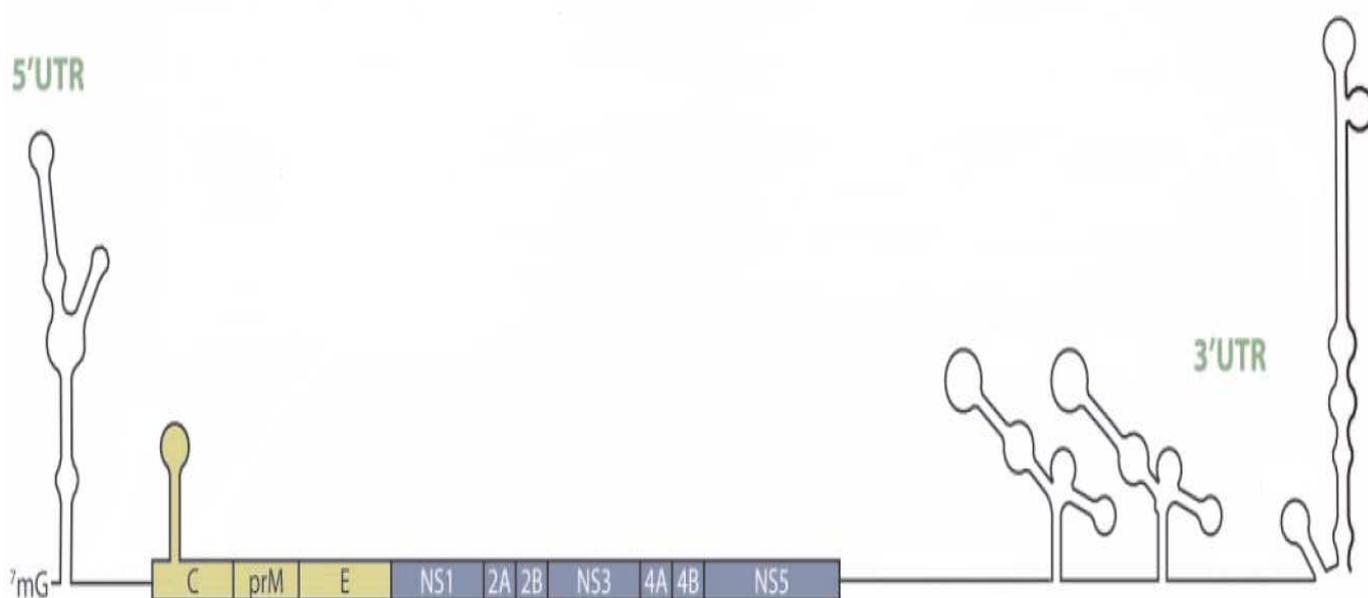


Figura 3.3. Estructura del genoma de un flavivirus transmitido por mosquitos. Contiene una estructura 5' cap tipo I y un marco de lectura abierto único limitado por regiones no traducibles (UTR) 5' y 3' con estructura secundaria conservada. Los genes C, prM y E codifican proteínas estructurales. Los genes NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 codifican proteínas no estructurales. Fig. tomada y modificada de ref. 8.

A diferencia de los mRNA celulares, el genoma de los flavivirus carece de una cola poliadenilada en el extremo 3'.

El genoma codifica un único marco de lectura abierto largo (12). En el extremo 5' del genoma hay alrededor de 100 nucleótidos formando una región no traducible (UTR); hacia el extremo 3' también se presenta una UTR de 400 a 700 nucleótidos aproximadamente. La secuencia 5' UTR no se encuentra bien conservada entre los diferentes flavivirus, sin embargo su estructura secundaria se mantiene, la cual tiene influencia en la traducción del genoma (19).

En cuanto a la interacción huésped-parásito causante de enfermedad en el hombre, los flavivirus pueden presentar neurotropismo, viscerotropismo y pantropismo. Los virus neurotrópicos se asocian con infección del sistema nervioso central, los viscerotrópicos con infección de hígado, riñones y corazón, y los pantrópicos con infección de muchos diferentes órganos y tejidos del huésped. Sin embargo, esta división no es absoluta (20).

La infección por flavivirus en el hombre ocasiona: fiebres elevadas, encefalitis, fiebres hemorrágicas, entre otras manifestaciones (21). En particular es importante destacar que varios flavivirus como el virus del dengue, el virus de la fiebre amarilla, el virus de la enfermedad del Bosque Kyasanur y el virus de la fiebre hemorrágica Omsk, son agentes etiológicos de fiebre hemorrágica viral (22). Esta propiedad aparentemente, no la comparten todos los

flavivirus. Los virus causantes de fiebre hemorrágica no son exclusivos del género *Flavivirus*; también se presentan en la naturaleza dentro de otros géneros de las familias virales: *Bunyaviridae*, *Arenaviridae* y *Filoviridae*.

La fiebre hemorrágica viral es una definición clínica que comprende diversas enfermedades las cuales se presentan en sus formas más severas como un síndrome hemorrágico común. Se pueden presentar con: choque hipovolémico, que es el principal síntoma causante de muerte, síndrome hemorrágico y manifestaciones particulares que varían dependiendo del virus implicado (23).

3.6 Infección por el virus del dengue (DENV).

3.6.1 Aspectos epidemiológicos de la infección por el DENV.

Se presentan cuatro serotipos del DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. El DENV se transmite biológicamente al hombre mediante la picadura de la hembra hematófaga de mosquitos del género *Aedes*, siendo la especie principal *Aedes aegypti*, por lo que se considera un arbovirus (del inglés, arthropod-borne viruses) clase B (9). El mosquito infectado permanecerá así durante el resto de su vida (el ciclo de vida de *A. aegypti* tiene una duración promedio de 30 días) transmitiendo el DENV a individuos susceptibles de los cuales se alimente (ver fig. 3.4). Se tiene evidencia de

que las hembras infectadas pueden transmitir el DENV a su descendencia mediante transmisión transovárica (24).

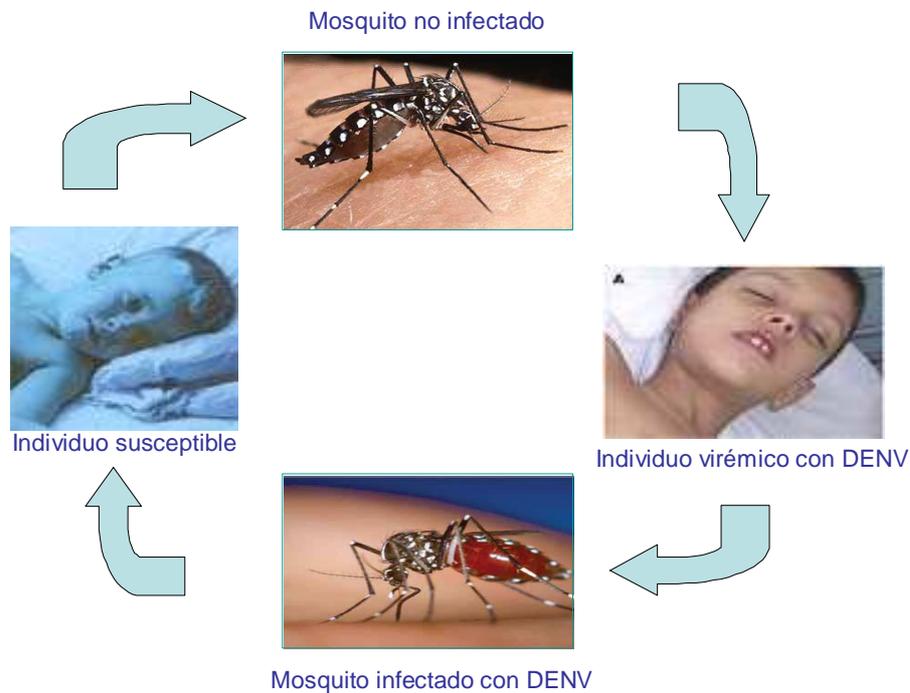


Figura 3.4 Ciclo de transmisión biológica del DENV en el humano.

A. aegypti es una especie tropical y subtropical que se encuentra entre los paralelos geográficos 35°N y 35°S. La distribución de la especie está también limitada por la altura, ya que no suele encontrarse por arriba de los 1000 m sobre el nivel del mar (25).

Alrededor del momento en que aparece la fiebre en el huésped humano infectado, el DENV circula en la sangre; mosquitos no infectados pueden adquirir el virus si se alimentan de un individuo virémico (fig.3.4); el DENV se incuba en el mosquito durante un período de 8 a 10 días

(período de incubación extrínseco) antes de poder ser transmitido a un individuo humano (26).

Anualmente, se estima que en el mundo ocurren 50 millones de casos de fiebre del dengue (FD) y 500 mil de fiebre hemorrágica por dengue (FHD), las cuales son las manifestaciones clínicas de la infección por DENV (27).

En México como en otras partes del mundo, la presencia de la infección por DENV está condicionada por la presencia del mosquito transmisor. Los estados de la República Mexicana con mayor riesgo para adquirir la enfermedad son: Sonora, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Veracruz, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. A partir de 1984 se registraron casos de fiebre hemorrágica por dengue en el país, siendo Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Colima y Guerrero los estados más afectados (28).

3.6.2 Manifestaciones clínicas de la infección por DENV.

Las infecciones por el DENV pueden ser asintomáticas o bien, pueden manifestarse clínicamente como (fig. 3.5):

- fiebre indiferenciada.
- fiebre del dengue o dengue clásico (FD).
- fiebre hemorrágica por dengue (FHD).
- Síndrome de choque por dengue (SCD).

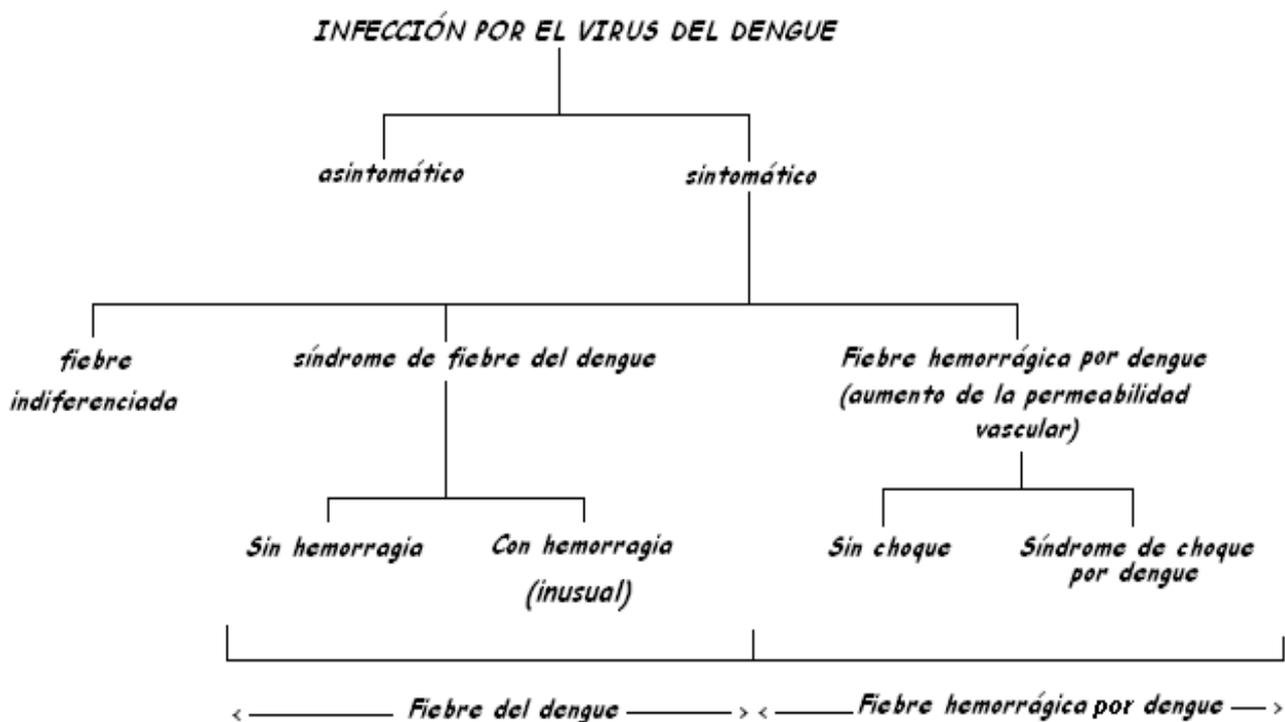


Figura 3.5. Manifestaciones clínicas observadas en la infección por DENV. Fig. tomada y modificada de ref. 25.

Se produce una viremia desde 24-48 horas antes de la aparición de los síntomas hasta cinco días después. El período de incubación en promedio es de dos a siete días (29).

A continuación se describen las manifestaciones clínicas de la infección por DENV:

1.- Infección asintomática: infección sin enfermedad asociada pero con respuesta inmune humoral detectable (30).

2.- Fiebre indiferenciada: Las características clínicas frecuentemente dependen de la edad del paciente. Los

niños pequeños pueden tener una enfermedad febril indiferenciada frecuentemente con exantema maculopapular. Los niños mayores y los adultos pueden tener un síndrome febril ligero. En general, se caracteriza por fiebre no mayor a 38°C y manifestaciones discretas que incluyen: mialgias, cefalea, astenia, anorexia, en ocasiones odinofagia, malestar abdominal, náuseas, constituyendo un cuadro clínico difícil de diferenciar de estados febriles de variada etiología, autolimitados y que no afectan el estado general. La recuperación es rápida y no existe astenia residual. Los síntomas pueden ser tan escasos como sólo fiebre de 24 horas de duración.

3.- Fiebre del dengue (FD): se presenta con fiebre elevada de aparición brusca en el 76-100% casos, cefalea severa, dolor óseo, artralgias, náusea, vómito, rash y mialgias. Las mialgias son constantes y afectan a casi todos los grupos musculares limitando la actividad normal. Son particularmente intensas en la musculatura de los ojos (dolor retroocular). Las petequias son comunes (1-25% casos). Usualmente se observa leucopenia (76-100%) y puede observarse trombocitopenia (26-50%). La recuperación puede estar asociada con fatiga prolongada y depresión, especialmente en adultos. En algunos brotes epidémicos, la FD puede presentarse con epistaxis,

gingivorragia, sangrado gastrointestinal, hematuria y menorragia. El sangrado gastrointestinal severo puede ocurrir en personas con úlcera péptica preexistente.

4.- Fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD): Los casos típicos se caracterizan por cuatro manifestaciones clínicas principales que son: fiebre elevada, fenómenos hemorrágicos, frecuentemente hepatomegalia y fallo circulatorio.

La trombocitopenia (frecuencia 76-100%) moderada o marcada con hemoconcentración es un hallazgo de laboratorio distintivo. El principal cambio patofisiológico que determina la severidad de la enfermedad en la FHD y que la diferencia de la FD es la extravasación del plasma que se manifiesta por elevación del hematocrito (hemoconcentración), efusión serosa y/o hipoproteinemia. Los niños con FHD comúnmente presentan fiebre brusca acompañada de rubor facial y de otros síntomas constitucionales inespecíficos tales como anorexia, vómito, cefalea y artralgias acompañadas de dolor óseo y/o mialgias. Algunos pacientes presentan dolor de garganta con enrojecimiento de la faringe. Sin embargo la rinitis y la tos no son frecuentes. La conjuntiva puede aparecer hiperémica. Hay incomodidad epigástrica y es común observar dolor al palpar el margen costal derecho y dolor

abdominal generalizado. La temperatura es elevada usualmente ($>39^{\circ}\text{C}$) y permanece así por 2-7 días. De manera ocasional, la temperatura puede alcanzar los $40-41^{\circ}\text{C}$; pueden ocurrir convulsiones febriles, particularmente en niños menores de un año. Los fenómenos hemorrágicos más comunes son: una prueba de torniquete positiva, facilidad para las contusiones y sangrados en los sitios de venopunción. En muchos casos, se presentan finas petequias discretas dispersas en las extremidades, axilas, cara y paladar blando, que son usualmente vistas durante la fase febril temprana. La gingivorragia y la epistaxis son poco frecuentes. Puede observarse durante el período febril hemorragia gastrointestinal ligera. El hígado usualmente es palpable tempranamente durante la fase febril y varía en tamaño. La hepatomegalia se observa más frecuentemente en el SCD. Existe dolor en el hígado a la palpación. La ictericia es poco frecuente.

