

Revisión (review) bibliográfica de los mecanismos moleculares involucrados en la infección por el Virus del Dengue y los posibles blancos antivirales.

Martínez Medina, Juan José; Torres, Carola Analía.

Introducción

En los últimos años, el conocimiento parcial del ciclo de multiplicación del virus del dengue (DENV) en la célula huésped y de las características estructurales y funcionales de las proteínas virales ha impulsado el estudio de diversos blancos potenciales para la acción antiviral [1].

Hay cuatro serotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), los cuales circulan en la naturaleza entre sus vectores, los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, y sus huéspedes vertebrados. En la actualidad, se estima que el virus es endémico en más de 100 países, produciendo alrededor de 50 millones de infecciones cada año [2].

La fiebre del dengue (DF) es una enfermedad febril aguda con escalofríos, dolor de cabeza, dolor retro-ocular, dolor corporal y artralgia acompañada en más del 90 % de los casos por un sarpullido maculopapular semejante al sarampión que dura de 2 a 7 días en aproximadamente el 60 % de los casos. Esto es seguido por dolor pronunciado en los músculos y articulaciones con una sensación tal como si los huesos estuvieran rompiéndose, lo que le dio el nombre de fiebre rompe huesos. Sin embargo, la coinfección con uno de los otros serotipos de DENV conduce a la fiebre hemorrágica del dengue (DHF), resultando en la aparición de sarpullido en la cara y las extremidades, vómitos severos y shock que podría conducir a la muerte del paciente [3].

Varias estrategias para vacunas contra DENV han sido desarrolladas en los años anteriores, desde vacunas a virus atenuados, a virus inactivados, a ADN e incluso vacunas recombinantes. Sin embargo, aún no hay vacunas anti-DENV disponibles. La terapia con la utilización de anticuerpos es una de las más recientes alternativas para prevención y tratamiento de las infecciones por DENV [4].

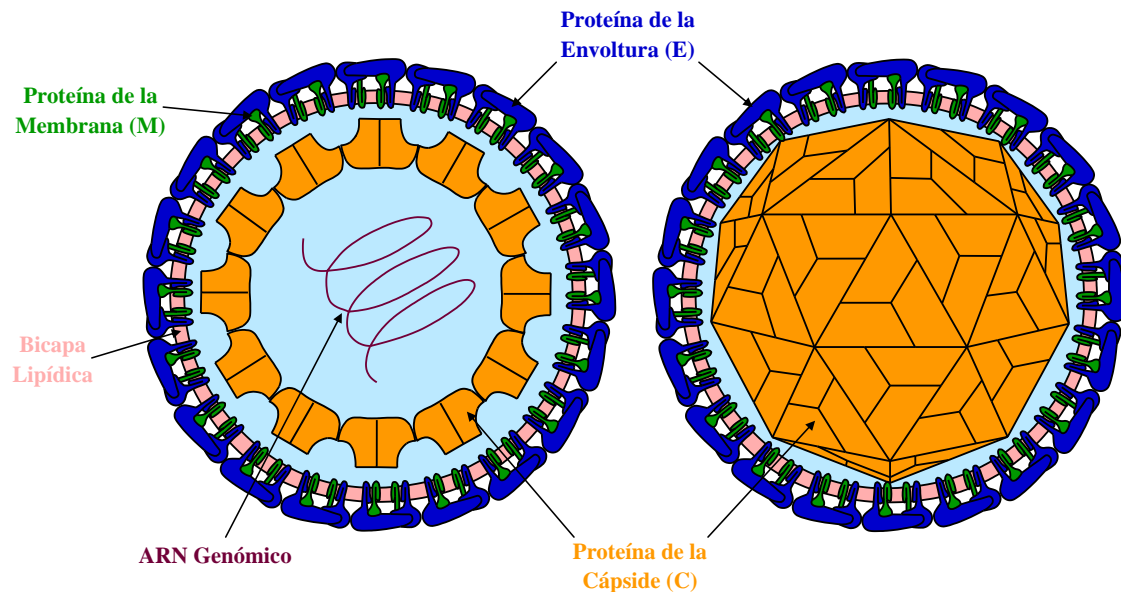
Las dificultades en desarrollar una vacuna efectiva se centran en el requisito indispensable de una vacuna tetravalente, ya que una inmunización parcial con una vacuna monovalente implicaría un riesgo aumentado en el individuo vacunado de sufrir una forma más severa de enfermedad ante una infección con alguno de los otros tres serotipos [1].

El objetivo de esta revisión bibliográfica es estudiar los mecanismos implicados en el ciclo de replicación del virus dentro de la célula, desde la adhesión de los viriones a la membrana de la célula huésped hasta la liberación de la progenie viral, para identificar los diferentes puntos dentro del ciclo de replicación que podrían constituir blancos potenciales para la quimioterapia antiviral. Además, se pretende incursionar en los avances en el diseño y el hallazgo de vacunas efectivas contra DENV.

Virus del Dengue. Generalidades

El Virus del Dengue (DENV) es transmitido por artrópodos, es miembro del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*; puede causar la fiebre del dengue (DF), una enfermedad febril relativamente benigna y autolimitada, o enfermedades severas y potencialmente fatales como la fiebre hemorrágica del dengue (DHF) y el síndrome de shock por dengue (DSS). El virión es una partícula envuelta que contiene una única hebra de RNA de polaridad positiva y tres proteínas estructurales: la proteína de la

cápside (C), una pequeña proteína de membrana (M) y la glicoproteína de la envoltura (E) [2].



El ciclo de transmisión primitivo del dengue involucraba especies de mosquitos del género *Aedes* y primates inferiores en los bosques lluviosos de Asia y África. Un número de especies de mosquitos *Aedes* podrían actuar como vectores en estas situaciones, incluyendo *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. polynesiensis* y algunos miembros del grupo *A. scutellaris*. Desde el punto de vista de la salud pública, el ciclo urbano endémico/epidémico es el más importante ciclo de transmisión. Los virus son mantenidos en el ciclo *A. aegypti*-humano-*A. aegypti*, con epidemias periódicas que ocurren con intervalos de entre 3 a 5 años. Los humanos son infectados con el virus del dengue por la picadura de un mosquito *Aedes* infectado, que prefiere poner sus huevos en agua del hogar. La hembra del *A. aegypti* puede alimentarse de varias personas durante una única comida de sangre y transmitir el virus del dengue a varias personas en un corto período de tiempo. Este comportamiento hace al *A. aegypti* un vector epidémico eficiente [3].

Ciclo de multiplicación viral

El ciclo que se detalla a continuación es el “probable” ciclo de multiplicación del DENV, ya que aún se carece de información sobre el mecanismo de varias etapas del proceso.

El paso inicial en la entrada del DENV ha sido dividido en adsorción y penetración. Esto se fundamenta en el hecho de que al tratar con glicina células de riñón de hámsteres bebés (BHK) se consigue inactivar los virus extracelulares incluso después de su adhesión a las células, pero previo a la penetración al interior de la misma. Además, estudios usando microscopía electrónica han indicado que la adsorción es un proceso independiente de la temperatura que ocurre tanto a 40°C como a 37 °C, mientras que la penetración viral continúa solo a 37°C. Cabe destacar que la infección viral se lleva a cabo dentro de las dos horas siguientes a la adsorción. [3].

1. Adsorción: el evento inicial en la infección por el virus involucra la adhesión a receptores específicos de la superficie celular [2]. Es decir, que la adsorción del virus a

la célula comienza con la unión de la glicoproteína E con un receptor de la membrana plasmática celular, seguida de la penetración de la partícula viral que conduce al desnudamiento y liberación del genoma viral en el citoplasma [1].

Receptores celulares

Se han realizado diversos trabajos para caracterizar los probables receptores celulares para DENV en la infección primaria, que incluyen tanto proteínas como glicosaminoglicanos (GAGs). Entre las proteínas se encuentran: proteínas susceptibles a tripsina, el receptor de alta afinidad para laminina, el receptor de manosa, proteínas de shock térmico, la proteína asociada al antígeno de diferenciación mieloide CD14 y la proteína regulada por glucosa. Asimismo, se ha informado que la unión del DENV a células dendríticas se produce a través de moléculas de adhesión intracelular (DC-SIGN) específicas de este tipo de células. Estas proteínas de membrana contienen un dominio extracelular de lectina tipo C que une carbohidratos con alto contenido de manosa, presentes en la superficie del virión de DENV. Además, se ha demostrado la participación del heparán sulfato (HS) en la unión de DENV-2 a diversas células de mamífero. El HS es un GAG presente abundantemente en los proteoglicanos de la superficie celular y en la matriz extracelular de varias células. La interacción del DENV con GAGs se caracteriza por el requerimiento de una forma altamente sulfatada de HS [5]. En este caso la unión del DENV a la célula sería del tipo indirecta ya que en lugar de involucrar una interacción directa entre el sitio de adhesión del virus y los componentes de unión de la superficie celular, lo hace a través de la interacción con moléculas intermediarias.

El DENV infecta los monocitos humanos a través de un mecanismo que implica tanto receptores proteicos como receptores Fc resistentes a la tripsina. La naturaleza proteínica de los componentes de la membrana celular requeridos para la unión del DENV-1 se confirmó cuando bajo el tratamiento con proteasas, a concentraciones que no destruían la viabilidad de las células, hubo una disminución de la unión del DENV-1 a las mismas. Estos resultados sugieren la participación de proteínas en la interacción entre el DENV-1 y la superficie celular. Esto fue confirmado posteriormente cuando el tratamiento con tripsina inhibió la unión del virus a los monocitos. La papaína y la proteinasa K tuvieron efecto similar sobre DENV-2 y DENV-3. El tratamiento con pepsina no tuvo efecto sobre la unión del virus a pH fisiológico. La neuraminidasa y la fosfolipasa C tampoco tuvieron efecto significativo [3].

Debido a que diversos virus se unen a GAG y DC-SIGN, estas moléculas actuarían como primera línea de receptores (receptores primarios) para DENV que unen grandes cantidades de virus a la superficie de las células huésped. La segunda línea de receptores (co-receptores) estaría constituida por receptores de naturaleza proteica de alta afinidad para DENV que serían los responsables del tropismo de DENV [5].

Los principales blancos para el DENV en humanos son las células del sistema monocítico macrófago, linfocitos B y células de la médula ósea. Los mastocitos son además blancos potenciales para la infección por DENV en vista a su expresión de receptores Fc [3].

2. Penetración del Virus Dengue a las células: después de la unión a la célula huésped los virus envueltos utilizan dos principales vías de penetración [2].

El mecanismo de penetración y desnudamiento de los virus envueltos queda aún por esclarecer, mientras algunos grupos de investigación sostienen que el ingreso se da por fusión directa entre la envoltura viral y la membrana plasmática otros sugieren que la endocitosis es la vía elegida.

El mecanismo de entrada del DENV a las células independiente de la presencia de anticuerpos involucra la unión de la glicoproteína E del DENV a la membrana celular. Está generalmente aceptado que para una infección productiva, la entrada viral de los flavivirus se produciría a través de endocitosis mediada por receptor [5].

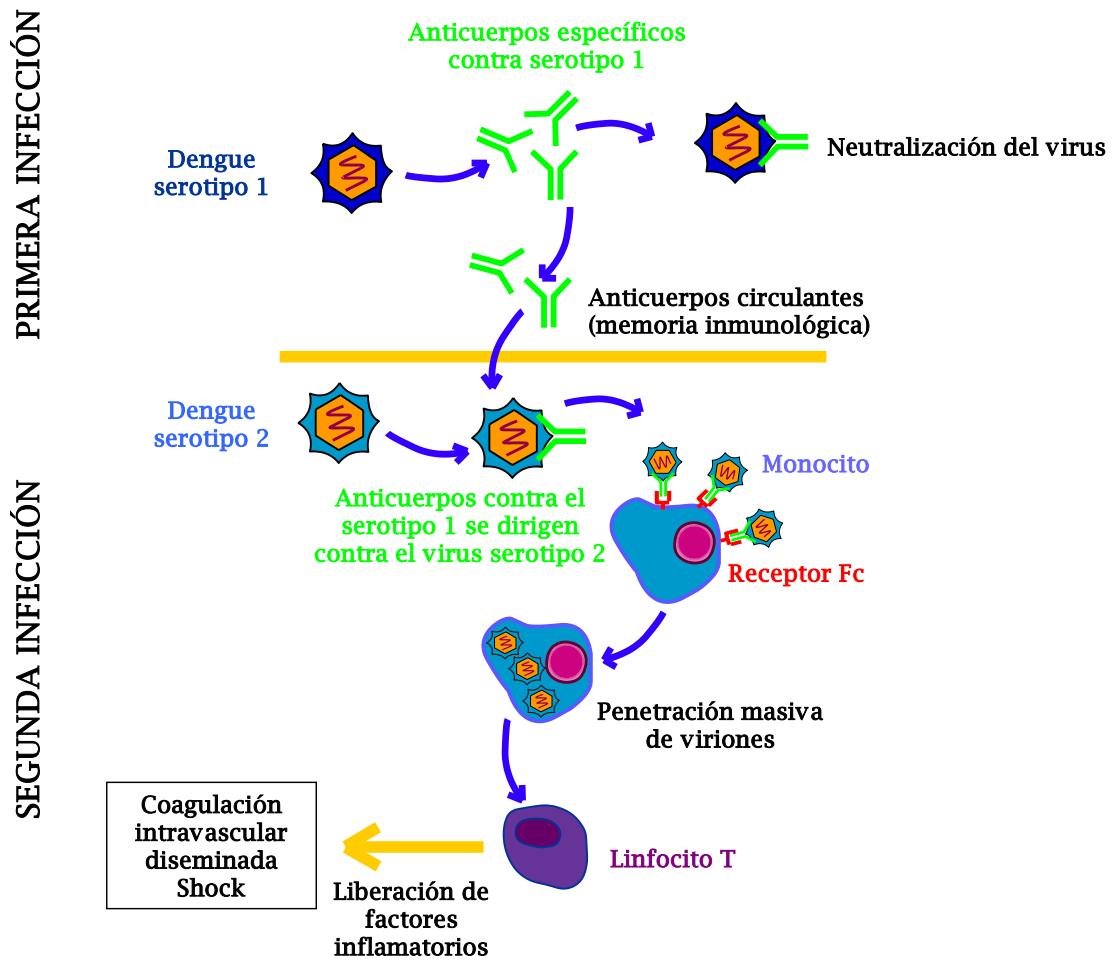
La adhesión del virus y la subsiguiente entrada es impulsada por los cambios conformacionales en la proteína E. La protonación de histidina en el ambiente de pH bajo del endosoma es el probable disparador del cambio conformacional que induce la disociación reversible de los dímeros E de la superficie del virión en monómeros, seguida por una transición irreversible a homotrímeros. Uno de los cambios estructurales iniciales en la proteína E inducidos por la exposición al bajo pH es un movimiento alrededor de una región tipo bisagra que separa los dominios I y II, lo cual expone el péptido de fusión interno [21]. Los cambios conformacionales que se deben a la unión virus-receptor y al pH ácido en el endosoma inducen la exposición del péptido de fusión, permitiendo la fusión de la membrana del endosoma con la envoltura del virus. La presencia de colesterol en la membrana blanco facilita la fusión pero no es absolutamente necesaria para la misma. La proteína E del DENV media la adhesión a la célula [3].