La etapa crítica del curso de la enfermedad se alcanza al final de la fase febril. Después de fiebre de 2 a 7 días de duración, ocurre una caída brusca en la temperatura (defervescencia) la que se acompaña frecuentemente de signos de fallo circulatorio de severidad variable. El paciente puede sudar; encontrarse inquieto; presentar extremidades frías; cambios en el pulso y en la presión

sanguínea. En casos menos severos estos cambios son mínimos y transitorios, reflejando extravasación plasmática escasa. Muchos pacientes se recuperan espontáneamente o después de un breve período de terapia de recuperación de fluidos y electrolitos. En casos más severos, cuando la pérdida de plasma es crítica, se establece estado de choque que puede progresar rápidamente a choque profundo y muerte. La trombocitopenia y la hemoconcentración se detectan usualmente antes del descenso de la temperatura y del establecimiento SCD.

En las cuatro condiciones clínicas descritas, el paciente estará en riesgo de desarrollar dengue grave ante una futura reinfección heterotípica ya que se ha descrito que los anticuerpos producidos contra un serotipo no protegen de la infección contra otro serotipo, es decir son no neutralizantes, facilitando la infección de las células fagocíticas mononucleares (25).

4.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe acuerdo general de que el blanco celular primario del DENV comprende monocitos, macrófagos y células endoteliales (31). Sin embargo, también se sabe que el DENV puede infectar *in vitro* diferentes tipos celulares, incluyendo a los hepatocitos (32). Se tiene cada vez más evidencia de que el hígado es un órgano blanco importante durante la infección por el DENV (33). Se ha documentado disfunción hepática en pacientes con infección por DENV (34). Diversos estudios se han llevado a cabo en los que se han medido los niveles en suero de las transaminasas hepáticas ALT y AST, los cuales suelen encontrarse anormalmente elevados durante la infección por DENV (34-38). También han sido reportados casos clínicos de fallo hepático fulminante durante la infección por DENV (39-40). Se han informado los siguientes datos de frecuencia de disfunción hepática en presencia de enfermedad por infección por DENV: 12% en FD, 16% en FHD grados 1 y 2, 25.8% en FHD grado 3 y 71.4% en FHD grado 4 (37, 41). Además de la evidencia clínica anterior, se ha logrado detectar consistentemente mediante inmunohistoquímica y RT-PCR, la presencia de antígeno de DENV y del genoma viral, respectivamente, en hepatocitos, células de Kupffer y células endoteliales de hígado a partir de muestras de

tejido hepático obtenidas de casos fatales (42-43). Se ha aislado en cultivo el DENV obtenido a partir del hígado de pacientes con infección por DENV (44). Los hallazgos histopatológicos demuestran daño hepático directo en la infección por DENV como son: esteatosis microvesicular, necrosis hepatocelular y cuerpos de Councilman, entre otros (45). Es importante destacar que las lesiones hepáticas en las formas clínicas severas de la infección por DENV suelen parecerse a las de la infección por el virus de la fiebre amarilla, otro flavivirus hepatotrópico (46).

Se sabe que el tropismo tisular que presentan los virus puede ser determinado por los receptores celulares presentes en sus células blanco (47).

En el caso de la interacción del DENV con el hepatocito, se cuenta con poco conocimiento sobre la naturaleza de los receptores celulares hepáticos que permiten la infección por el DENV. Se ha descrito que el DENV utiliza la molécula de heparán sulfato, un glicosaminoglicano, como receptor de baja afinidad. Este receptor está ampliamente distribuido en los tejidos por lo que no se restringe al hepatocito (48). Por ello, se han tratado de identificar correceptores hepáticos virales de alta afinidad; entre éstos, se ha identificado a la proteína relacionada con la glucosa GRP78/BiP perteneciente a la familia de las proteínas de

choque térmico, heat shock protein 70 (HSP70). La GRP78/BiP se localiza principalmente en el retículo endoplásmico donde funciona como proteína chaperona (49).

De manera interesante, la proteína GRP78/BiP está involucrada en la señalización de la proteína α_2 -macroglobulina (50-52). La α_2 -macroglobulina es un inhibidor general de proteasas y cuando se une a éstas se convierte en su forma activada, la cual es depurada del plasma por endocitosis utilizando al receptor LRP1 (53).

La señalización celular de la proteína α_2 -macroglobulina a través del GRP78/BiP involucra la participación del receptor LRP1, el cual se cree une a la α_2 -macroglobulina activada y ésta a su vez a la proteína GRP78/BiP localizada en la membrana, la cual funciona como proteína transductora de la señalización por α_2 -macroglobulina (54).

El receptor LRP1 se expresa abundantemente en el hígado (55). Es una proteína de cadena sencilla homóloga al receptor de LDL (low density lipoprotein), la cual durante su biosíntesis es cortada por la furina, quedando constituida por una subunidad alfa (o pesada) de 515 kDa y una subunidad beta (o ligera) de 85 kDa la cual contiene el dominio transmembranal y el extremo carboxilo terminal intracelular. Las subunidades alfa y beta permanecen

asociadas de manera no covalente en la superficie celular (ver Fig. 4.1). En total tiene 4544 aminoácidos con un peso molecular global de 600kDa. El LRP1 junto con sus ligandos, es reciclado continuamente de la superficie celular al compartimiento lisosomal (56-57).

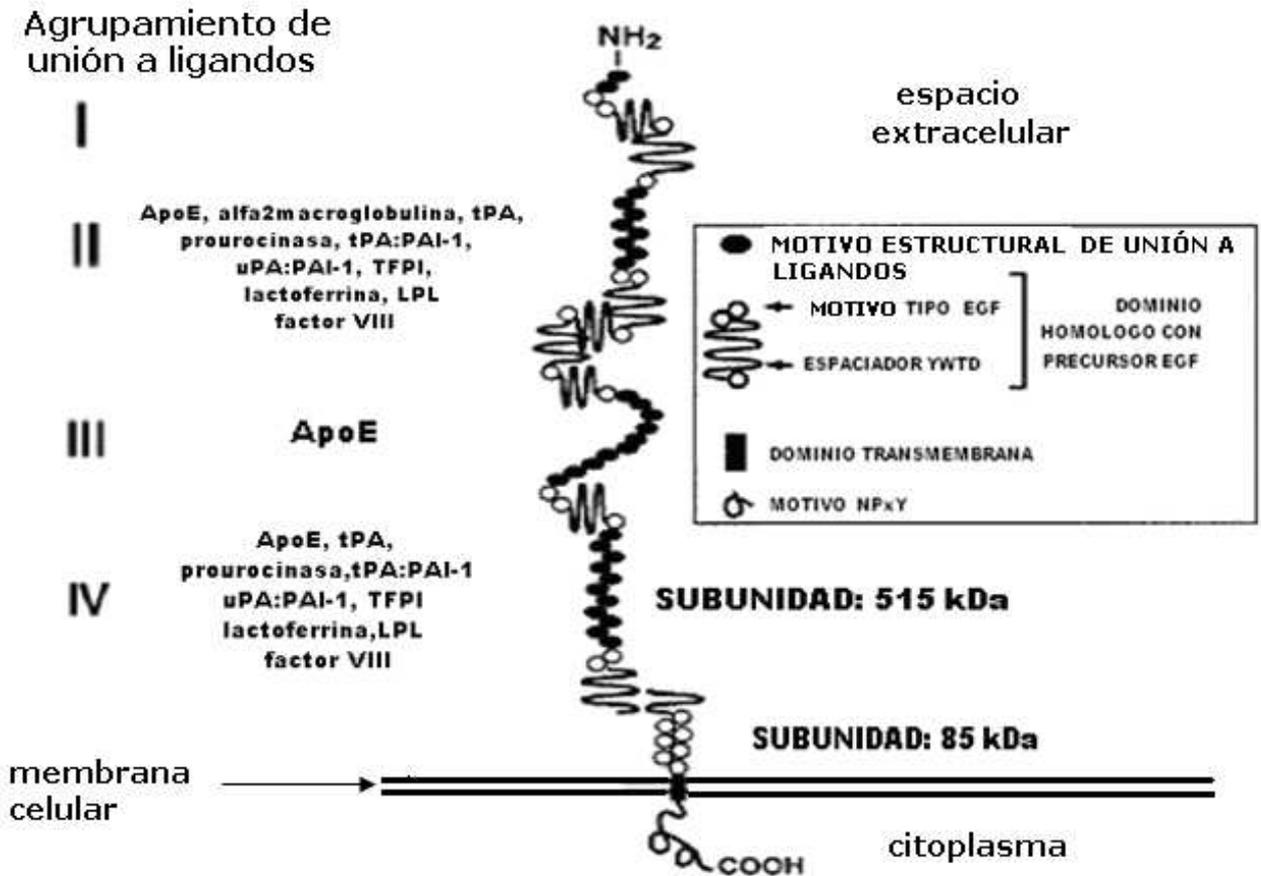


Figura 4.1. Descripción de la estructura del receptor LRP1. Los motivos estructurales del tipo de unión a ligandos constituyen los sitios de unión para éstos. Los dominios homólogos al precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) consisten de los motivos tipo precursor de EGF y de la región espaciadora YWTD y están involucrados en la liberación dependiente de pH de los ligandos en los endosomas. El motivo NPxY formado por los aminoácidos: asparragina- prolina-X-tirosina dirige al receptor a las vesículas recubiertas. El LRP1 es un heterodímero (subunidad alfa de 515 kDa y subunidad beta de 85 kDa) generado mediante el corte proteolítico de una única macromolécula precursora de 600kDa. Figura modificada tomada de ref. 57.

El LRP1 es un receptor multiligandos que presenta elevada especificidad por moléculas estructural y funcionalmente diferentes (58). Desempeña un papel importante en la endocitosis de más de cuarenta ligandos diferentes como son: lipoproteínas, proteínas de la matriz extracelular, complejos proteasa:inhibidor de proteasa, virus, toxinas bacterianas, citocinas, factores de crecimiento, priones, entre otros (59-62).

Adicionalmente se sabe que dos proteínas séricas, la β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) y la proteína de unión al C4b (C4BbP) son ligandos del receptor LRP1 (63-65). Ambas proteínas se caracterizan por presentar módulos tipo CCP (de complement control protein). Los módulos CCP son la característica estructural de la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento (66).

Resulta interesante que en 1997 Cheng reportó la presencia de anticuerpos antifosfolípido en el 30% de las muestras de suero de pacientes con FHD y en el 75% de muestras séricas de pacientes con SCD (67). Estos anticuerpos se dirigen contra la mencionada proteína plasmática β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) y no directamente a los fosfolípidos, y sugiere de manera indirecta una posible interacción del DENV con la β_2 GPI y a su vez con el LRP1. La observación clínica de Cheng, sugiere la interacción del DENV con la

β 2GPI con la que se apoya aún más la sospecha de la posible participación del LRP1 en el complejo de internalización del DENV del cual formaría parte la proteína GRP78/BiP, previamente mencionada.

La función fisiológica de la β 2GPI aún no es clara. Entre otras funciones descritas, se ha sugerido su participación en la regulación de la coagulación y en la depuración de lipoproteínas de baja densidad oxidadas. La β 2GPI también se conoce como apolipoproteína H (apo H) porque se ha informado que se une a las lipoproteínas plasmáticas; es una proteína del plasma cuya concentración media es de 200ug/mL (68). El 35% de la β 2GPI se asocia con lipoproteínas: 16% a quilomicrones y VLDL, 2% a LDL y 17% a HDL (69). El hígado es el órgano principal que produce la β 2GPI (70).

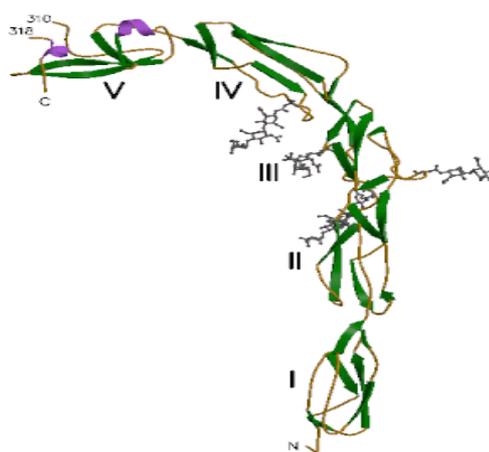


Figura 4.2. Estructura de la β 2GPI. Está formada por cuatro (I a IV) módulos tipo CCP (o sushi) y un quinto dominio (V) adicional. Los módulos tipo CCP están formados por alrededor de 60 a.a. con un patrón consenso de 4 cisteínas invariables con cuatro cisteínas altamente conservadas formando puentes disulfuro en un ordenamiento cis 1-3, cis 2-4 y un número de residuos conservados adicionales. Figura tomada de ref. 68.

La β 2GPI es una proteína glicosilada que tiene 326 aminoácidos, con una masa molecular relativa de 43 kDa y con cuatro sitios de glicosilación (N143, N164, N174 y N234); está formada por cuatro módulos tipo CCP más un quinto dominio atípico en el extremo C-terminal. Se sabe que la β 2GPI se une *in vitro* a superficies cargadas negativamente. La integridad del quinto dominio (aminoácidos 244-326) es esencial para mantener la capacidad de unión a éstas (71-72).

En cuanto a otros virus de la familia *Flaviviridae*, al igual que para el DENV, han sido propuestas como receptores una diversidad de moléculas, algunas coincidentes (73). En particular, se ha sugerido que otros virus de la familia *Flaviviridae* como el *virus de la Hepatitis C*, son capaces de utilizar a los receptores de la superfamilia del receptor LDL (LDLr) para internalizarse en el hepatocito (74-75).

Finalmente, durante su ciclo de vida los flavivirus son incorporados en vesículas endocíticas a través de receptor para internalizarse en la célula. Se sabe que la disminución del pH provoca los cambios conformacionales necesarios para que la proteína de envoltura del virus exponga los péptidos de fusión clase II embebidos en las glicoproteínas del flavivirus y con ello fusionar las membranas de la vesícula endosomal del hepatocito y del virus, liberando al

virión dentro del citoplasma (17). Por ello y desde este punto de vista, la posible participación del receptor LRP1 en la infección primaria del hepatocito por el DENV también resultaría consistente.

5.-HIPOTESIS

La internalización del DENV-2 en los hepatocitos HepG2 puede llevarse a cabo a través de un complejo de internalización que incluye al receptor multiligandos LRP1.