No obstante, un trabajo realizado en el año 1999 demuestra que ambos mecanismos de ingreso (fusión directa y endocitosis mediada por receptor) son posibles ya que comparó el proceso de entrada entre el DENV-2 y el DENV-2 mutante, en BHK. El virus mutante (mu6B2) fue resistente a la neutralización por el anticuerpo monoclonal (MAb 6B2). La presencia continua del anticuerpo monoclonal podría haber impuesto en cierto modo presión para que el mutante adopte un modo de entrada diferente. El modo de entrada del DENV-2 parece ser por fusión directa ya que los viriones fueron vistos tanto en la superficie como fusionados con la membrana plasmática de las células BHK. En el sitio de adhesión del virión en la membrana, la estructura de la bicapa apareció un poco borrosa o amorfa. Al mismo tiempo que la fusión progresó, la distancia entre las membranas viral y celular se redujo y la densidad electrónica de la nucleocápside fue vista en el citoplasma justo debajo de la membrana plasmática. Sin embargo, los viriones del DENV-2 mu6B2 fueron vistos en la superficie y dentro de vesículas endocíticas. Los viriones fueron vistos en invaginaciones de la membrana plasmática que se formaron en el sitio de adhesión del virión. Las invaginaciones penetran en el citoplasma formando vesículas endocíticas. El endosoma se cierra a la superficie celular y progresa más profundo en el citoplasma con la envoltura viral en proceso de fusión con la membrana limitante del mismo. Comparando el comportamiento de ambas cepas virales (la salvaje y la mutante) se puede concluir que el mecanismo de entrada del DENV-2 salvaje es el de fusión directa con la membrana celular, mientras que el virus mutante penetra por endocitosis mediada por receptores. Este modo de entrada diferente entre el DENV-2 salvaje y el DENV-2 mu6B2 fue debido solamente al efecto del anticuerpo sobre la proteína E del virus. La proteína E del virus mu6B2 ha sido alterada bajo la presión selectiva del MAb 6B2 para permitir su entrada a la célula huésped por endocitosis [6].

Entrada del virus en una infección secuencial heterotípica

En este caso el mecanismo de entrada del DENV a la célula huésped involucraría la unión de complejos virus-anticuerpo a células que contengan receptores Fc mediante la porción Fc de la inmunoglobulina G. En presencia de cantidades subneutralizantes de anticuerpos, los receptores Fc pueden mediar la adhesión y captación del DENV al interior de las células blanco. La infección secuencial heterotípica aumentaría el riesgo de desarrollar DHF o síndrome de shock por dengue (DSS) a través de un proceso

inmunológico conocido como respuesta aumentada mediada por anticuerpos (ADE), con formación de complejos inmunes entre el virus y los anticuerpos heterólogos no neutralizantes que permitirían un aumento de la infección de células monocíticas a través de la unión a receptores para el fragmento Fc del anticuerpo [5].



3. Replicación del material genético, síntesis de proteínas virales y liberación de los viriones: se libera el material genético en el citoplasma y es inmediatamente traducido a una única poliproteína, que es procesada por proteasas virales y celulares para producir simultáneamente todas las proteínas virales: tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete no estructurales (NS), que cumplen diversas funciones. La ARN polimerasa viral dependiente de ARN (NS5), asociada a otras proteínas NS, replica el ARN genómico produciendo una molécula complementaria de ARN de polaridad negativa, la que a su vez actúa como templado para la síntesis de nuevas cadenas de ARN de polaridad positiva. Las réplicas del genoma viral son encapsidadas por la proteína C, y luego las nucleocápsides adquieren su envoltura por brotación a partir de la membrana del retículo endoplásmico hacia el espacio luminal. A partir de allí, las partículas virales son transportadas por el sistema exocítico secretorio hacia la superficie en tanto que las glicoproteínas virales adquieren su forma madura por procesamiento de los residuos hidrocarbonados en el sistema de Golgi y, finalmente, los viriones son liberados al medio extracelular por fusión de la vesícula de transporte con la membrana plasmática [1].

Proteínas del DENV

1. Proteína de la cápside (C)

La proteína C es una de las tres proteínas estructurales y es el componente de la nucleocápside. Tiene además un papel predominante en la replicación del DENV. La nucleocápside está rodeada por una envoltura lipídica que pertenece al huésped en la cual la proteína de membrana M y la glicoproteína de envoltura E están embebidas. Residuos cargados están agrupados en los extremos N- y C-terminal, separados por una región hidrofóbica interna altamente conservada, la cual media la asociación de la membrana. La cápside naciente además contiene un ancla hidrofóbica C-terminal que sirve como un péptido señal para la translocación del precursor de membrana en el retículo endoplásmico.

La encapsidación del genoma juega un papel crítico en el ensamblaje del virus, ya que se ha demostrado que partículas subvirales liberadas por las células infectadas, carentes de la cápside y el ARN, no son infecciosas. La alta densidad de carga positiva en la proteína C y su posible rol en el proceso de encapsidación del genoma viral condujeron a nuevos experimentos en los que se sugirió que la neutralización de las cargas positivas en la cápside dimerica podría ser el evento principal que impulsa el proceso de ensamblaje [7].