6.-OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

6.1.1 Determinar la participación del receptor hepático LRP1 en la infección de hepatocitos humanos (HepG2) por el DENV-2.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

6.2.1 Evaluar la permisividad a la infección por DENV-2 de células HepG2.

6.2.2. Detectar a la proteína LRP1 en células HepG2

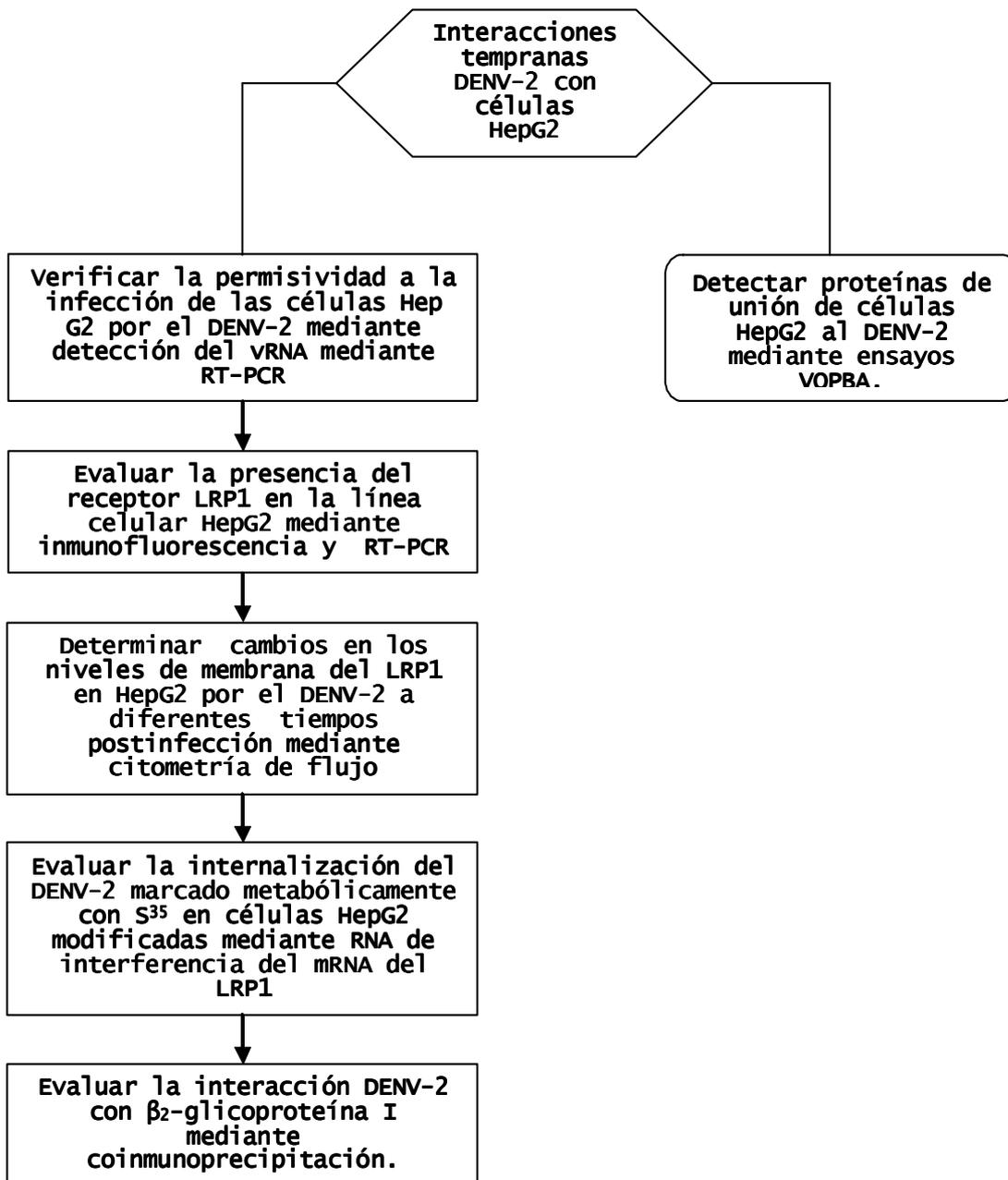
6.2.3 Evaluar modificaciones en los niveles de membrana del LRP1 en HepG2 en presencia del DENV-2.

6.2.4 Detectar *in vitro* la posible interacción de β 2GPI con DENV-2.

6.2.5. Determinar la permisividad a la infección por DENV-2 en células HepG2 con modificaciones en la expresión de la proteína LRP1.

6.2.6 Detectar proteínas de unión al DENV-2 de células HepG2.

7.-DISEÑO EXPERIMENTAL



8.-MATERIALES Y METODOS

8.1 Cultivos celulares.

Se utilizó la línea celular LLC-MK₂. Las células se crecieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) el cual contiene además suero fetal bovino (SFB) descomplementado al 5%, suplementado con glutamina al 1% y antibióticos 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (DMEM completo). Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera CO₂ al 5%. Se utilizó la línea celular de hepatoma humano HepG2 la cual se creció en medio de cultivo αMEM (Gibco) con SFB al 5% suplementado con antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina). Se mantuvieron a 37°C en atmósfera CO₂ al 5%.

8.2 Propagación de DENV.

En este trabajo se utilizó el virus dengue (DENV) serotipo 2 (DENV-2) cepa Nueva Guinea C (DENV-2 NGC) el cual se propagó en células LLC-MK₂ mediante inoculación en monocapas confluentes en cajas de cultivo de 25 cm². Se añadió la semilla viral (100 µL si el título de partida es del orden de 10⁶ pfu/mL) y se diluyó con 1 mL de medio DMEM sin SFB a manera de cubrir únicamente la monocapa. Se incubó 2 h a 37°C, CO₂ 5%. Se procesó simultáneamente un control negativo no inoculado con semilla viral.

Posteriormente se añadió 4 mL de DMEM completo y se incubó por 24 h más. Posteriormente se retiró el sobrenadante a las células y se añadió medio DMEM fresco libre de suero. Se incubó a 37°C con atmósfera con CO₂ 5% hasta que se observó el efecto citopático el cual suele observarse antes de los 8 días. Se cuidó que el pH del medio se mantuviera alcalino añadiendo gotas de solución de bicarbonato de sodio diluido al 5% durante el tiempo que duró la producción de virus observando el indicado rojo de fenol incorporado en el medio (en medio ácido por debajo de pH=6.8 adquiere color amarillo y a partir de pH=8.4 color rojo). Posteriormente las células se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación después del cual el sobrenadante se clarificó mediante centrifugación a 1200 rpm en 4°C durante 15 min. El sobrenadante viral se almacenó en ultracongelación (-70°C) hasta su uso.

8.3 Titulación de DENV.

Se hicieron diluciones del virus (inicio 50 µL) de 10⁻¹ a 10⁻⁶ en medio incompleto DMEM. En una caja de cultivo de 6 pozos (10 cm²/pozo) con monocapas confluentes de células LLC-MK₂ se lavó cada pozo con PBS pH=7.4 y posteriormente se añadió 1 mL de cada dilución viral a cada pozo para cubrir completamente la monocapa. Se incubó 2 h a 37°C en incubadora de CO₂. Después se retiró el inóculo

y se lavaron los pozos con PBS. Se agregó a cada pozo 1 mL de medio DMEM incompleto conteniendo metilcelulosa al 1%. Se incubó la placa a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta observar el efecto citopático. Se retiró el medio diluyéndolo con PBS tibio. Después de hecho lo anterior se fijaron las células con metanol durante un tiempo mínimo de 15 min. Se tiñó con colorante cristal violeta diluido en metanol durante 10 min. Se descartó el colorante y se lavaron los pozos con agua. Se realizó la cuenta de placas virales. Se calculó el título en unidades formadoras de placa por mL (p.f.u./mL) empleando la siguiente fórmula: (número de placas)x(dilución)/(volumen inóculo en mL).

8.4 Purificación del DENV.

Se agregó al sobrenadante viral clarificado un mismo volumen de solución de PEG-8000 20% p/v, NaCl 2.5 M. Se mezcló y se mantuvo en reposo durante 12-24 h a 4°C. Posteriormente se ultracentrifugó la solución anterior a 25000 r.p.m. durante 45 min. a 5-10°C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS. La suspensión se almacena a -70°C.

8.5 Extracción de RNA total de células HepG2.

Se decantó el medio de la monocapa de células. Se adicionó 1 mL de reactivo de Tripure (Tripure isolation reagent, Boehringer Mannheim, No. de cat. 1667 165) por cada 10

cm² de monocapa celular y se lisaron las células. Se pasó la solución a un tubo nuevo. Se incubó cada homogeneizado 5 min. a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µL de cloroformo por cada mL empleado de Tripure usado inicialmente. Se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 s y después se incubó a temperatura ambiente 15 min. Después se centrifugó la mezcla a 12000xg por 15 min. a 4°C. Ésta se separó en tres fases siendo la fase acuosa superior incolora la que contiene el RNA total. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadió 500 µL de isopropanol. Se mezcló bien y se incubó 10 min. a temperatura ambiente para precipitar el RNA. Se centrifugó a 12000xg por 10 min. a 4°C y el sobrenadante se descartó. Se adicionó 1 mL de etanol 75% v/v recién preparado y se mezcló. Se centrifugó a 7500xg por 5 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se eliminó el etanol residual sin permitir que se secase la pastilla. El RNA se resuspendió en 100 µL de agua libre de RNAsas y se almacenó a -70°C hasta su uso.

8.6 Detección de vRNA de DENV mediante RT-PCR.

Se extrajo y purificó el RNA total de las células HepG2 como ya se describió. Se verificó la integridad del RNA obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 1.2%. Se cuantificó el RNA mediante

espectrofotometría a 260 nm. Se utilizó el kit Titan One tube RT-PCR System (No. de cat. 11855476001, Roche). La master mix para una reacción de amplificación consistió de: mezcla de dNTP 0.8 mM; ditioneitol (DTT) 5mM; inhibidor de RNAsas 0.8 U; RNA 1-4 µg; buffer para RT-PCR: Tris-HCl 4 mM, KCl 20 mM, EDTA 0.02 mM, DTT 0.2 mM, Tween-20 0.1% (v/v), Nonidet P-40 0.1% (v/v), glicerol 50% (v/v), pH=7.5; mezcla de enzimas (transcriptasa reversa AMV, Taq DNA polimerasa, Tgo DNA polimerasa) 1 U, primer D1 (DENV) 1 µM; primer D2 (DENV) 1 µM; agua (libre de RNAsas) c.b.p. 50 µL. Las secuencias de los primers específicos para DENV se muestran a continuación. D1 (DENV):5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G-3' el cual alinea en la posición 134-161 del genoma viral. D2 (DENV): 5'-TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC-3' el cual alinea en la posición 616-644 del genoma de DENV (76). Programa de amplificación (termociclador GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystems): Paso 1: Transcripción reversa 50°C, 40 min. Paso 2: 10 ciclos: desnaturalización 94°C, 30 s; alineamiento 55°C, 30 s; extensión 68°C, 45 s. Paso 3: 25 ciclos: desnaturalización 94°C, 30 s; alineamiento 55°C, 30 s; extensión 68°C, 2 min. 50 s. Paso 4: Elongación final: 68°C, 5 min. Se analizó el producto de PCR (tamaño

esperado 511 pb) en gel de agarosa al 1.6% (Bio-Rad) en TBE.

8.7 Detección de mRNA de LRP1 mediante RT-PCR. Purificación y secuenciación del producto de amplificación.

Se extrajo y purificó el RNA total de las células HepG2 como ya se describió. Se verificó la integridad del RNA obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 1.2%. Se cuantificó el RNA mediante espectrofotometría a 260 nm. Para la transcripción reversa y amplificación del cDNA del gen LRP1 se utilizó también el kit Titan One tube RT-PCR System (No. de cat. 11855476001, Roche). La master mix para una reacción de amplificación consistió de: mezcla de dNTP 0.8 mM; ditioneitol (DTT) 5 mM; inhibidor de RNAsas 0.8 U; RNA 1-4 µg; buffer para RT-PCR: Tris-HCl 4 mM, KCl 20mM, EDTA 0.02 mM, DTT 0.2 mM, Tween-20 0.1%(v/v), Nonidet P-40 0.1%(v/v), glicerol 50%(v/v), pH=7.5; mezcla de enzimas (transcriptasa reversa AMV, Taq DNA polimerasa, Tgo DNA polimerasa) 1 U, primer sentido 1 µM; primer antisentido 1 µM; agua libre de RNasa c.b.p 50 µL. Los siguientes primers fueron utilizados en concentración 1 µM y a continuación se muestra su secuencia: Sentido 5'-ACC ACC CCT CCC GCC AGC CCA-3'; antisentido 5'- AGC CCG AGC CGT CGC CTT

GC-3' (77). Programa de amplificación (termociclador GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystems): Paso 1: Transcripción reversa 50°C, 40 min. Paso 2: 10 ciclos: desnaturalización 94°C, 30 s; alineamiento 64°C, 30 s; extensión 68°C, 45 s. Paso 3: 25 ciclos: desnaturalización 94°C, 30 s; alineamiento 55°C, 30 s; extensión 68°C, 2 min. 50 s. Paso 4: Elongación final: 68°C, 5 min. El producto de PCR esperado es de 900 pb el cual se analizó en gel de agarosa al 1.6% en TBE 1X. Para corroborar la identidad del producto de amplificación obtenido éste fue cortado de un gel de agarosa al 1.6% de bajo punto de fusión el cual se purificó utilizando un kit comercial en columna (Qiaquick gel extraction kit Qiagen para lo cual se cortó el fragmento de un gel de agarosa de bajo punto de fusión secuenciación automatizada mediante el método dideoxi.

8.8 Inmunofluorescencia indirecta para detectar la proteína LRP1 en células HepG2.

Se sembraron células HepG2 en cubreobjetos los cuales se colocaron dentro de cajas de cultivo de 6 pozos (10 cm²/pozo). Cuando las células alcanzaron un 70-80% de confluencia se eliminó el medio de cultivo y se lavaron una vez con PBS. Se fijaron 5 min. con una mezcla acetona:metanol (50:50). Se retiró el fijador y se lavaron 2 veces con con PBS. Se añadió el anticuerpo primario anti-

LRP1 (dilución 1:500 en albúmina al 3% en PBS pH= 7.4) de origen murino (Santa Cruz Biotechnology LRP1(A2MR α -2) No. de cat. SC-19616) y se incubó 2 h a temperatura ambiente. Se hicieron lavados con Tris-salino (Tris-HCl 100 mM, NaCl 0.9%). Posteriormente se añadió un anticuerpo secundario antirratón de origen caprino acoplado a rodamina (TRITC-Goat Anti-mouse IgG, Zymed invitrogen No. de cat. 81-6514) diluido 1:500 en albúmina al 3% en PBS). Se incubó 1 h a temperatura ambiente. Después se hicieron lavados con Tris-salino. Se agregó medio de montaje con DAPI para teñir los núcleos. Se observó en microscopio de epifluorescencia (Leica modelo DMI4000B).

8.9 Determinación de la permisividad a la infección por DENV-2 de la línea celular de HepG2.

Se utilizó DENV-2 NGC el cual es obtenido a partir de sobrenadantes de células LLC-MK₂ infectadas clarificados a 1200 r.p.m., 10 min. Se agregó el sobrenadante viral (multiplicidad de infección (m.o.i) de 10) a un cultivo de células HepG2 confluente en 10 cm² (por duplicado). Se incubó 2 h a 37°C, 5% CO₂. Se extrajo y se cuantificó el RNA total de una misma cantidad de células a los tiempos: 0, 24 y 48 h post-infección mediante el método aquí descrito. Se realizó la RT-PCR para detectar vRNA de DENV-2 en el RNA total obtenido de los hepatocitos HepG2.

Simultáneamente se procesaron células HepG2 no infectadas con DENV-2.

8.10 Evaluación de los cambios en los niveles de membrana del receptor LRP1 en células Hep G2 en presencia del DENV-2 mediante citometría de flujo.

Se infectaron por duplicado células HepG2 con DENV-2 NGC (m.o.i de 10) confluentes en 10 cm². Posteriormente se cosecharon las células a las 0, 14, 24 y 36 h postinfección. También fueron infectadas células HepG2 con diferentes cantidades de DENV-2 NGC (m.o.i de 10 y 1) y se cosecharon a las 14 h post-infección para su procesamiento para análisis por citometría de flujo de LRP1 el cual se describe a continuación. Cuando las células alcanzaron un 100% de confluencia se eliminó el medio de cultivo y se lavaron con PBS. Las células se resuspendieron en 1 mL de PBS-EDTA 10 mM. Se centrifugaron 10 min. a 1200 rpm a temperatura ambiente y se eliminó el el sobrenadante. Se fijaron en paraformaldehído al 5% en PBS pH=7.4 por 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS. Se añadió el primer anticuerpo antiLRP1 (Santa Cruz Biotechnology LRP1(A2MRα-2) No. de cat. SC-19616) diluido 1:1000 en solución de PBA. Se incubó 2 h a temperatura ambiente. Se retiró la solución de anticuerpo y se lavó 3 veces con PBA. Posteriormente se resuspendieron

las células en solución de anticuerpo secundario antirratón de cabra acoplado a FITC (Santa Cruz Biotechnology, No. de cat. SC-2342) diluido 1:1000 en PBA. Se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las células 3 veces con PBA. Finalmente se resuspendieron en 500 μ L de PBS. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (BD FACSCalibur system, Beckton Dickinson).