2. Proteína de la envoltura (E)

La proteína E del DENV, se encuentra embebida en la bicapa lipídica de la envoltura viral y puede mediar tanto la adsorción como la penetración del virus a la célula. Algunas de las funciones de la proteína E, especialmente la de la fusión con la membrana, son reguladas por la interacción con una segunda proteína viral, la proteína pre-membrana (prM). La asociación de la proteína prM con la E estabiliza ciertos epítopes sensibles a la temperatura presentes en la proteína E evitando por ello los cambios conformacionales, los cuales ocurren a pH ácido y son esenciales para la activación de la actividad fusogénica de la proteína E. El complejo E-prM resultante demostró ser inmunogénico y protectorio, cuando se usa en formulaciones de vacunas. La unión del virus ocurre como resultado de la adhesión al receptor por la interacción entre una molécula del ectodominio viral y un co-receptor expresado en la superficie de la célula blanco. Hay ciertos dominios en la proteína E, los cuales son importantes para la unión a los HS de la familia de los GAGs. Estos arreglos de GAGs de unión poseen múltiples regiones bien definidas que son ricas en aminoácidos básicos y están separadas por secuencias, las cuales se pliegan de tal modo que las regiones básicas miran unas hacia otras. La heparina tiene una potente actividad inhibitoria, mientras que HS, otros GAGs y el dextrano sulfatado no han tenido tal efecto. Es sabido que la unión inicial del DENV a los receptores celulares es dependiente de la estructura dimerica de la proteína E, mientras la fusión requiere un cambio conformacional, mediado por el bajo pH en las inmediaciones de la membrana celular, resultando en la formación de un trímero [3].

La glicoproteína de envoltura del DENV pasa por transiciones conformacionales bajo condiciones ácidas de una forma dimerica nativa a una forma trimérica fusogénica. Cada monómero contiene tres dominios estructurales: el dominio I contiene los extremos N-terminales y es el dominio central que organiza la estructura, el dominio II es una estructura elongada que provee casi todos los contactos de dimerización y el dominio III que tiene un plegamiento similar a una inmunoglobulina y constituye el extremo C-terminal. Se ha propuesto que el dominio III contiene los sitios de unión al receptor, mientras que una estructura tipo bucle en el extremo del dominio II ha sido descrita como el péptido de fusión. En la forma dimerica nativa de la glicoproteína E,

el péptido de fusión está oculto en la superficie interna y se expone como consecuencia de un cambio conformacional irreversible iniciado por la exposición al bajo pH del endosoma [2].

Usando anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína E, se encontró que mientras tres MABs diferentes podían neutralizar el DENV-2 mediante la inhibición de la adhesión viral tanto como de la penetración, solo un MAB interfirió específicamente con la adhesión. Por lo tanto, se concluyó que los dominios funcionales de la proteína E involucrados en la adhesión y penetración podrían ser distintos. La heparina inhibió la infección viral por bloqueo tanto de la adhesión como de la penetración, sugiriendo que los HS de la superficie celular juegan un papel importante en estos pasos [3].

3. Proteína de la membrana (M)

La proteína M es producida por el clivaje de la glicoproteína prM durante la fase tardía de la maduración viral. El extremo C-terminal de la proteína contiene una región transmembrana altamente hidrofóbica que ancla la proteína en la bicapa lipídica. Un péptido sintetizado químicamente que consta de los extremos C-terminal de la proteína M del DENV-1 produjo actividad de canales iónicos en bicapas lipídicas artificiales. Los canales tienen una conductancia variable y son más permeables a los iones sodio y potasio que a los iones cloruro y más permeable a los iones cloruro que a los iones calcio. La hexametilén amilorida y la amantadina bloquean estos canales y podrían resultar agentes antivirales útiles. Estos canales iónicos virales han sido llamados “viroporinas”; los cuales pueden seleccionar entre cationes, entre aniones y cationes, y pueden tener una muy baja conductancia [8].

4. Proteínas no estructurales (NS)

El genoma del DENV codifica tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Las dos proteínas, NS3 y NS5, han sido identificadas como proteasa/helicasa y polimerasa, respectivamente. Aunque el papel de las otras proteínas NS queda por determinarse, ellas están localizadas junto con las proteínas NS3 y NS5 y probablemente participen en la replicación viral. La proteína NS1 es una glicoproteína altamente conservada de 46 KDa y está presente en el interior celular, en la superficie de la célula, y como formas secretadas. NS1 tiene doce residuos de cisteína invariantes, que forman seis puentes disulfuro intermoleculares, y dos sitios de N-glicosilación [9].

Como ya se ha mencionado, la glicoproteína del DENV-2 contiene dos potenciales sitios de unión N de glicosilación en los residuos de Asparagina de las posiciones 130 y 207 (Asn-130 y Asn-207). La proteína NS1 producida en las células infectadas está glicosilada en ambos de estos sitios. Se diseñaron virus mutantes carentes de Asn-130, Asn-207 o ambos de estos sitios de la NS1 a fin de investigar los efectos de la deglicosilación. La ablación de ambos sitios de glicosilación de la NS1 resulta en virus inestables que adquieren numerosas mutaciones adicionales. Los virus alterados en el sitio Asn-130 exhibieron características de crecimiento similares al virus salvaje. Los virus mutantes Asn-130 se localizaron en todo el citoplasma, sin embargo, los virus mutados en el sitio Asn-207 aparecieron localizados en la región perinuclear. Estos resultados indican que la glicosilación de la proteína NS1 del DENV-2 podría influir tanto en el procesamiento/transporte de la NS1 como en la patogenicidad del virus. La proteína NS1 extracelular puede provocar una respuesta inmune humoral potente, y la inmunización con NS1, inmunización pasiva con anticuerpos anti-NS1 o inmunización con ADN que codifique la NS1 pueden resultar protectoras. Se encontraron niveles altos de NS1 en el suero de pacientes con una segunda infección con DENV confirmada lo

cual sugiere que esta proteína podría contribuir a la formación de complejos inmunes que se postuló, estuvieren involucrados en la patogénesis de las enfermedades severas por DENV. Se ha demostrado una conexión entre la proteína NS1 y la acumulación y replicación del ARN viral. El procesamiento de la proteína NS1 comienza con la translocación de la porción PrM-E-NS1 de la poliproteína viral en el espacio luminal del retículo endoplásmico donde una peptidasa divide la unión E-NS1. Se requiere la dimerización para el transporte de la NS1 a través del aparato de Golgi, mientras los glicanos unidos al sitio Asn-130 del dímero son modificados a azúcares complejos, esto es seguido por el transporte hacia la membrana plasmática, mientras una porción de la NS1 es liberada desde la célula. La modificación del carbohidrato unido al Asn-130 a un azúcar complejo es requerida para una liberación eficiente de NS1 desde las células infectadas. También se ha observado en la cepa C del virus del Dengue-2 Nueva Guinea, derivado de un clon infeccioso que ha sufrido una mutación por ablación del segundo sitio de glicosilación de la NS1, una reducción del crecimiento en el cultivo celular y una disminución de la neurovirulencia en el ratón. Se construyeron dos series de mutantes por alteración del primer o tercer aminoácido (aa) en cada arreglo de glicosilación. Los mutantes alterados en el primer aa del arreglo del sitio de glicosilación Asn-130, Asn-207 o en ambos sitios, fueron designados como N1, N2 o N12, respectivamente. Los mutantes alterados en el tercer aa fueron designados como N1C, N2C y N12C. La neurovirulencia de los virus mutantes en ratas recién nacidas se redujo significativamente en comparación con el virus salvaje. Mientras solo el 32,1 % de los ratones inoculados con el virus salvaje sobrevivieron 28 días luego de la inoculación, el 92,5 % y el 87,5 % de los ratones inoculados con los mutantes N1 y N1C sobrevivieron. Se identificó la proteína NS1 en la membrana plasmática, membrana perinuclear y en regiones del citoplasma, asociada a membranas y localizada junto con el ARN de doble cadena (ARNds). Los resultados sugieren que la ablación del sitio de glicosilación Asn-207 puede disminuir el transporte de la NS1 fuera de la región perinuclear reduciendo su secreción desde la célula y disminuyendo la neurovirulencia [10].

Blancos potenciales para el diseño de antivirales

Teniendo en cuenta tanto la estructura del DENV como el ciclo de multiplicación viral, se dilucidaron los diferentes blancos relevantes en el estudio o desarrollo de sustancias con actividad antiviral. Los mismos pueden agruparse en:

1. Inhibidores de la entrada del DENV. Estos incluyen: lectinas (proteínas, como la concanavalina A, que bloquean residuos de azúcares específicos en la glicoproteína E), inhibidores de la fusión viral (clorhidrato de amantadina y rimantadina con actividad antiviral muy débil, clorpromazina que inhibió la endocitosis dependiente de clatrina y derivados de tetraciclina dirigidos a la región de la proteína E involucrada en cambios conformacionales) y sustancias polianiónicas (heparina, suramina, galactomananos sulfatados, carragenanos; y otros polisacáridos sulfatados extraídos de fuentes naturales como algas marinas, plantas superiores, invertebrados marinos y cianobacterias).

Los carragenanos extraídos de algas resultaron ser inhibidores efectivos de DENV-2 en células de mamífero pero fueron inactivos en células de mosquito, lo cual se correlaciona con los trabajos que involucran proteínas como receptores en las células de mosquito y describen una ausencia de participación de los residuos de HS en la adsorción viral a estas células. El carragenano- λ mimetiza al HS inhibiendo en forma potente al DENV-2 y DENV-3, pero no así frente a DENV-4 y DENV-1. La interferencia en la adsorción viral consistiría en el bloqueo de la unión del virus a los residuos de HS presentes en los proteoglicanos celulares. El efecto post-adsorción de

DENV-2, que interfiere con el desnudamiento viral, probablemente sea debido a una asociación del carragenano- λ con la glicoproteína E del virus adsorbido que impediría el cambio conformacional necesario para la fusión. Sin embargo, los polisulfatos presentan una serie de desventajas que afectan su potencial utilidad en humanos, entre ellas la baja biodisponibilidad oral, la actividad anticoagulante de varios polisacáridos, la alta degradación plasmática y la incapacidad de penetrar las células y llegar a los tejidos blanco [5].

Existen antecedentes sobre la actividad antiviral *in vitro* de metabolitos aislados de invertebrados marinos usando el DENV-1. De estos aislamientos solo tres compuestos (gymnochrome B, D y el isogymnochrome D) de las siete moléculas probadas mostraron efecto inhibitorio. De los cuales solo el gymnochrome D y el isogymnochrome D aislados del fósil viviente crinoideo *Gymnocrimus richeri* demostraron ser agentes antivirales de alta potencia sobre DENV. Estos compuestos inhiben la lisis celular inducida por el DENV, y además ellos no resultaron citotóxicos para las células del huésped. El interés sobre el efecto inhibitorio de la replicación del DENV a muy baja concentración, más baja para el gymnochrome D y el isogymnochrome D, se encuentra aumentado por su carencia de citotoxicidad. La diferencia entre los compuestos con mayor potencia radica en que poseen dos grupos sulfatados en comparación con el gymnochrome B que no los posee y cuya actividad antiviral es inferior [11].

En investigaciones más recientes se ha demostrado que la luz incrementa la potencia virucida de la hipericina, tetrabromohipericina y el gymnochrome B por un factor de 3,5, de 4,9 y de 5,2 respectivamente. El efecto antiviral fue mucho más alto en presencia de luz para gymnochrome B. No se observó el efecto virucida del gymnochrome en experimentos llevados a cabo previamente, en el laboratorio de éste grupo de investigadores, porque el efecto de la luz no fue investigado. Los estudios sugieren que las cadenas laterales son las responsables de un efecto adicional, o un efecto de fotoactivación aumentado del núcleo de hipericina [12].

2. Inhibidores de la síntesis de ARN, entre los cuales uno de los más estudiados es la ribavirina pero cuyo efecto inhibitorio contra el DENV es muy débil y poco selectivo, sin embargo se han ensayado sustancias más efectivas que incluyen análogos de nucleósidos, sustancias de estructura heterocíclica y el ácido micofenólico.

3. Inhibidores de la proteasa, ya que la proteína NS3 parece tener requerimientos únicos e inusuales por residuos dibásicos se busca diseñar inhibidores selectivos que no inactiven las proteasas celulares.

4. Inhibidores de la α -glucosidasa para impedir la maduración, aquí se pueden mencionar compuestos como castanospermina y deoxinojirimicina que inhiben la α -glucosidasa impidiendo la remoción de las glucosas terminales en los N-glicanos de E y prM, por lo cual las proteínas no adquieren un plegamiento normal y se bloquea la morfogénesis.

5. Inhibición a nivel de la expresión génica, utilizando pequeños nucleótidos antisentido, es decir una cadena simple de ADN complementaria a una secuencia determinada del ARN viral, con la consiguiente formación de un duplex ARN-ADN que impide la expresión génica; las principales dificultades de esta técnica son la entrada de los nucleótidos a la célula y su estabilidad frente a la acción degradativa de las nucleasas [1].

Citoesqueleto de la célula huésped

El citoesqueleto de la célula huésped ha sido implicado en la circulación de los endosomas que contienen los complejos ligando-receptor, y se ha propuesto una

participación secuencial de los microfilamentos y microtúbulos (MTs). La disrupción de los MTs por el tratamiento con colchicina no impidió la infección de las células de mosquito por el DENV-2, sugiriendo que el DENV-2 no requiere transporte de los endosomas para una infección exitosa [2].

Se demostró mediante inmunofluorescencia que la infección por DENV-2 induce la reorganización de los MTs y la vimetina. Se observó la localización de los antígenos del DENV-2 junto con los MTs o la vimetina. Los agentes que desorganizan los MTs pudieron aumentar la liberación del DENV-2 pero no afectaron otros pasos de la replicación viral. En contraposición, la disrupción de la vimetina inhibió la infección por DENV-2. Los MTs parecen tener menos efectos en la entrada del DENV-2 y la disrupción de los mismos no podría prevenir el desplazamiento y replicación del DENV-2 en las células infectadas. La infección por DENV-2 podría inducir la reorganización de los MTs, y los antígenos del DENV-2 se localizan junto con los MTs intactos, pero el tratamiento con agentes que desorganizan los MTs raramente afectó la producción o replicación del DENV. Estos resultados sostienen la posibilidad de que el DENV-2 podría interactuar con los MTs intactos, y las partículas virales podrían usar un mecanismo dependiente de los MTs para infectar la célula huésped bajo condiciones normales. Sin embargo, DENV-2 además podría utilizar un mecanismo independiente de los MTs para lograr una infección exitosa en ausencia de MTs intactos. En otras palabras, los MTs son útiles pero no necesarios para la infección por DENV-2.