8.11 Detección in vitro de la interacción entre la β 2GPI y el DENV-2.

8.11.1 Obtención de β 2GPI de plasma humano: Se diluyó el plasma 1:4 con NaCl 0.15 M. Por cada 25 mL de solución de plasma diluido se añadieron 2.5 mL de ácido perclórico al 70% reactivo grado analítico. Se agitó 15 min. a 4°C. Se centrifugó a 17500 rpm (31000xg) durante 15 min. a 4°C. Se descartó el precipitado. Se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 5 M. Se dializó en frío (4°C) contra amortiguador de Tris-HCl 0.02 M, NaCl 0.02 M, pH=8.0 durante 24 h cambiando el amortiguador una vez a las 12 h. El dializado se filtró a través de membrana de 0.22 μ m. Se preparó una columna para cromatografía de afinidad de heparina sefarosa (Hitrap heparin columns. Sigma Chem. Co. No. de cat. 5-4837). Se hicieron pasar 5 volúmenes de columna de amortiguador de lavado: Tris-HCl 0.02 M, NaCl 0.15 M, pH=8.0, previamente

filtrado a través de membrana de 0.22 μm y desgasificado para equilibrar la columna. Inmediatamente después se hizo pasar a través de la columna la solución dializada de proteína conteniendo la β 2GPI con un flujo de 1 mL/min. Se eluyó la β 2GPI adsorbida con amortiguador de Tris-HCl 0.02 M, NaCl 0.35 M, pH=8.0. Se recolectó el eluido en fracciones y se hizo el seguimiento de la elución de proteína mediante espectrofotometría U.V. a 280 nm (Ultrospec 1100 pro). La identificación de la β 2GPI se realizó mediante Western-blot. La cuantificación de la proteína obtenida se hizo mediante el método colorimétrico del ácido bicinonínico (ver anexo 1).

8.11.2 Coinmunoprecipitación de β 2GPI y DENV-2: Se acopló 1 μg de anticuerpos IgG murinos monoclonales anti DENV-2 (Chemicon, clone 3H5-1, No. de cat. MAB8702) a partículas de agarosa-Proteína A (Invitrogen, No. de cat. 15918-014) en un volumen total de 500 μL . Se agregó DENV-2 purificado y se incubó durante 24 h a 4°C con agitación rotatoria suave. Se lavaron 3 veces las esferas con Tris-salino (Tris-HCl 0.02 M, NaCl 0.02 M) frío. Se agregó 30 μg de β 2GPI purificada diluida en solución de albúmina en PBS al 3% y se incubó durante 24 h a 4°C con agitación rotatoria suave. Se lavaron las esferas 3 veces con Tris-salino frío y después del último lavado se

resuspendieron en 30 μ L de buffer de carga y se sumergieron las muestras en baño de agua hirviente 5 min. Posteriormente se hizo la electroforesis (SDS-PAGE) en gel de poliacrilamida al 6% para separar las proteínas co-inmunoprecipitadas las cuales se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) para hacer la inmunodetección (Western-blot) con anticuerpos antiDENV-2 NGC (Chemicon, clone 3H5-1, No. de cat. MAB8702) o con anticuerpos policlonales anti β 2GPI obtenidos de conejo mediante inmunización con β 2GPI humana. Se reveló con proteína A acoplada a peroxidasa usando como sustrato diaminobencidina.

8.12 Evaluación de la internalización de DENV-2 en células HepG2 con modificaciones en los niveles de membrana del receptor LRP1.

8.12.1 Marcaje radiactivo de DENV-2 con ^{35}S -metionina: Se llevó a cabo el marcaje metabólico radioactivo del DENV-2 NGC mediante incorporación de ^{35}S -M. Se utilizó medio de cultivo DMEM (Gibco) depletado de metionina en cultivos confluyente de células LLC-MK₂. Se complementó con ^{35}S -M (100 uCi/mL) durante la infección viral para la obtención de DENV-2 NGC marcado radiactivamente.

8.12.2 Generación de células HepG2 con interferencia en la expresión del mRNA de LRP1 mediante RNA de interferencia específico (siRNA): Se contaron y sembraron 80,000 células/10 cm² en cajas de cultivo hasta que alcanzaron 80% de confluencia. Se retiró el medio de cultivo y se lavó con medio fresco (α MEM, Gibco) sin suero. Posteriormente se incubaron 8 h en 1 mL de medio de transfección (Santa Cruz Biotechnology No. de cat. SC-29528 y No. de cat. SC-36868) conteniendo 20 pmol de siRNA para LRP1 (Santa Cruz Biotechnology, No. de cat. SC-40101) o inespecífico (Santa Cruz Biotechnology, No. de cat. SC-37007). Se añadió 1 mL de α MEM (Gibco) con SFB al 10% suplementado con antibióticos (200U/mL de penicilina y 200 μ g/mL de estreptomycin). Se mantuvieron a 37°C en atmósfera CO₂ al 5% durante 12 h. Se retiró el medio anterior y se sustituyó con medio de cultivo completo normal. Se mantuvieron a 37°C en atmósfera CO₂ al 5% durante 24 h adicionales. Posteriormente se infectaron las células durante 15 min., 30 min. o 1 h con ³⁵S-DENV-2. Después se cosecharon las células y se obtuvo el lisado celular para determinación de la marca radioactiva (DENV-2) mediante tratamiento con 500 μ L de solución de SDS al 10%, precipitación de proteínas con 500 μ L de ácido tricloroacético al 20%, frío con agitación vigorosa y

filtración en membranas para marca radiactiva. Se verificó el silenciamiento mediante RT-PCR e inmunofluorescencia de LRP1 en controles no infectados.

8.13 Detección de proteínas de unión de células HepG2 al DENV-2.

8.13.1 Extracción de proteínas totales de células

HepG2: Se preparó un extracto de proteínas totales de un cultivo confluyente de células HepG2 en cajas de petri de 75 cm². Las células se lavaron 2 veces con PBS-EDTA 10 mM y se desprendieron con gendarme. Se centrifugaron 10 min. a 1200 r.p.m. en solución de lisis (MgCl₂ 1.5 mM, Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM y Nonidet P-40 1% conteniendo inhibidores de proteasas: EDTA 2 mM, fluoruro de fenilmetilsufonilo 0.5 mM y aprotinina 5 µg/mL. Los núcleos y detritos celulares se eliminaron centrifugando a 12000xg durante 15 min. a 4°C.

8.13.2 Ensayo VOPBA (Virus Overlay Protein Binding

Assay): Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) y transferencia a membranas de nitrocelulosa de proteínas totales de células HepG2. Se bloqueó la membrana con leche descremada al 10% en PBS y se incubó 24 h a 4°C con agitación suave con el DENV-2 NGC purificado (3.5x10⁶ p.f.u./mL). Se hicieron lavados con PBS-Tween 0.25% y se incubaron las membranas con

anticuerpos IgG de ratón anti-DENV-2 (Chemicon, clone 3H5-1, No. de cat. MAB8702) dilución 1:100 en PBS-Tween 0.25%. Posteriormente se revelaron las proteínas de unión mediante anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa. Las proteínas así detectadas se detectaron en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. Se cortaron las bandas de 75 y 95 KDa preparado en paralelo para su análisis por MALDI-TOF. Los resultados obtenidos se analizaron mediante los programas Aldente y Mascot para la identificación de las proteínas ingresadas en la base de datos.

9.-R E S U L T A D O S

9.1 Verificación de la permisividad a la infección de las células HepG2 por DENV-2.

Se evaluó la permisividad a la infección por DENV en la línea celular HepG2 mediante RT-PCR para detectar el RNA viral.

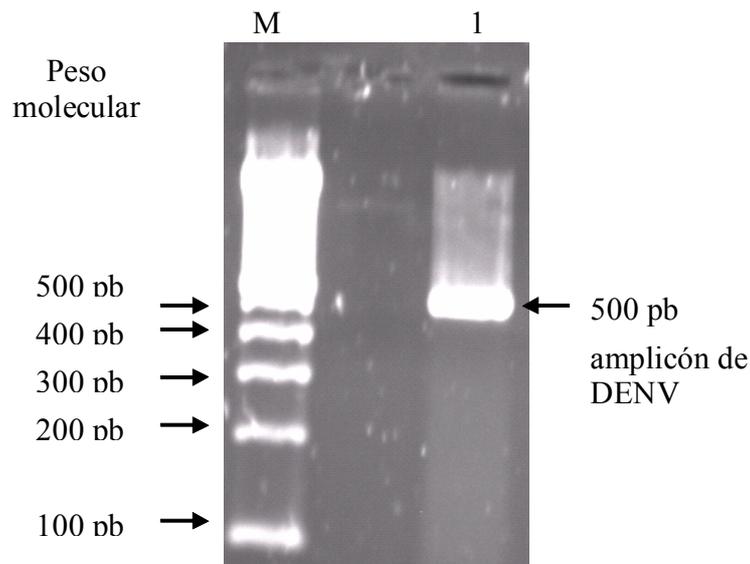


Figura 9.1 Se muestra el producto de amplificación por RT-PCR de DENV-2 de 500 p.b. en un gel de agarosa al 1.6%. Donde: M= marcador de peso molecular; 1= RNA de DENV-2 purificado

Se infectaron células HepG2 con el DENV-2 por 2 h. Se extrajo el RNA total de las células HepG2 para detectar el RNA viral (vRNA) del DENV-2 en diferentes tiempos post-infección: 0, 24 y 48 h. La figura 9.2 muestra la presencia del vRNA detectado en el RNA total de HepG2 viables mediante RT-PCR en los tiempos post-infección 24 y 48 h, pero no al tiempo cero. No se detectó vRNA en los controles de células HepG2 no infectadas. Con este resultado se demostró cualitativamente la permisividad a la infección por

el DENV-2 de las células HepG2 lo cual es consistente con la descripción de producción de progenie viral extracelular a partir de las 17h post-infección en HepG2 (78).

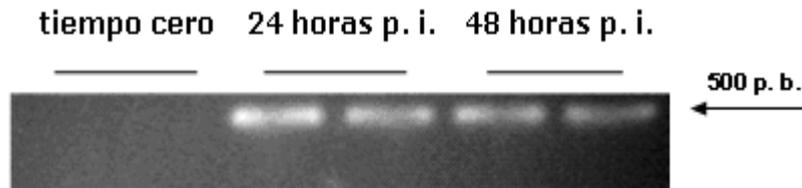


Figura 9.2 Se muestra el amplicón del DENV-2 (500 pares de bases) detectado (por duplicado) mediante RT-PCR en el RNA total obtenido de HepG2 infectadas. Los tiempos indicados son post-infección (p.i.). Ensayo cualitativo no normalizado. Gel de agarosa al 1.6%.

9.2 Evaluación de la presencia del receptor LRP1 en las células HepG2.

Evaluamos la presencia del receptor LRP1 en la superficie de las células HepG2.

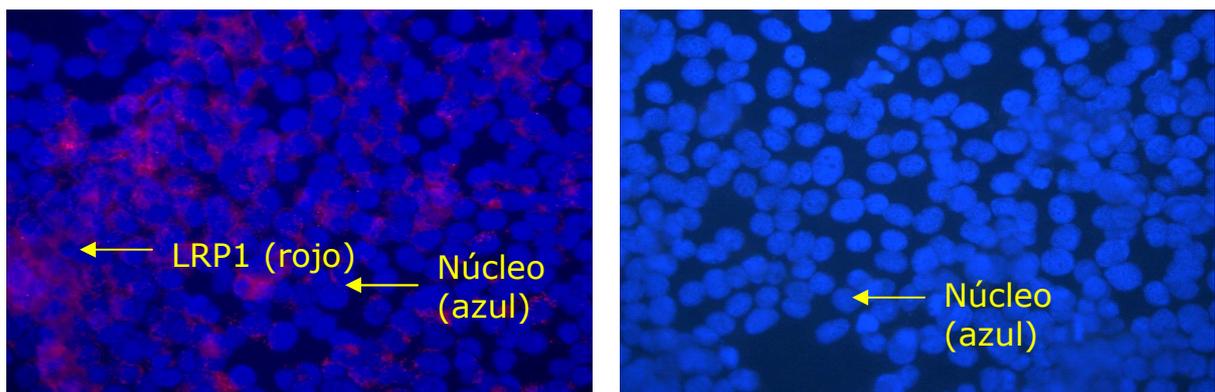


Figura 9.3 Izquierda: células HepG2 mostrando la presencia de LRP1. Técnica de inmunofluorescencia indirecta. Tinción con rodamina (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Derecha: células HepG2 incubadas en ausencia de anticuerpo primario anti-LRP1.

Mediante inmunofluorescencia indirecta se detectó de manera positiva la presencia del receptor LRP1 en las células HepG2 (fig.9.3 izquierda). No se observó señal fluorescente utilizando únicamente el anticuerpo secundario (fig. 9.3 derecha).

Además de la expresión en la membrana celular a nivel de proteína, también se detectó el mRNA del receptor LRP1 en el RNA total de las células HepG2 mediante RT-PCR (figs. 9.4 y 9.5).

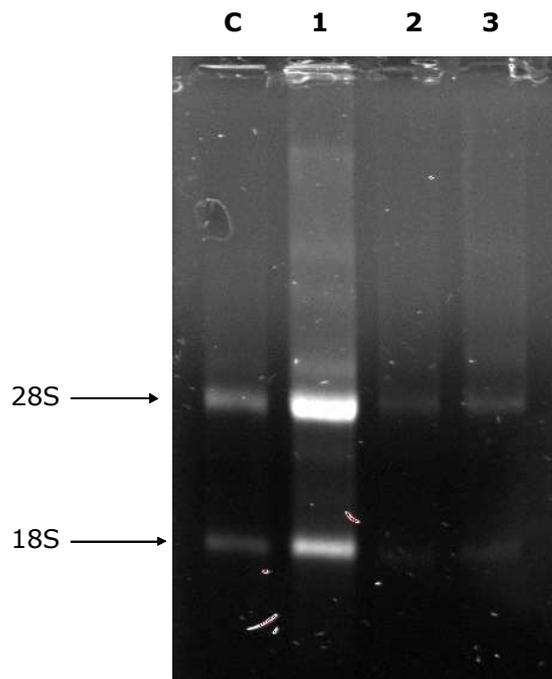
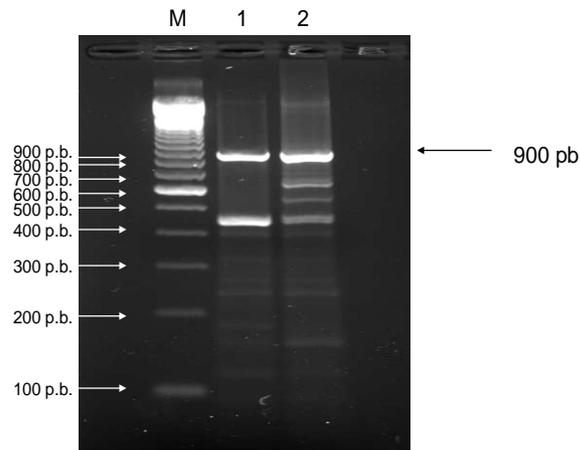


Figura 9.4 Extracciones de RNA total de células HepG2. Donde: C= RNA control, 1= RNA total obtenido de Hep G2 (método de trizol) 2: RNA total obtenido de HepG2 (Qiagen) 3: RNA total obtenido de HepG2 (Qiagen). Se indica la localización del rRNA 28S (arriba) y 18S. Gel de agarosa-formaldehído 1.6%.



M= Marcador de peso molecular ladder 100 p.b.
 1= A partir de RNA total de Hep G2
 2= A partir de RNA total de Hep G2. Gel de agarosa 1.8%

Fig. 9.5 Detección de mRNA de LRP1 en HepG2. La flecha indica la ubicación del producto esperado (900 p.b.). Se muestra a la izquierda el marcador de peso molecular (100 p.b.) y los dos carriles siguientes los productos de dos extracciones independientes de RNA total de HepG2. Se observan productos de amplificación inespecíficos de peso menor a 900pb. Gel de agarosa al 1.8%.

Se verificó la identidad del producto de amplificación de 900 p. b. de la RT-PCR del LRP1, el cual fue purificado y secuenciado de manera directa (Fig.9.6).