Por otra parte, además de la actina y los MTs, el citoesqueleto está compuesto por filamentos intermedios (IFs), los cuales están constituidos por vimetina, entre otras proteínas. La acrilamida puede inducir selectivamente el colapso primario y la disrupción de las estructuras de vimetina. Los antígenos del DENV-2 se encuentran localizados junto con la vimetina indicando que la infección de DENV-2 induce la reorganización de dicha proteína. La localización de los antígenos junto con la vimetina no se ve luego del tratamiento con acrilamida, indicando que la reorganización de la vimetina podría estar involucrada en el proceso infectivo. Los títulos virales se vieron significativamente reducidos en el grupo de células tratadas con acrilamida y la localización de los antígenos junto con la vimetina fue raramente observada en este grupo de células. Estos resultados sugieren que la vimetina está involucrada en la infección del DENV.

En conclusión, la vimetina es requerida para la infección por DENV mientras que los MTs no son necesarios para este proceso [13].

Predisposición genética. Raza.

Los genes humanos que regulan la severidad de la enfermedad del dengue podrían estar distribuidos inequitativamente entre negros y blancos.

Los brotes de DHF/DSS en Cuba han proporcionado evidencias de un riesgo reducido de las personas de raza negra comparado con aquellos de raza blanca. Las poblaciones cubana, negra caribeña y africana comparten un *pool* de genes común que podría explicar, al menos en parte, la baja incidencia de DHF en los países de Cuba, El Caribe y África. En la epidemia cubana del 1981, una mayor proporción de blancos desarrollaron DHF/DSS comparados con negros. De 124 chicos con diagnóstico clínico de DHF/DSS confirmados serológicamente, el 86 % eran blancos, el 7 % mulatos (término usado para denominar a los mestizos entre razas negra y blanca) y 7% eran negros. De 72 casos fatales en niños, el 86% eran blancos, el 11% mulatos y el 3 % negros. A fin de evitar prejuicios y para un mejor entendimiento del fenómeno, los individuos clínica y serológicamente confirmados como enfermos con DF o DHF/DSS durante la segunda epidemia de dengue en 1997 en su primer grado relativo fueron

clasificados racialmente utilizando parámetros antropométricos como: características faciales, características craneales, estructura corporal en términos de estructura esquelética y distribución del tejido muscular y adiposo; se observó además la pigmentación de la piel, ojos y cabello. Los blancos mostraron una respuesta celular inmune específica contra el DENV más vigorosa, con una alta reactividad cruzada a los antígenos heterólogos del dengue cuando se los comparó con los negros. El mayor número de linfocitos CD4 y su reactividad cruzada, y el incremento de citoquinas observado en blancos podría ser parcialmente responsable de la mayor incidencia de DHF en blancos en las epidemias cubanas de DHF. Considerando esto, los antropólogos han propuesto la existencia de un “fenotipo cubano” distinguible de otros grupos poblacionales americanos. Se puede inferir, entonces, que virus similares no operan de la misma manera sobre poblaciones genéticamente diferentes [14].

Además se han estudiado los genes polimorfos del transportador asociado al procesamiento del antígeno TAP1 y TAP2 (del inglés: Transporter Associated with Antigen Processing) que codifican subunidades del transportador que entregan a las moléculas de antígenos clase I de los leucocitos humanos. Ya que se ha visto que el polimorfismo de los genes del TAP afecta el transporte del péptido, se ha sugerido que dichos genes son potencialmente reguladores de la respuesta inmune. Se ha reportado que el polimorfismo del gen del TAP1 está asociado con la infección grave de dengue. La frecuencia del aminoácido isoleucina en la posición 379 del TAP2 era mayor en los DHF en comparación con los controles. Los casos de DHF fueron más probablemente heterocigotos en posición 379 del TAP2. Se encontró que una alta proporción de los DHF tenían en su genotipo la posición 665 del TAP2 treonina/alanina (THR/ALA) comparados con los casos de DF. Esto sugiere que los heterocigotos en el locus TAP2 379 confieren susceptibilidad al DHF, y que el genotipo TAP2 665 THR/ALA es un factor de riesgo para el desarrollo de DHF. Las proteínas TAP translocan los péptidos desde el citosol hacia el retículo endoplásmico donde los mismos se asocian a moléculas de clase I. El examen de las mutaciones de los genes del TAP2 de la rata ha mostrado que hasta una única sustitución de un aminoácido puede resultar en cambios dramáticos en la selectividad por el sustrato. Durante la infección por flavivirus, se ha reportado un incremento transitorio en el transporte del péptido a través del TAP, y además se ha reconocido su significado biológico en la evasión viral de las células asesinas naturales (NK).

Se encontró que influyen en la emergencia de DHF/DSS las variaciones en el receptor de la vitamina D, el receptor Fc, e incluso el alelo G de la variante 336 del DC-SIGN se asoció con una fuerte protección contra el DF. En estudios recientes se ha concluido que la raza negra tiene riesgo reducido para DHF/DSS comparada con la raza blanca (caucásicos).

Los casos fueron clasificados de acuerdo al sistema de clasificación de la OMS. Las infecciones por dengue se dividen en DF (enfermedad febril aguda, leve y autolimitada), DHF (fiebre con manifestaciones hemorrágicas, trombocitopenia y hemoconcentración u otros signos de filtración plasmática; equivalente a DHF grado I y II según OMS) y DSS (definida usando el mismo criterio que para DHF pero además con hipotensión, pulso reducido, en presencia de signos clínicos de shock como ser escasa irrigación capilar y piel fría y pegajosa).

La evidencia apunta a una asociación con el polimorfismo en el gen del TAP2 tal que los heterocigotos en la posición 379 desarrollan DHF más a menudo que los homocigotos [15].

Estado actual

La inactivación al usar la cápside viral como blanco CTVI (del inglés: capsid-targeted viral inactivation) ha surgido como una estrategia antiviral conceptualmente poderosa que utiliza la estructura de las proteínas virales como blanco para introducir una enzima destructiva específica en la progenie de viriones. La terapia génica representa un concepto prometedor para las enfermedades infecciosas. Tales estrategias de inmunización intracelular involucran la expresión de un ARN o proteína extraña dentro de potenciales células blanco o en individuos. La expresión de tales macromoléculas podría interferir con uno o más pasos en el ciclo de vida del virus. En un acercamiento a la CTVI, la proteína C es designada como un blanco para una enzima nociva, como una nucleasa, introducida específicamente en la progenie *via* ingeniería genética. Durante la infección viral, la enzima nucleasa fusionada a la proteína C es expresada intracelularmente. Se inocularon en células BHK los plásmidos que codifican la proteína C del DENV-2 (D2C) fusionada a una nucleasa del *Staphylococcus* (SN) o a una versión inactiva de la nucleasa (SN*), denominándolos pc/D2C-SN y pc/D2C-SN* respectivamente. Cuando las células BHK inoculadas fueron infectadas con DENV-2, la proteína fusionada D2C-SN expresada intracelularmente redujo los títulos de la nueva infección. Ninguna de las células modificadas por ingeniería genética mostró alteraciones morfológicas discernibles comparadas con las BHK normales, lo cual sugiere que D2C-SN no posee actividad citotóxica sobre las células de mamífero. Además, como la actividad de la SN es dependiente del Ca^{2+} , al incubar las preparaciones de viriones con EDTA no se detectó actividad de la nucleasa. Los resultados indican que la NS fue adecuadamente incorporada en la progenie y enzimáticamente activa. La degradación del ARN genómico de la progenie viral por la incorporación de la SN al virión es responsable del efecto antiviral observado. Se demostró que la CTVI puede destruir el DENV-2 desde el interior de la célula en un modelo profiláctico *in vitro*. Esta información es similar a un reporte en el cual se usó un modelo terapéutico. En el modelo terapéutico, las células fueron inoculadas transitoriamente, y un número de células en la población no expresó la proteína fusionada D2C-NS. En estas células el DV puede ensamblarse y ser liberado normalmente, y puede escapar a la inactivación por CTVI, causando una eficacia antiviral relativamente baja. En contraste, en el modelo profiláctico, las células fueron seleccionadas en presencia de blasticidina y alrededor de un 99% de las células expresaron en forma estable la proteína fusionada D2C-SN, lo cual explica el abrupto incremento de la eficacia antiviral. No obstante, no toda la progenie de viriones son inactivados, incluso en el modelo profiláctico, lo cual sugiere la presencia de una pequeña subpoblación de viriones libres de la SN. El mayor desafío sería identificar un método para introducir esta proteína fusionada en individuos infectados [16].

En otro estudio, se examinó el rol de los sitios de glicosilación de la NS1 en la replicación del DENV-1. No se detectó producción de DENV-1 cuando una porción completa del ARN del DENV-1, el cual tiene una mutación Asparagina/Alanina en la posición 130 (Asn130Ala) de dicho sitio de glicosilación de la proteína NS1, fue inoculada en células de mamífero y de mosquito. Los experimentos mostraron que la propagación del DENV salvaje fue prevenida por la expresión de la mutación Asn130Ala en los virus mutantes, sugiriendo que Asn-130 de la NS1 del DENV-1 es importante para la replicación viral. Se diseñaron tres mutantes del DENV-1 cambiando cada uno de los residuos de Asparagina de la posición 130, 207 o ambos al mismo tiempo, por el aminoácido Alanina, denominándolos rDENV-1^{130m}, rDENV-1^{207m} y rDENV-1^{130m207m}, respectivamente. Se sintetizaron *in vitro* ARN virales recombinantes y entonces se inocularon células Vero con los mismos. La producción de partículas

virales fue monitoreada después de un pasaje del virus en las células Vero. Las partículas virales infecciosas fueron recuperadas con títulos similares al ARN del DENV-1 salvaje cuando el rDENV-1^{207m} fue usado para la inoculación, pero no fueron recuperadas cuando el rDENV-1^{130m} o rDENV-1^{130m207m} fueron utilizados. Los resultados indican que la expresión de la proteína del DENV-1 mutante Asn130Ala, bloquea la propagación del DENV-1 salvaje en las células inoculadas. Sin embargo, la mutación Asn207Ala en la NS1 no afecta el crecimiento del virus en las células Vero. En contraposición, se demostró que el DENV-2 recombinante con la mutación Asn130Gln exhiben características de crecimiento similar al DENV-2 salvaje. Lo cual indica que el primer sitio de glicosilación de la NS1 es requerido para una replicación viral exitosa, pero no es esencial para el ciclo de vida del virus [9].

Se analizaron las estructuras pre-fusión y post-fusión de la proteína E del DENV para identificar nuevos sitios potenciales que podrían unir pequeñas moléculas, lo cual podría interferir con las transiciones conformacionales impidiendo la entrada del virus. La estructura cristalina del ectodominio del DENV-2 revela un bolsillo hidrofóbico en la región bisagra entre los dominios I y II, el cual fue propuesto como un sitio blanco adecuado para que una molécula pequeña inhiba el proceso de fusión. Las cavidades fueron seleccionadas, si se cumplía que: la cavidad estaba presente en el dímero pero no en el trímero (por lo tanto la unión de compuestos a las mismas podrían inhibir la formación del trímero), o si la cavidad estaba presente en la interfase del dímero (los compuestos podrían estabilizar el dímero o prevenir su transición a la forma trimérica post-fusional). Las cavidades adecuadas fueron posteriormente controladas basándose en los siguientes criterios: funcionalidad (función en la transición conformacional), presencia de residuos hidrofóbicos, presencia de residuos cargados, accesibilidad del solvente y ausencia de carbohidratos [17].

Vacunas

En los últimos diez años fueron varios los intentos para hallar una vacuna efectiva, entre los cuales se examinó la capacidad protectora *in vivo* de los anticuerpos monoclonales (MAbs) generados contra las proteínas E y prM del DENV-2. Dos MAbs anti-E y dos MAbs anti-prM generaron protección cruzada contra los cuatro serotipos de DENV. Se usaron una serie de péptidos sintéticos que cubren la secuencia de aminoácidos que abarca el dominio III de la proteína E y la proteína prM completa para localizar sus epítopes. Se diseñó una secuencia peptídica antigénica híbrida entre las proteínas E y prM, con algunas secuencias peptídicas naturales de las mismas. Los anticuerpos monoclonales descritos se examinaron por su habilidad para proveer protección pasiva contra cada serotipo del DENV, por su reactividad con un determinado péptido inmunodominante y por su reactividad frente a la serie de péptidos sintéticos que cubren tanto la secuencia de aminoácidos del dominio III de la proteína E como la prM. De este modo, dichos péptidos pueden ser probados luego por su habilidad para generar anticuerpos de protección cruzada contra estos virus cuando los epítopes sean presentados por la célula T-helper adecuada. Basados en la existencia de epítopes comunes en las proteínas E y prM, se hizo el intento de diseñar una secuencia peptídica híbrida y antigénica contra la que el organismo pudiera reaccionar más vigorosamente que con la secuencia del epítope natural. Puesto que estos MAbs anti-prM proveen protección contra cada serotipo del DENV, esta proteína podría tener potencial de vacuna [18].