Se obtuvo una secuencia de 847 nucleótidos la cual se analizó mediante el programa BLAST. Coincidió con la secuencia almacenada en la base de datos del NCBI: NM002332.2 de *Homo sapiens*, la cual corresponde al mRNA del gen LRP1 (score: 1450 bits (785); identidades 829/847).

9.3 Determinación de los cambios en los niveles de LRP1 en la superficie celular en HepG2 en presencia del DENV.

Se hicieron experimentos de citometría de flujo con células HepG2 infectadas por DENV-2. El análisis de los niveles de membrana del LRP1 se hizo a las 14 h post-infección. Los resultados se muestran en la figura 9.7. Se observaron diferencias en la cantidad del LRP1 presente en la membrana celular en función de la dosis viral manteniendo el tiempo post-infección constante. Hubo un aumento del nivel en membrana del LRP1 en las células HepG2 al aumentar la dosis viral infecciosa probablemente debido al estímulo por la internalización del DENV a través de este receptor.

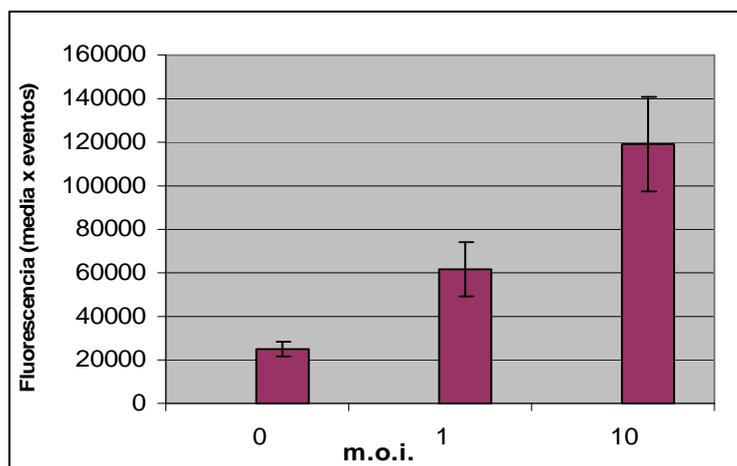


Figura 9.7 Modificaciones observadas en los niveles del LRP1 presentes en la superficie de células HepG2 infectadas con diferentes cantidades de DENV-2 a las 14 h post-infección mediante citometría de flujo.

Paralelamente, se llevó a cabo el mismo tipo de experimento manteniendo constante la multiplicidad de infección (m.o.i. 10) y observando el efecto producido de la infección viral en la expresión del LRP1 a diferentes tiempos post-infección: 14, 24 y 36 h. Los resultados se muestran en la Fig. 9.8. Nuevamente se observó un cambio significativo en las células infectadas respecto a las no infectadas sugiriendo que la ocupación del LRP1 por el DENV-2 puede estimular su presentación en la superficie. Se observa una disminución relativa a las 36 h post-infección posiblemente debido a la pérdida de la viabilidad que va ocurriendo con el transcurso de la infección.

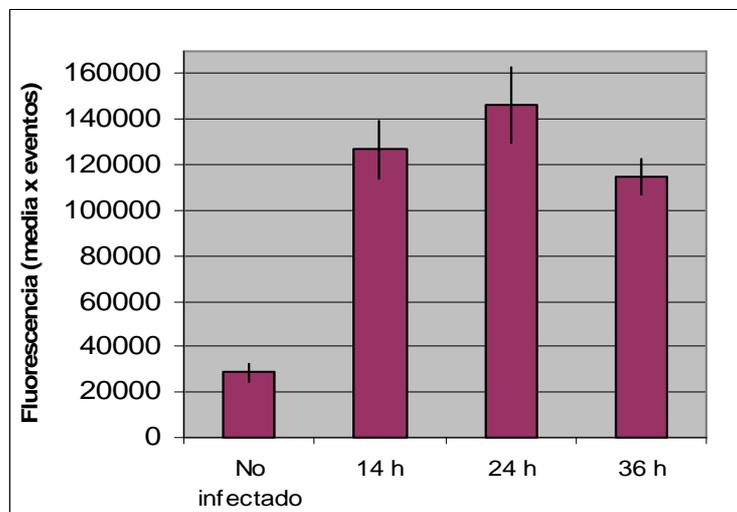


Figura 9.8 Modificaciones observadas en los niveles del LRP1 en la superficie en células HepG2 infectadas con DENV-2 a diferentes tiempos post-infección, manteniendo constante la dosis viral (m.o.i de 10) mediante citometría de flujo.

9.4 Evaluación de la internalización del ^{35}S -DENV-2 en células HepG2 tratadas con RNA de interferencia para LRP1.

En células HepG2, se llevaron a cabo ensayos de silenciamiento genético del mRNA del LRP1. Para ello se utilizó un RNA de interferencia (siRNA) específico. Se evaluó la cantidad óptima a ser utilizada (ver fig. 9.9) la cual fue de 20 pmoles; con ésta se alcanzó un 50% de disminución en la cantidad de mRNA del gen del LRP1. Se evaluó el silenciamiento del mRNA del LRP1 mediante RT-PCR y análisis densitométrico (ver Fig.9.9).

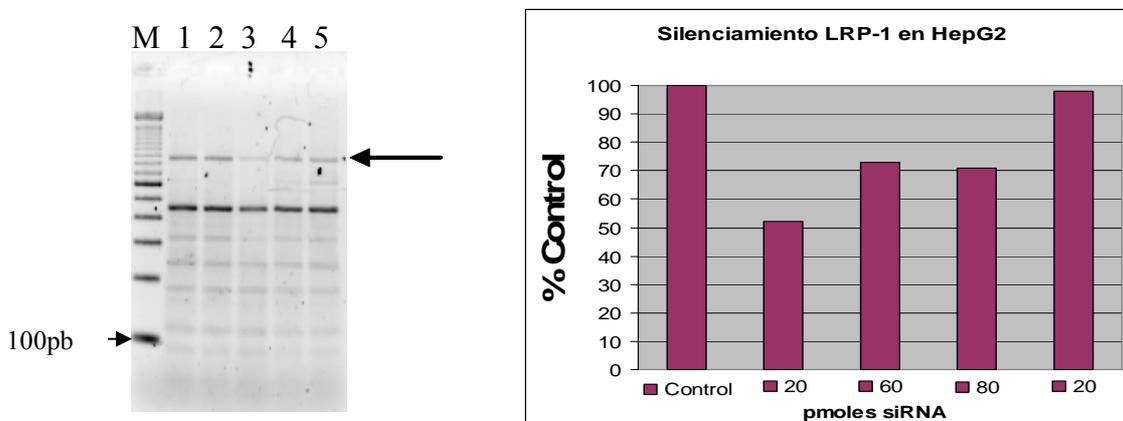


Figura 9.9 Izquierda. Resultados de la RT-PCR del mRNA del LRP1 de células HepG2 transfectadas con siRNA. La flecha indica la ubicación del amplicón del LRP1 (900 p.b.): 1=Control HepG2 no transfectadas; 2= HepG2 transfectadas con siRNA no dirigido al mRNA del LRP1 (20 pmol); 3= HepG2 transfectadas con 20 pmoles siRNA LRP1; 4= Con 60 pmoles; 5= Con 80 pmoles. M=marcador de peso molecular de 100 p.b. Gel de agarosa al 1.8%. Se sometió a RT-PCR la misma cantidad de RNA total (1 ug) Derecha: análisis densitométrico del amplicón de LRP1 (gel izquierdo) de las células HepG2 transfectadas con siRNA dúplex de LRP1.

Se transfectaron células HepG2 con siRNA para LRP1 las cuales posteriormente se infectaron con 10000 cpm iniciales

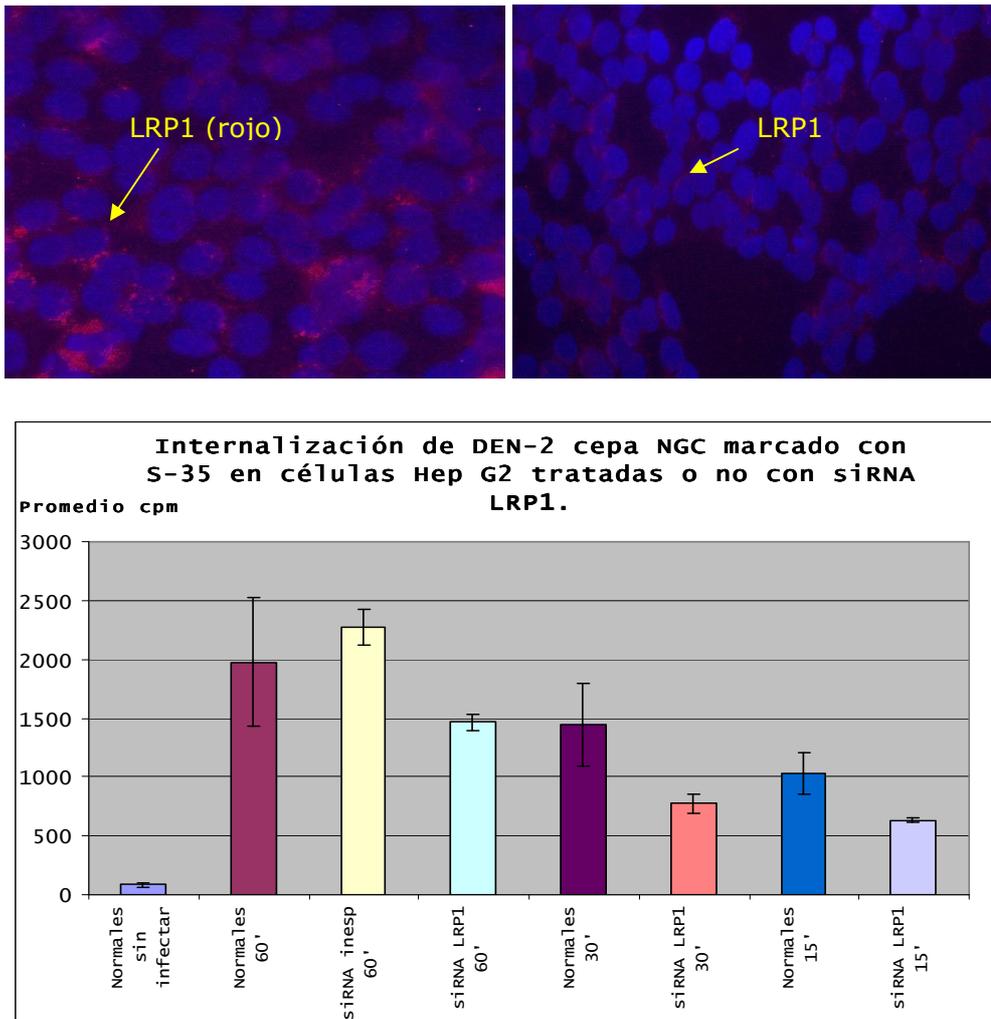


Fig.9.10 Superior: Imágenes de inmunofluorescencia indirecta para detectar el receptor LRP1 en células HepG2 sin transfección con siRNA para LRP1 (izquierda) o con 20 pmoles de siRNA para LRP1 (derecha). LRP1 teñido con rodamina, núcleos con DAPI (azules). Se observa una disminución en la señal del LRP1 en las células transfectadas con siRNA LRP1 en comparación con las que no lo fueron.

Inferior: Resultado de la internalización de ³⁵-S DENV-2 en diferentes tiempos (minutos) de infección en células HepG2 transfectadas con siRNA específico para LRP. Normales se refiere a células HepG2 no transfectadas pero que tuvieron el mismo tratamiento que las transfectadas con siRNA específico

de ³⁵S-DENV-2 durante diferentes tiempos de infección: 15, 30 y 60 min. Los resultados obtenidos sugieren una participación del LRP1 en la internalización viral como se observa en la gráfica de la fig. 9.10 (inferior). Se observó

una correlación directa entre la cantidad de virus internalizado y el tiempo de infección. Hubo una disminución en la incorporación del virus marcado radiactivamente en comparación con el control normal no transfectado con siRNA en aproximadamente un 40% semejante al nivel estimado alcanzado de silenciamiento genético del LRP1.

El resultado obtenido demostró que la disminución en la expresión del LRP1 en la superficie celular (Fig. 9.10 superior) mediante la degradación del mRNA del LRP1 por un siRNA específico, disminuye de manera directa en la internalización del DENV-2 en las células HepG2, sugiriendo la participación del LRP1 en el proceso de infección viral.

9.5 Evaluación de la interacción del DENV-2 con β 2GPI mediante coimmunoprecipitación.

Con el objeto de evaluar la participación de la proteína β 2GPI durante la infección del DENV-2 en las células HepG2 se procedió a la obtención de esta proteína a partir de plasma humano. El producto obtenido (aproximadamente 500ug) presentó un peso molecular de 52.6 KDa. La identidad se corroboró mediante western-blot (inmunodetección) con anticuerpos específicos anti- β 2GPI humana (Fig 9.11).

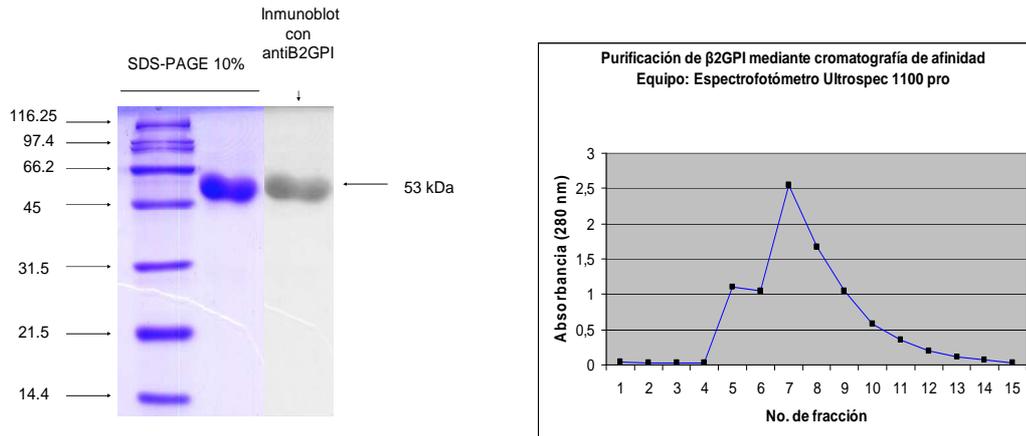
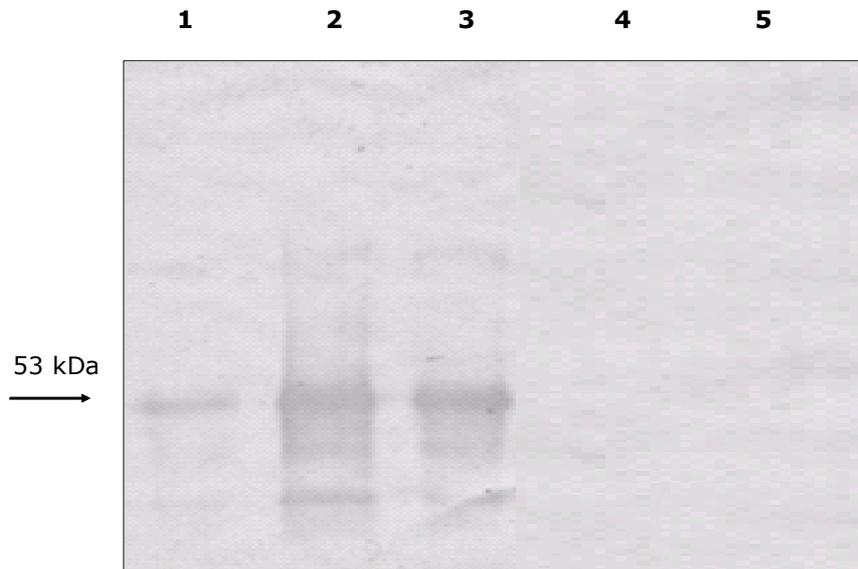


Figura 9.11 Derecha: perfil de elución de proteínas a través de la columna de heparina. Se recolectaron las fracciones 5 a 10. Derecha: Electroforesis SDS-PAGE (10%). Gel teñido con azul de Coomassie de la proteína purificada obtenida e inmunoblot para confirmar la identidad de la proteína purificada como β2GPI.

Para evaluar la posible interacción del DENV-2 con la β2GPI se prepararon esferas de agarosa-proteína A, con anticuerpos anti-DENV-2 monoclonales murinos (dirigidos contra la proteína E), las cuales se incubaron con el DENV-2 en presencia y en ausencia de β2GPI. Se reveló la presencia de DENV-2 y de β2GPI en el producto de coinmunoprecipitación mediante western-blot con anticuerpos anti-DENV-2 y anti-β2GPI por separado (ver figs. 9.12 "a" y 9.12 "b").

Los controles negativos procesados fueron: 1) esferas de agarosa-proteína A incubadas sólo con β2GPI (sin anti-DENV-2); 2) esferas de agarosa-proteína A con DENV-2 y β2GPI (sin anti-DENV-2) y 3) esferas de agarosa-proteína A con anti-DENV-2 y β2GPI (sin DENV-2) no mostraron precipitación inespecífica (ver figs. 9.12 "a" y "b").

Inmunodetección con anticuerpos anti-DENV-2

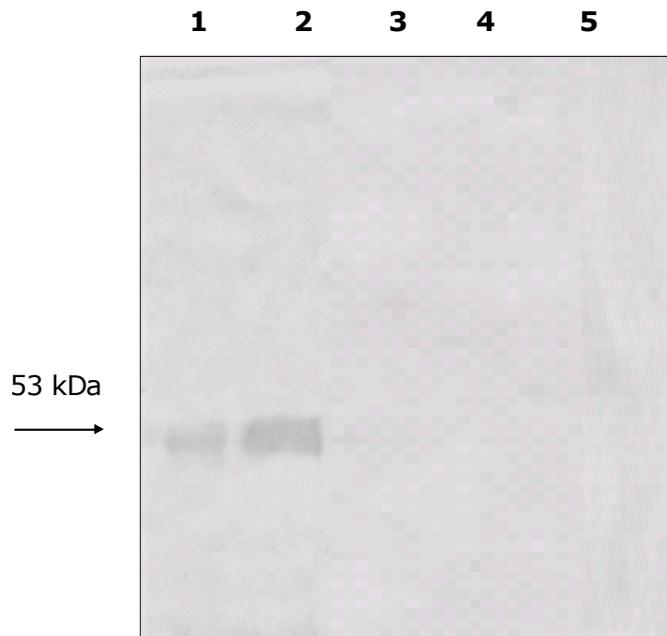


Carriles: 1= DENV-2 puro; 2= inmunoprecipitado de DENV-2 con anti-DENV-2; 3= coinmunoprecipitado de β 2GPI y DENV-2 con anti-DENV-2; 4= control negativo de esferas de agarosa-proteína A con DENV-2 puro y β 2GPI sin anti-DENV-2; 5= control negativo de esferas de agarosa-proteína A con DENV-2 puro y β 2GPI en presencia de un anticuerpo inespecífico.

Figura 9.12"a". Inmunodetección de DENV-2 y β 2GPI en producto de coinmunoprecipitación. Se prepararon esferas de agarosa-proteína A con anticuerpos anti-DENV-2 y posteriormente se incubaron con DENV-2 en presencia y en ausencia de β 2GPI. Las proteínas precipitadas de la misma muestra que en la fig. 9.12"b" se identificaron mediante western-blot. Los anticuerpos anti-DENV-2 se dirigen contra la proteína de envoltura (proteína E de 53 kDa).

El resultado obtenido demuestra la capacidad de unión de la β 2GPI al DENV-2 *in vitro* la cual podría ser relevante para la interacción del DENV-2 con el LRP1 en particular y la cual podría explicar la aparición de anticuerpos anti- β 2GPI (anticuerpos antifosfolípido) en pacientes infectados con DENV, como se ha descrito en el planteamiento del problema.

Inmunodetección con anti- β 2GPI



Carriles: 1= β 2GPI pura; 2= coimmunoprecipitado de β 2GPI y DENV-2 con anti-DENV-2; 3= control negativo de esferas de agarosa-proteína A incubadas sólo con β 2GPI; 4= control negativo de esferas de agarosa-proteína A con DENV-2 puro y β 2GPI sin anti-DENV-2; 5= control negativo de esferas de agarosa-proteína A con anti-DENV-2 y β 2GPI sin DENV-2.

Figura 9.12 "b". Inmunodetección de DENV-2 y β 2GPI en producto de coimmunoprecipitación. Se prepararon esferas de agarosa-proteína A con anticuerpos anti-DENV-2 y posteriormente se incubaron con DENV-2 en presencia y en ausencia de β 2GPI. Las proteínas precipitadas de la misma muestra que en la fig. 9.12 "a" se identificaron mediante western-blot. Se indica el peso molecular de la β 2GPI de aproximadamente 53 kDa (52.6 kDa).

9.6 Detección de proteínas de unión de células HepG2 con el DENV-2.

De manera paralela al estudio de la participación del receptor LRP1 en la internalización del DENV-2 en el hepatocito, se realizaron ensayos VOPBA del DENV-2 con extractos de proteínas totales de células HepG2. Fueron

observadas dos bandas reactivas con el DENV-2 las cuales se señalan en la figura 9.13 (izquierda). Éstas se aislaron y analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF para su posible identificación (ver Fig. 9.13, derecha).

Los resultados obtenidos tras el análisis de los iones masa en Aldente y Mascot identificaron con los mejores scores posibles alcanzados a la banda de 92 KDa con la proteína GRP94 y a la banda de 75 KDa con la proteína GRP78/BiP.

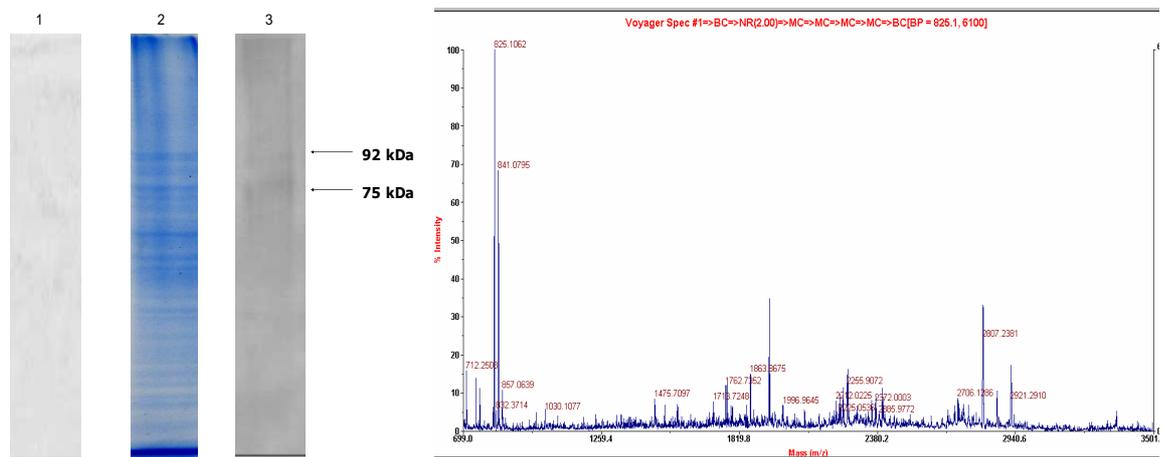


Figura 9.13 Izquierda: Ensayo VOPBA indicando dos regiones de proteínas totales HepG2 que reconocen al DENV-2 NGC. Se muestra la separación electroforética del extracto de proteínas totales de células HepG2 en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie (2) y la membrana de nitrocelulosa del VOPBA de una réplica del mismo gel indicando las bandas reactivas de aproximadamente 75 y 92kDa (3); las flechas señalan las bandas de proteína que unen al DENV-2. (1) es un control negativo no incubado con DENV-2 previo a la incubación con el anticuerpo primario anti-DENV.

Derecha: Espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF de la banda de masa molecular alrededor de 92KDa.

10.- D I S C U S I O N

El DENV puede infectar tanto hepatocitos primarios como líneas celulares de hepatoma (32, 79). Desde el punto de vista clínico, durante la infección por el DENV se observa hepatomegalia y otros hallazgos de laboratorio que demuestran daño hepático (33). Se ha descrito que el DENV-2 ocasiona mayor daño hepático en comparación con los otros serotipos (80).

En mamíferos, se ha sugerido que la internalización del DENV en la célula blanco no ocurre a través de un único receptor sino que participan varias moléculas que forman parte de un complejo de internalización. La composición de este complejo podría ser diferente en función del tejido. El heparán sulfato se ha identificado como receptor del DENV así como también para distintos virus de la familia *Flaviviridae*; se trata de una molécula muy ubicua cuya presencia en la superficie permite la adhesión del virus a las células que la expresan (48, 81-83). En células de hepatoma han sido identificadas dos proteínas como posibles correceptores celulares: la proteína GRP78/BiP (49) y el receptor de alta afinidad de laminina de 37/67kDa (84-85). Sin embargo, no se conocen los mecanismos que participan en la internalización del DENV en el hepatocito.

El receptor de laminina de alta afinidad de 37/67kDa ha sido propuesto como correceptor para el DENV con base en la identificación de proteínas de unión al virus transferidas a un soporte sólido obtenidas a partir de extractos celulares de células de hepatoma (84-85).

En el presente trabajo, los ensayos VOPBA unidimensionales ejecutados con proteínas totales de lisados completos de células HepG2 permitieron identificar mediante MALDI-TOF dos proteínas de unión al DENV-2 con pesos moleculares aproximados de 75 y 92KDa. El análisis de los iones masa obtenidos de la banda de 92KDa para su identificación sugirió que la proteína presente era GRP94 (endoplasmina), una proteína chaperona. Por su parte, la banda de 75KDa se identificó como la proteína GRP78/BiP. En los ensayos VOPBA unidimensionales realizados no se comprobó la identidad de las proteínas hepáticas sugeridas GRP94 y GRP78/BiP con anticuerpos específicos, por lo que su identificación, posible reconocimiento y significado en el contexto de la internalización viral, aún tendrá que ser confirmado.

La proteína GRP78/BiP pertenece a la familia de proteínas de choque térmico 70 (HSP70); comparte un 64% de homología con la proteína HSP70-1a. En el humano, esta familia de proteínas comprende al menos ocho proteínas

distintas que se diferencian entre si en cuanto a su secuencia de aminoácidos, localización celular y perfil de expresión (86). Entre las funciones generales de las proteínas chaperonas se encuentran: el transporte de proteínas entre compartimientos celulares, degradación de proteínas inestables o con plegamiento erróneo, inhibición de formación de complejos de proteínas, plegamiento de proteínas, desnudamiento de vesículas recubiertas de clatrina y el control de proteínas reguladoras (86).

Existen dificultades para asignar un papel biológico a la proteína GRP78/BiP durante la internalización del DENV en el hepatocito ya que inicialmente se le describió como una proteína de localización intracelular, específicamente en el interior del retículo endoplásmico debido a que posee una secuencia de señalización intracelular en su extremo amino terminal y adicionalmente en su extremo carboxilo terminal una secuencia señal de retención (86). Sin embargo recientemente, de manera interesante, se ha demostrado que la proteína GRP78/BiP también se localiza en la superficie celular (49, 87-89), asignando diferentes funciones biológicas a la proteína GRP78/BiP presente en la membrana celular (50-52). Existen evidencias de que la señalización celular de la proteína α_2 -macroglobulina ocurre a través de la proteína GRP78/BiP presente en la membrana

celular y que esta interacción depende del receptor multiligandos LRP1 (50-52). Se ha descrito que la vía de señalización celular mediada por GRP78/BiP es distinta de la del LRP1 (53). Mediante ensayos de coimmunoprecipitación, se ha demostrado que la proteína GRP78/BiP se asocia con el receptor LRP1 presente en la superficie celular. Asimismo, se ha propuesto que durante el tráfico molecular a través del retículo endoplásmico, una parte del receptor LRP1 se asocia con la proteína GRP78/BiP y de esta manera este complejo alcanza la superficie celular.

Como modelo de estudio en la relación GRP78/LRP1 se ha analogado al sistema uPA/uPAR (ampliamente estudiado), el cual interactúa a través del LRP1 (58). Se conoce que la señalización de uPA depende exclusivamente de su unión al uPAR; sin embargo el complejo uPA/uPAR es internalizado a través del LRP1 regulando de esta manera al receptor uPAR (90). Este sistema ha sido útil para proponer una relación similar entre las proteínas GRP78/BiP, α_2 -macroglobulina y LRP1 (91).

El receptor LRP1 tiene un peso molecular elevado de 600KDa y cuenta con una subunidad de 515kDa que se encuentra asociada de manera no covalente a otra subunidad de 85kDa que es el dominio de unión a la membrana, por lo que no tiene propiedades de unión con

ligandos extracelulares. El peso molecular y la complejidad estructural hacen que su detección en los ensayos VOPBA llevados a cabo tanto en este trabajo como en el de otros grupos no se observe.

De lo encontrado experimentalmente en este trabajo junto con lo descrito en relación a la proteína GRP78/BiP como correceptor del DENV en el hepatocito, se propone que el receptor LRP1 forma parte del complejo de internalización viral de manera similar a como se ha propuesto para el sistema de la α_2 -macroglobulina y el GRP78/BiP. Como se ha descrito previamente, la proteína de membrana LRP1 es un receptor multiligando que se expresa abundantemente en el hepatocito, el cual presenta una alta afinidad para unir diferentes moléculas estructuralmente no relacionadas (58, 92).

En apoyo a esto, se determinó que la infección por el DENV a tiempos cortos aumentó la cantidad de moléculas del receptor LRP1 presentes en la superficie de los hepatocitos humanos, lo cual sugiere su participación durante la infección viral.

Así mismo, un silenciamiento alcanzado del LRP1 de un 50% redujo la internalización del DENV-2 en la célula HepG2 en un 40%. Este resultado sugiere que el receptor LRP1 puede

tener una participación específica en la formación del complejo de internalización del DENV-2.

Por otra parte, cabe mencionar en cuanto a la proteína GRP94, que ensayos de competencia entre ésta con la α_2 -macroglobulina, inicialmente permitieron proponer que la proteína GRP94 se unía al LRP1. Sin embargo, observaciones posteriores en el macrófago demostraron que no ocurre dicha unión. También se ha informado que las células HepG2 no muestran capacidad de unir GRP94 en su superficie (93).

Diferentes hallazgos referentes tanto a la infección por el DENV como por otros virus pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, condujeron de manera indirecta a proponer la participación del receptor LRP1 en la internalización del DENV en el hepatocito. Por un lado, se tiene evidencia que virus de la familia *Flaviviridae* (HCV, BVDV) pueden utilizar como correceptores para la internalización celular temprana a proteínas de la superfamilia del rLDL (74,94). Por el otro, un hallazgo clínico importante en pacientes infectados tanto con HCV como con DENV es la presencia de anticuerpos antifosfolípido (afL) los cuales incrementan en pacientes con cuadro clínico de mayor gravedad, lo cual también correlaciona con la presencia de disfunción hepática (67,

95). Se conoce que estos anticuerpos reconocen a la proteína plasmática β 2GPI (96-98).

Es importante reconocer que en la literatura existen únicamente un par de reportes de afL en dengue (99). Sin embargo, durante la infección por el VHC (el cual también pertenece a la familia *Flaviviridae*) se ha documentado ampliamente la presencia de afL (100-101), así como también durante la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), otro virus hepatotrópico (102). Se ha sugerido que los afL en infecciones virales, puedan generarse con base a la presencia de mimetismo molecular entre la β 2GPI con antígenos virales estructurales (103). Otra posibilidad, es que la presencia de afL en infecciones virales sea debida a la interacción física directa del virus con la β 2GPI. En el caso del VHB, se ha demostrado experimentalmente la unión de este virus con la proteína plasmática β 2GPI (104). Por otra parte, se conoce que existe una interacción de las proteínas plasmáticas β 2GPI y C4bBP, ambas pertenecientes a la superfamilia CCP, con los receptores celulares multiligandos miembros de la superfamilia del receptor LDL: megalina (LRP2) y el receptor LRP1 (63-65).

En este trabajo se analizó mediante coimmunoprecipitación la capacidad de unión de la proteína β 2GPI con el DENV-2 purificado. Los resultados obtenidos en el presente trabajo

(ver fig. 9.12) demostraron de manera específica la existencia de esta interacción a nivel *in vitro*.

Con base en lo anterior, proponemos que en el hepatocito, el complejo de internalización puede estar constituido por las proteínas: GRP78/BiP y LRP1, además del heparán sulfato. Asimismo, la interacción *in vitro* de la β 2GPI con el DENV podría explicar la presencia de afL en los pacientes con esta infección.

Por último, la internalización celular del LRP1 ocurre a través de endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina (61). El papel de la clatrina en la internalización del DENV no ha sido estudiado, sin embargo es de esperarse su participación al igual que en la internalización de otros virus de la familia *Flaviviridae* en los que sí se ha demostrado (105-107). Su utilización sería consistente con la participación del receptor LRP1 durante la infección por el DENV del hepatocito.

11.- CONCLUSIONES

11.1 Mediante ensayos de silenciamiento, demostramos la participación del receptor LRP1 durante la infección por el DENV-2 en células de hepatoma humano HepG2.

11.2 En el complejo de internalización viral en el hepatocito pueden participar tanto la proteína GRP78/BiP como el receptor LRP1.

11.3 El DENV-2 interacciona físicamente con la proteína plasmática β 2GPI, la cual podría ser importante en formación del complejo de internalización del DENV-2 en el hepatocito.

12.- REFERENCIAS

- 1.- Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (2005). Editorial Elsevier Academic Press. Estados Unidos.
- 2.- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. *Brock Biología de los microorganismos*. Octava edición. Editorial Prentice Hall. España. 1998.
- 3.- Fauquet C. M. *Viral Classification and Nomenclature*. En: *Encyclopedia of life sciences* (2006). Editorial John Wiley and sons. Estados Unidos.
- 4.- ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>
- 5.- ICTVdB Management (2006). Flaviviridae. En: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3, Columbia University, New York, USA. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA
- 6.- Lindenbach, B.D., Rice, C.M. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. En: *Fields Virology*. Cuarta edición. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. Estados Unidos. 2001.
- 7.- Barth, O. M.. Replication of dengue viruses in mosquito cell cultures. A model from ultrastructural observations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87(4): 565-574.
- 8.- Clyde K., Kyle J. L., Harris E., Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 2006; 80(23): 11418-11431.
- 9.- Kuno, G. Chang Gwong Jen, J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their

- evolutionary trends. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 608-637.
- 10.- Kuno G., Chang Gwong-Jen J., Tsuchiya R., Karabastos N., Cropp C. B. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol* 1998; 72(1): 73-83
- 11.- Cook S., Holmes E. C. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Arch Virol* 2006; 151(2): 309-325
- 12.- ICTVdB Management (2006). Flavivirus. En: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA
- 13.- Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., and Harrison, S.C.. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2A resolution. *Nature* 1995; 375: 291-298.
- 14.- Kuhn, R.J., Zhang W., Rossmann M. G. , Pletnev S. V., Corver J., Lenches E., Jones C. T., Mukhopadhyay S., Chipman P. R., Strauss E. G., Baker T. S., Strauss J. H. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell* 2002; 108(5): 717-725.
- 15.- Rey F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *PNAS* 2003; 100(2): 6899-6901.
- 16.- Lorenz, I. C., Allison, S. L., Heinz, F. X. & Helenius, A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 2002; 76(11): 5480-5491.
- 17.- Mukhopadhyay S., Kuhn R., Rossmann, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews microbiology* 2005; 3: 13-22.

- 18.- Knipe , D. M., Howley, P. *Flavivirus En: Fields Virology*. Quinta edición. Editorial Elsevier Science. Estados Unidos 2006.
- 19.- Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A. "Tick-borne encephalitis" *Antiviral res* 2003; 57: 129-146.
- 20.- Barret DT A. *Flaviviruses en: Encyclopedia of life sciences* (2002) Editorial John Wiley and sons. Estados Unidos.
- 21.- White D. O., Fenner F. J. *Medical virology*. Cuarta edición. Editorial Academic Press. 1999. Estados Unidos.
- 22.- Fischer-Hoch, S., McCormick, J. *Pathogenesis of haemorrhagic fevers. En: Zuckerman A., Banatvala J., Pattison J. (editores). Principles and practice of Clinical Virology*. Editorial Wiley. Chichester, Inglaterra.
- 23.- Le Guenno, B. *Haemorrhagic fever viruses. En: Encyclopedia of life sciences* (2001). Editorial John Wiley and sons. Estados Unidos.
- 24.- Joshi V., Mourya D.T., Sharma C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes Aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67(2): 158-161
- 25.- *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*. Segunda edición. World Health Organization. Geneva, 1997.
- 26.- Gubler, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(3): 480-496
- 27.- Guzman M. G., García G., Kouri G. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. *Rev Panam Salud pública* 2006; 19(3): 204-215.
- 28.- En: <http://www.ssa.gob.mx> : Programa de acción. enfermedades transmitidas por vector. Secretaría de salud. (2001). México, D. F.

- 29.- Ramos C. Biología de la infección causada por el virus del dengue. *Salud pública de México* 1989; 31(1): 54-69.
- 30.- Seijo A. El dengue como problema de salud pública. *Arch argent pediatr* 2001; 99(6): 510-521.
- 31.- Jessie, K. Fong, M. Y., Devi, S., Lam, S. K., Wong, K. T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* 2004; 189: 1411-1418.
- 32.- Anderson, R., Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003; 59: 229-274
- 33.- Seneviratne SL, Malavige GN, De Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 608-614.
- 34.- Mohan B., Patwari A. K., Anand V. K. Hepatic dysfunction in childhood dengue infection. *J Trop Pediatr* 2000; 46(1): 40-43.
- 35.- Kuo, C. H., Tai, D. I., Chang-Chieng, C. S., Lan, C. K., Chiou, S. S., Liaw, Y. F. Liver biochemical tests and dengue fever. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47: 265-270.
- 36.- Nimmannitya, S. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987; 18(3): 392-397.
- 37.- Wahid S. F., Sanusi S., Zawawi M. M. A comparison of the pattern of liver involvement in dengue haemorrhagic fever with classic dengue fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31(2): 259-263.
- 38.- Souza, L. J., Alves, J. G., Nogueira, R. M. R., Neto, C. G., Bastos, D. A., Da Silva-Siqueira, E. W., Souto-Filho, J. T. D., Cezario, T. A., Soares, C. E., Carneiro, R. C. Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients

with dengue fever. Analysis of 1585 cases. *Braz J Infect Dis* 2004; 8(2): 156-163.

39.- Kittigul, L., Pitakarnjanakul, P., Sujirarat, D. Siripanichgon, K. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. *J Clin Virol* 2007; 39 (2): 76-81

40.- Ling, L. M., Wilder-Smith, A., Leo, Y. S. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. *J Clin Virol* 2007; 38(3): 265-268

41.- Petdachai, W. Hepatic dysfunction in children with dengue shock syndrome. *Dengue bulletin* 2005; 29: 112-118.

42.- Miagostovich M. P., Ramos R. G., Nicol A. F., Nogueira R. M., Cuzzi-Maya T., Oliveira A. V. Marchevsky R. S., Mesquita R. P., Schatzmayr H. G. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol* 1997; 16(4): 204-208.

43.- Couvelard A., Marianneau P. Bedel C., Drouet M. T., Vachon F., Henin D., Deubel V. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum Pathol* 1999; 30(9): 1106-1110.

44.- Rosen, L., Khin, M. M., Tin, U. Recovery of viruses from the liver of children with fatal dengue: reflections on the pathogenesis of the disease and its possible analogy with that of yellow fever. *Res Virol* 1989; 140(4): 351-360.

45.- Bhamarapravati, N. Pathology of dengue infections en: Gubler, D. J., Kuno, G. Editores. Dengue and dengue haemorrhagic fever. 1997. Cambridge University press, Cambridge, pp 115-132.

46.- Quaresma, J.A.S., Duarte, M.I.S., Vasconcelos P.F.C. Midzonal lesions in yellow fever: A specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ

inflammatory response. *Med Hypotheses* (2006); 67: 618-621.

47.- Principles of Molecular Virology. Alan J. Cann. Elsevier academia press. 4th edition 2005 pagina64

48.- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J.D., Linhardt, R. J., Marks, R. M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 1997; 3(8): 866-871.

49.- Jindadamrongwech S., Thepparit C., Smith D. R. Identification of GRP 78(BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 2004; 149(5): 915-927.

50.- Misra, U. K., Chu, C. T., Gawdi, G., Pizzo, S. V. Evidence for a second alpha2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 1994; 269(17): 12541-12547.

51.- Misra, U. K., Chu, C. T., Gawdi, G., Pizzo, S. V. The relationship between low density lipoprotein-related protein/alpha 2-macroglobulin (alpha 2M) receptors and the newly described alpha 2M signaling receptor. *J Biol Chem* 1994; 269(28): 18303-18306.

52.- Misra, U. K. Sharma T., Pizzo, S. V. Ligation of cell surface-associated glucose-regulated protein 78 by receptor-recognized forms of alpha2-macroglobulin: activation of p21-activated protein kinase-2-dependent signaling in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 2005; 175: 2525-2533.

53.- Mahmood Hussain, M., Kancha R. K., Tulenko, T. N. Nickel is a specific inhibitor for the binding of activated alpha2-macroglobulin to the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *Biochemistry* 1995; 34(49): 16074-16081.

- 54.- Misra, U. K., Gonzalez-Gronow, M., Gawdi G., Hart, J. P., Johnson, C. E., Pizzo, S. V. The role of Grp 78 in alpha2-macroglobulin-induced signal transduction:evidence from RNA interference that the low density lipoprotein receptor- related protein is associated with, but not necessary for, GRP 78-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 42082-42087.
- 55.- Zheng, G., Bachinsky D. R., Stamenkovic, I., Strickland, D. K., Brown, D., Andres, G., McCluskey, R. T. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem* 1994; 42(4): 531-542
- 56.- Strickland D. K., Ranganathan S. Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling. *J Throm Haemost* 2003; 1(7): 1663-1670.
- 57.- Wilnow, T. E. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med* 1999; 77(3): 306-315.
- 58.- Herz, J., Strickland, D. K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. 2001. *J Clin Invest* 108(6): 779-784.
- 59.- Lillis, A. P., Mikhailenko, I., Strickland D. K. Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8): 1884-1893.
- 60.- Parkyn, C. J, Vermeulen E. G. M., Roy C. Mootosamy, R. C., Sunyach, C., Jacobsen, C., Oxvig, C., Moestrup, S., Liu, Q., Bu, G., Jen, A., Morris, R. J. LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. *J Cell Sci* 2007; 121 (Pt 6): 773-783.

- 61.- Blacklow, S. C. Versatility in ligand recognition by LDL receptor family proteins: advances and frontiers. *Curr Opin Struct Biol* 2007; 17(4): 419-426.
- 62.- Strickland, D. K., Medved, L. Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-mediated clearance of activated blood coagulation co-factors and proteases: clearance mechanism or regulation? *J Thromb Haemost* 2006; 4(7): 1484-1486
- 63.- Moestrup SK, Schousboe I, Jacobsen C, Leheste JR, Christensen EI, Willnow TE. β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) and β 2-glycoprotein I-phospholipid complex harbor a recognition site for the endocytic receptor megalin. *J Clin Invest* 1998; 102(5): 902-909.
- 64.- De Groot, P. G., Van Lummel, M., Pennings, M., Urbanus, R., Bas de Laat, H., Lenting, P. J., Derksen, R. H. W. M. Beta2-glycoprotein I and LDL-receptor family members. *Thromb Res* 2004; 114(5-6): 455-459.
- 65.- Westein E, Denis CV, Bouma BN, Lenting PJ. The alfa chains of C4b-binding Protein mediate complex formation with low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 2002; 277(4): 2511-2516.
- 66.- Reid K., Day A. J. Structure-function relationship of the complement components. *Immunol Today* 1989; 10(6): 177-180.
- 67.- Cheng H. M. Correspondence to the editor: hepatitis viruses and antiphospholipid autoantibodies. *Hepatology* 1997; 25(3): 781.
- 68.- De Groot P. G., Derksen R. H. W. M. Pathophysiology of antiphospholipid antibodies. *J Med* 2004; 62(8): 267-272.
- 69.- Polz E., Kostner G. M. The binding of β 2-glycoprotein I to human serum lipoproteins. Distribution among density fractions. *FEBS Lett* 1984; 102(1): 183-186.

- 70.- Steinkasser A., Estaller C., Weiss E. H., Sim R. B. Complete nucleotide and deduced aminoacid sequence of β 2-glycoprotein I. *Biochem J* 1991; 277(Pt 2): 987-391.
- 71.- Mehdi H., Aston C. E., Sanghera D. K., Hamman R. E., Ilyas Kamboh M. Genetic variation in the apolipoprotein H (β 2-glycoprotein I) gene affects plasma apolipoprotein H concentrations. *Hum Genet* 1999; 105(1-2): 63-71.
- 72.- Schwarzenbacher R., Zeth C., Diederichs K., Gries A., Kostner G. M., Laggner P., Prassi R. Human structure of human β 2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid síndrome The EMBO journal 1999; 18(22): 6228-6239.
- 73.- Lozach P. Y., Lortat-Jacob H., et. al. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003; 278(22): 20358-20366.
- 74.- Agnello V., Abel G., Elfahal, M., Knight G. B., Zhang Q. X. Hepatitis C and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *PNAS* 1999; 96(22): 12766-12771.
- 75.- Bartosch, B., Cosset, F. L. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006; 348(1): 1-12.
- 76.- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30(3): 545-551.
- 77.- Hollborn M, Birkenmeier G, Saalbach A, Iandiev I, Reichenbach A, Wiedemann P, Kohen L. Expression of LRP1 in retinal pigment epithelial cells and its regulation by growth factors. *IOVS* 2004; 45(6): 2033-2038.

- 78.- Thepparit Ch, Phoolcharoen W, Suksanpaisan L, Smith D. Internalization and propagation of the dengue virus in human hepatoma (HepG2) cells. *Intervirology* 2004; 47(2): 78-86.
- 79.- Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith D. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *J Med Virol* 2007; 79(3): 300-307.
- 80.- Vázquez-Pichardo, M., Rosales-Jiménez, C., Rojas-Espinosa, O., López-Martínez, I., Moreno-Altamirano, M. M. B. Is Liver Damage Dependent on the Serotype of Dengue Virus? A Study in Mexico. *Dengue bulletin* 2006; 30: 114-120.
- 81.- Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T. H., Depla, E., Von Weizsacker, F., Blum, H. E., Baumert, T. F. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 2003; 278(42): 41003-41012.
- 82.- Esko, J. D., Lindahl, U. Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* 2001; 108(2): 169-173.
- 83.- Hilgard P and Stockert R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 2000; 32(5): 1069-1077.
- 84.- Thepparit, C., Smith, D. R. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol* 2004; 78(22): 12647-12656.
- 85.- Tio, PH., Jong, WW., Cardoso, M. J. Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMRI) intreraction with dengue virus serotype 1, 2 and 3. *Viol J* 2005; 2(25).

- 86.- Daugaard M., Rohde M., Jaattela M. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping distinct functions. *FEBS Lett* 2007; 581(): 3702-3710.
- 87.- Berger, C. L., Dong, Z. Hanlon, D., Bisaccia, E., Edelson, R. L. A lymphocyte cell surface heat shock protein homologous to the endoplasmic reticulum chaperone, immunoglobulin heavy chain binding protein BiP. *Int J Cancer* 1997; 71(6): 1077-1085.
- 88.- Delbino, A., Piselli, P., Vismara, D., Vendetti, S., Colizzi, V. Cell surface localization of the 78 kD glucose regulated protein (GRP 78) induced by thapsigargin. *Mol Membr Biol* 1998; 15(1): 21-26.
- 89.- Delpino, A., Castelli, M. The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BiP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep* 2002; 22(3-4): 407-420.
- 90.- Andreasen, P. A., Egelund R., Petersen H. H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(1): 25-40.
- 91.- Misra, U. K., Gonzalez-Gronow, M., Gawdi, G., Hart, J. P., Johnson, C. E., Pizzo, S. V. The role of Grp78 in alpha2-macroglobulin-induced signal transduction. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 42082-42087.
- 92.- Grimsley, P. G., Quinn, K. A., Chesterman, C. N., Owensby, D. A. Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) expression varies among HepG2 cell lines. *Thromb Res* 1997; 88(6): 485-498.
- 93.- Berwin, B., Hart, J. P., Pizzo S. V, Nicchitta, C. V. Cutting edge: CD91-independent cross-presentation of

- GRP94 (gp96)-associated peptides. *J Immunol* 2002; 168(9): 4282-4286.
- 94.- Krey, T., Moussay, E., Thiel, H. J., Rumenapf, T. Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol* 2006; 80(21): 10862-10867.
- 95.- Chen, Wei H. An unusual transitory increase of lupus anticoagulant in dengue virus infection complicated with cerebral ischaemia. *J Infect* 2006; 52(3): e87-91.
- 96.- Kandiah, D. A., Krilis, S. A. Anti-beta2-glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in patients with the antiphospholipid syndrome: immunological specificity and clotting profiles. *Lupus* 1998; 7(5): 323-332.
- 97.- Hanly, J. G. Antiphospholipid syndrome: an overview *CMAJ* 2003; 168 (13):1675-1682.
- 98.- Asherson, R. A., Frances, C., Iaccarino, L. Khamashta, M. A., Malacarne, F., Piette, J. C., Tincani, A., Doria, A. The antiphospholipid antibody syndrome: diagnosis, skin manifestations and current therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24(40): S46-S51.
- 99.- Chen, Wei H; Kao, Yi F; Liu, Jia S. An increase of blood anti-beta2-glycoprotein I antibody in Japanese encephalitis associated with cerebral ischemia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16(1): 55-59.
- 100.-. Atta, A.M., Estevam, P., Parana, R., Pereira, C.M., Ousa-Atta, M. L. B. Antiphospholipid antibodies in Brazilian hepatitis C virus carriers. *J Med Biol Res* 2008; 41(6): 489-492.
- 101.- Ramos-Casals, M., Cervera, R., Lagrutta, M., Medina, F., Garcia-Carrasco, et al. Clinical features related to antiphospholipid syndrome in patients with chronic viral infections (hepatitis C virus/HIV infection): description of 82 cases. *CID* 2004; 38: 1009-1016.

- 102.- Guglielmone H, Vitozzi S, Elbarcha O, Fernandez E. Cofactor dependence and isotype distribution of anticardiolipin antibodies in viral infections. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 500-504.
- 103.- Shoenfeld, Y., Blank, M., Cervera, R., Font, J., Raschi, E., Meroni, P-L. Infectious origin of the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(1): 2-6.
- 104.- Mehdi H, Kaplan MJ, Yasar F, Yang X, Bayer R, Sutherland K, Peeples M. Hepatitis B surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol* 1994; 68(4): 2415-2424.
- 105.- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., Rouille, Y. Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol* 2006; 80(14): 6964-6972.
- 106.- Meertens, L., Bertaux, C., Dragic, T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J Virol* 2006; 80(23): 11571-11578.
- 107.- Lecot, S., Belouzard, S., Dubuisson, J., Rouille, Y. Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2005; 79(16):10826-10829.

13.- ANEXO 1: Métodos experimentales.

13.1 Cuantificación y pureza de RNA total

Se utiliza para determinar la concentración de RNA obtenida y estimar su pureza.

Reactivos:

Agua libre de RNAsas

Disolución acuosa de RNA

Equipo:

Espectrofotómetro UV-Visible.

Celdas de cuarzo

Procedimiento:

1.- Preparar una dilución 1:50 en agua libre de RNAsas y leer la absorbancia a 260nm.

Cálculos:

Utilizar la siguiente fórmula para estimar la concentración de RNA

Absorbancia (260nm)x50(factor de dilución)X40= RNA ug/mL.

1unidad de absorbancia de RNA equivale a 40ug/mL de RNA total.

La pureza se estima al medir la absorbancia a 280nm de la dilución hecha anteriormente. Se divide la absorbancia a 260nm entre la absorbancia a 280nm para tener el cociente, A_{260}/A_{280} . El valor aceptable debe ser mayor o igual a 1.7.

13.2 Electroforesis de RNA en condiciones desnaturalizantes

Se utiliza para verificar la integridad del RNA obtenido ya que de encontrarse degradado se observará un barrido continuo en el gel y no será apto para su utilización en la RT-PCR.

Reactivos:

Para preparar 100mL de gel al 1.2% (p/v)

Agarosa: 1.2g

Buffer del gel (10X): 10mL

Formaldehído 37% (12.3M): 1.8mL

Bromuro de etidio 10mg/mL: 1uL

Agua libre de RNAsas: 88.2mL

Buffer del gel (10X): MOPS libre de ácido 200mM, acetato de sodio 50mM, EDTA 10mM pH 7.0

Buffer de corrimiento: Buffer del gel 10X (10mL), formaldehído 37% (20mL), agua libre de RNAsas (880mL).

Buffer de carga de RNA 5X:

solución acuosa saturada de azul de bromofenol: 16uL.

EDTA 500mM, pH=8: 80uL

formaldehído 37%: 720uL

glicerol 100%: 2mL

formamida: 3084uL

Buffer del gel (10X): 4mL

Agua libre de RNAsas: 0.1mL

Equipo:

Cámara horizontal para electroforesis (Bio-Rad)

Fuente de poder

Soporte

Peines

Transiluminador U. V.

Cámara fotográfica

Procedimiento:

Calentar la mezcla para fundir la agarosa. Enfriar a 65°C en baño de agua. Añadir el formaldehído y el bromuro de etidio. Mezclar y poner en el soporte del gel. Antes de correr el gel equilibrar en buffer de corrimiento 1X por lo menos 30min. Preparar las muestras de RNA añadiendo 1

volumen de buffer de carga de RNA 5X por 4 volúmenes de muestra. Mezclar e incubar 3 a 5 minutos a 65°C. Enfriar en hielo y cargar en el gel. Correr el gel a 5-7V/cm en buffer de corrimiento. Al terminar el corrimiento observar el gel con ayuda de un transiluminador U.V. y registrar.

13.3 Electroforesis de DNA (productos de amplificación de PCR) en condiciones no desnaturalizantes.

Se utiliza para detectar los productos de amplificación (amplicones) deseados. También sirve para separarlos y aislarlos para análisis de secuenciación posterior. Es el paso final del proceso de amplificación de ácidos nucleicos por RT-PCR.

Reactivos:

Para preparar 100mL de gel agarosa 1.6% (p/v)

Agarosa ultrapura de bajo punto de fusión: 1.6g

Buffer del gel (TBE 10X): 10mL

Bromuro de etidio 10mg/mL: 5uL

Agua desionizada : 90mL

Buffer tris-borato-EDTA (TBE) 10X: tris base 890mM, ácido bórico 890mM, Na₂EDTA 20mM, agua desionizada, pH=8.3.

Buffer de carga:

Azul de bromofenol: 125mg

xilen cianol: 125mg

glicerol: 25mL

agua desionizada: 25mL

Equipo:

Cámara horizontal para electroforesis (Bio-Rad)

Fuente de poder

Soporte

Peines

Transiluminador U. V.

Procedimiento:

Colocar los ingredientes del gel en un matraz Earlen-Mayer de 250mL. Calentar en horno de microondas hasta que la agarosa esté completamente disuelta. Enfriar a 50°C y añadir el bromuro de etidio. Vaciar la agarosa líquida en el soporte del gel e insertar los peines. Dejar enfriar hasta que solidifique. Llenar el reservorio de la cámara con buffer de corrimiento (buffer TBE 1X). Cuando el gel esté sólido retirar el peine y sumergir en la cámara de electroforesis. Preparar las muestras de PCR añadiendo 1 volumen de buffer de carga de DNA 5X por 4 volúmenes de muestra. Cuando las muestras están cargadas aplicar voltaje 80-100V. El DNA corre hacia el polo positivo (cátodo). Cuando el colorante haya corrido unos $\frac{3}{4}$ de la longitud del gel apagar el voltaje. Retirar cuidadosamente el gel de la cámara y colocarlo en un transiluminador para su visualización. Registrar.

13.4 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) e inmunodetección (Western-blot).

El proceso completo de separación electroforética de una preparación de proteínas mediante electroforesis y posterior electrotransferencia a una membrana para la inmunodetección (Western-blot) se utiliza para evaluar la pureza e identidad de las proteínas de interés.

a) Preparación del gel de poliacrilamida.**Reactivos:**

- Mezcla de Acrilamida (29% p/v) *N, N'*-metilenbisacrilamida (1% p/v)
pH=7.0.
- Dodecilsulfato de sodio al 10% (p/v).
- Tris-base 1.5M pH=8.8
- Persulfato de amonio al 10%.

- TEMED (grado electroforético)
 - Tris-base 1.0M pH=6.8
 - Buffer de corrida Tris-Glicina: Tris-base 25mM, glicina 250mM, SDS 0.1% pH=8.3.
 - Buffer de carga de muestras 1X: Tris-HCl 50mM, ditiotreititol 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%.
 - Isopropanol puro
 - Azul de Coomassie R250 0.25% (p/v) disuelto en metanol:agua (1:1 v/v) 90%, ácido acético glacial 10%.
 - Solución desteñidora (metanol 45%, agua 45%, ácido acético glacial 10% (v/v)).
- Marcador de peso molecular (Bio-Rad, No. de cat. 161-0317).

Equipo:

- Equipo completo para electroforesis vertical (Bio-Rad)
- Placas de vidrio de 0.75mm (Bio-Rad)
- Peines (Bio-Rad)
- Fuente de poder (Bio-Rad)

Procedimiento:

Preparar el gel concentrador y el gel separador. Añadir las cantidades adecuadas de reactivos según el volumen a preparar y el porcentaje deseado (para un listado completo de las cantidades a utilizar ver Current Protocols in Protein Science, capítulo de Electroforesis). Añadir primero el gel separador a las placas de vidrio y añadir isopropanol encima para emparejar el borde del gel. Permitir que polimerice el gel. Eliminar completamente el isopropanol. Añadir el gel concentrador e insertar los peines para formar los pozos. Dejar polimerizando el gel. Retirar los peines y colocar las placas con el gel en el aparato para electroforesis. Disolver las muestras de proteína y el

marcador de peso molecular en buffer de carga 5X. Sumergir 5 min para desnaturalizar las proteínas en baño de agua. Cargar las muestras a los pozos. Aplicar voltaje a 8V/cm. Cuando el frente del colorante alcance el gel separador incrementar el voltaje a 15V/cm y mantener aplicado hasta que el colorante alcance el borde inferior del gel. Para teñir el gel con azul de coomassie se retira éste de la unidad de electroforesis y se sumerge en la solución de colorante. Se mantiene en agitación suave por lo menos 1h a temperatura ambiente. Se retira el colorante y se enjuaga el gel con agua desionizada brevemente. Se sumerge el gel en solución desteñidora y se mantiene en agitación suave. Se hacen cambios hasta observar las bandas azules de proteína en un fondo claro.

b) Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa.

Materiales y reactivos:

Membrana de nitrocelulosa para transferencia (Biorad).

Buffer de transferencia (glicina 39mM, tris-base 48mM, SDS 0.037%, metanol 20%

Colorante de Ponceau S 1X

Equipo:

Aparato para electrotransferencia

Procedimiento:

Al terminar la electroforesis equilibrar brevemente el gel en buffer de transferencia frío. Cortar la membrana de nitrocelulosa equilibrada. Ponerla en contacto con el gel orientado de tal manera que se obtenga su réplica en la membrana. Colocar el gel y la membrana entre el papel filtro y después lo anterior entre fibras porosas. Las proteínas cargadas negativamente deben transferirse a la membrana la cual debe estar orientada hacia el polo positivo (el ánodo) y el gel hacia el cátodo. Se monta en el

aparato para electrotransferencia y se aplica corriente 250mA por 2h en frío. Al terminar la electrotransferencia se coloca la membrana en un recipiente y se le añade el colorante de Ponceau para observar la presencia de las proteínas transferidas. Se retira el colorante mediante varios lavados con agua desionizada.

c) Inmunodetección

Material:

Solución de bloqueo: leche descremada (Sveltis) al 10%

Buffer Tris-salino (Tris-HCl 100mM, NaCl 0.9% (p/v), pH=7.5).

Anticuerpo primario específico (diluido en solución de bloqueo)

Proteína A conjugada a peroxidasa (1:1000)

Sustrato de diaminobencidina (Zymed liquid DAB substrate kit No. de cat. 002014)

Procedimiento:

Bloquear la membrana con las proteínas transferidas sumergiéndola en la solución de bloqueo y agitando durante 1h a temperatura ambiente. Se retira la solución de bloqueo y se añade el anticuerpo primario dirigido contra la proteína de interés diluido en solución de bloqueo. Se agita permitiendo que se tenga contacto con toda la membrana 2h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Se elimina la solución del primer anticuerpo y se lava la membrana 3 veces, 10min cada vez, con buffer tris-salino y con agitación moderada. Se añade la dilución de proteína A conjugada a peroxidasa diluida 1:1000 en solución de bloqueo. Se agita permitiendo que se tenga contacto con toda la membrana 30min a temperatura ambiente. Se lava la membrana por lo menos 3 veces, 10min cada vez, con buffer tris-salino y agitación moderada. Se añade la

solución de sustrato (diaminobencidina) a la membrana y se retira cuando se observan las bandas cafés. Se lava con agua desionizada la membrana para retirar el exceso de sustrato.

13.5 Determinación de proteínas por el método del ácido bicinconíico (BCA).

Es un método colorimétrico que se utiliza para cuantificación de proteínas totales. Se necesita este dato para saber la cantidad de proteína obtenida y su rendimiento en un proceso de aislamiento y purificación.

Reactivos:

Kit MicroBCA (Pierce No. de cat. 23231).

Reactivo A: contiene carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y tartrato de sodio en NaOH 0.2N

Reactivo B: contiene BCA

Reactivo C: Sulfato de cobre pentahidratado al 4%

Estándar de albúmina (2mg/mL)

Equipo:

Espectrofotómetro UV-visible

Incubadora o baño de agua

Procedimiento:

Preparar reactivo de trabajo en razón 50 partes reactivo A, 48 partes reactivo B y 2 partes de reactivo C. Pipetear 1mL de cada estándar o problema en tubos. Añadir 1mL de reactivo de trabajo a cada tubo y mezclar. Incubar los tubos a 60°C durante 1h. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Medir la absorbancia a 562nm contra blanco de agua.

Cálculos:

Hacer la curva de calibración e interpolar los resultados de absorbancia de los problemas para calcular la concentración de proteína total.

13.6 Cuenta celular de células HepG2

Se realiza para sembrar una cantidad conocida de células en cajas de cultivo.

Reactivos:

PBS

Tripsina 0.25%

Medio α MEM.

Suero fetal bovino.

Solución de azul tripano 0.4% (p/v) en solución acuosa de NaCl 0.9% (p/v)

Equipo:

Centrífuga

Cámara de Neubauer

Contador manual

Microscopio óptico

Procedimiento:

Se lavan las células con PBS. Se añade tripsina suficiente a fin de cubrir la monocapa celular. Se observa al microscopio cuando las células comiencen a contraerse y a desprenderse. Se elimina la tripsina y se añade medio de cultivo sin suero. Las células se desprenden de la caja con ayuda de un gendarme y se resuspenden con pipeta. Se pasa la suspensión celular a un tubo para centrífuga y se centrifuga a 1200r. p. m. 10min a temperatura ambiente. Se retira el sobrenadante y se añade 1mL de medio de cultivo completo. Se resuspenden las células. Se toma una alícuota y se diluye con colorante azul tripano. Se colocan 10uL en la cuadrícula y se cuentan las células en los 4 cuadrantes. De ser necesario se diluyen las células con medio de cultivo antes de diluir con el colorante. Se calcula el promedio de células contadas.

Cálculos:

Cuenta celular (células/mL) = (promedio) x (factor de dilución) x 10^4