En trabajos más recientes, se demostró que es posible introducir mutaciones atenuantes de forma efectiva, usando técnicas de genética reversa, al genoma del DENV salvaje o del DENV incompletamente atenuado para generar candidatos de vacunas que exhiban

el balance deseado entre atenuación e inmunogenicidad. Se identificaron ocho mutaciones sensibles a la temperatura distribuidas en los genes de cuatro proteínas NS. No obstante, solo un limitado número de mutaciones en el genoma del DENV las cuales confieren un fenotipo atenuado (att) han sido suficientemente caracterizadas a nivel de la genética molecular como para permitir su inclusión en clones ADNc infecciosos usados para obtener candidatos de vacunas. Se describieron DENV-4 mutantes atenuados sensibles a la temperatura generados por carga mutagénica de alanina del gen NS5, y además, otro grupo de mutantes generados por la mutagénesis del 5-fluoruracilo (5-FU). Las clases de mutaciones fueron identificadas como: mutaciones que no determinaron una sensibilidad a la temperatura (ts) ni tampoco un fenotipo att, mutaciones que determinaron una ts pero no un fenotipo att y mutaciones que determinaron tanto una ts como un fenotipo att. Este tercer grupo de mutaciones posee atributos que los hacen atractivos para su inclusión en vacunas anti-DENV basadas en ADNc, como ser: están distribuidas por todo el genoma en cuatro genes permitiendo su uso en combinación con otras mutaciones atenuantes en el mismo gen o en un gen distinto, las mutaciones se localizan fuera de la región de genes estructurales pudiendo ser insertadas en candidatos de vacunas sin modificar la proteína E, y además son útiles para conferir un alto nivel de atenuación en el DENV salvaje [19].

En otra investigación se ha reportado la viabilidad de proteínas fusionadas recombinantes del dominio III de la proteína E [las variantes son fusión (PD5) e inserción (PD3)] para inducir anticuerpos funcionales y una respuesta inmune protectora en primates no humanos. Los monos inmunizados con PD5 (grupo más protegido) exhibieron un temprano incremento en la respuesta mediada por IgM anti-DENV-2 tras el estímulo, comparados con los animales de control. Los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (HAI) se incrementaron significativamente más temprano en los animales inmunizados con PD5 comparados con los inmunizados con PD3. La inducción de una temprana respuesta por anticuerpos HAI e IgM después del estímulo sugiere un papel protector contra la infección por DENV en monos, respaldando su uso como correlativo de protección en estudios de vacunas. Aunque el desarrollo de vacunas anti-dengue ha sido continuo en los últimos 60 años, ninguna vacuna autorizada está disponible aún. Se reportó el desarrollo de proteínas fusionadas que contienen el dominio III de la proteína de envoltura del DENV fusionada o inserta en cualquiera de los extremos C- o N-terminal de la proteína de *Neisseria meningitidis* (P64K). A fin de extender los resultados obtenidos en la evaluación previa de dos proteínas recombinantes en monos *Macaca fascicularis*, se caracterizó la respuesta de anticuerpos de memoria luego de la exposición (en términos de IgG, IgM y HAI) con énfasis en señales definidas de inmunidad protectora. Después del estímulo, todos los animales reaccionaron con la producción de anticuerpos IgM específicos anti-DENV-2. Los monos inmunizados previamente con PD5 exhibieron un incremento más temprano en la reactividad mediante IgM en comparación con los inmunizados con P64K. Los monos inmunizados con PD5 y PD3 una respuesta por anticuerpos anti-DENV-2 más pronta y potente que los animales control, sin diferencias entre los títulos de anticuerpos de los grupos inmunizados con PD5 o PD3. Se recuperaron anticuerpos HAI del suero de los monos inmunizados con PD5 significativamente más pronto que el grupo control, pero no así para el grupo inmunizado con PD3. El suero de los animales inmunizados con PD5 fue reactivo solo a la proteína E, mientras que el suero de los animales inmunizados con PD3 y P64K reaccionó adicionalmente a las proteínas NS1 y prM. Una posible explicación podría involucrar un interruptor entre la IgM y las células B que poseen función de memoria, el cual podría jugar un papel crucial en la respuesta inmune secundaria por producción de IgM de alta afinidad durante las fases tempranas

de la infección. Se ha postulado que los anticuerpos HAI inhiben el cambio conformacional de la proteína E a pH ácido, el cuál es crucial para la penetración del virus en la célula huésped [20].

En un esfuerzo para desarrollar un candidato de vacuna ADN idónea para dengue, usando DENV-3 como prototipo, los genes que codifican las proteínas prM y E fueron insertados en un plásmido de expresión. Luego de la selección de los tres candidatos de vacunas (pVAC1DEN-3, pVAC2DEN-3, pVAC3DEN-3), ellos fueron analizados *in vivo* para determinar su habilidad para inducir una respuesta inmune específica contra DENV-3. En el presente, no hay vacunas aprobadas para el DENV, pero varios candidatos de vacunas están en el último estadio de desarrollo. De estas vacunas, algunas son quimeras generadas por la introducción de los genes de las proteínas prM y E del DENV en el ADNc de tamaño natural del virus de la fiebre amarilla o del dengue atenuados. Además, se han hecho dos vacunas tetravalentes por pasaje de cada uno de los cuatro serotipos del dengue en cultivos celulares no humanos. A pesar de que el 80-90 % de los voluntarios desarrollaron anticuerpos neutralizantes después de dos dosis de la vacuna tetravalente, la aparición de enfermedades febriles similares al dengue, probablemente debido a la regresión al fenotipo salvaje, ha sido una frecuente complicación de alguna de estas vacunas. Además, las vacunas quiméricas han inducido efectos adversos tales como fiebre, dolor de cabeza, mialgia, malestar y reacciones en el sitio de inoculación. Otro problema asociado con el uso de vacunas a virus vivos es la posibilidad de la recombinación entre la cepa de la vacuna y el virus salvaje, resultando en un nuevo virus con propiedades indeseables. Los clones pVAC3DEN-3, los cuales mostraron la mejor protección en animales inmunizados, demostraron una única mutación en la región del gen de la prM. El 100 % de los animales inmunizados después de una, dos o tres inyecciones se seroconvirtieron y produjeron anticuerpos neutralizantes específicos. Los resultados del ELISA mostraron que el IFN- γ y la IL-2 fueron sintetizados por los linfocitos de las ratas inmunizadas con pVAC3DEN-3, y la IL-10 fue sintetizada por los linfocitos de las ratas inmunizadas con pVAC1DEN-3. el clon recombinante pVAC2DEN-3 no indujo la producción de ninguna de las citoquinas ensayadas. Los linfocitos B derivados de animales inoculados con los tres candidatos de vacunas demostraron una respuesta proliferativa dependiente de la dosis de DENV-3 inactivado. La inmunización con pVAC3DEN-3 indujo protección completa contra el DENV-3, con un 80 % de supervivencia en las ratas inoculadas. Sin embargo, solo el 40 % y 30 % de supervivencia se observó después de la inmunización con pVAC1DEN-3 y pVAC2DEN-3, respectivamente. Se incluyó el gen que codifica para la proteína prM en el diseño debido al hecho de que los epítopes neutralizantes de la proteína E contra el virus del dengue mostraron ser conformacionalmente dependientes, demostrándose que la correcta conformación de la proteína E depende de la co-expresión de la proteína prM. En este estudio, la expresión de proteína E por las células inoculadas se correlaciona con trabajos previos que demuestran que el gen de la prM es necesario para la correcta expresión del gen de la proteína E [21].

Uso de anticuerpos monoclonales como posible tratamiento y/o prevención de la infección

Los anticuerpos monoclonales (MAbs) específicos contra DENV son vitales para el diagnóstico, estudios patológicos y terapia de inmunización pasiva. Se usó DENV-2 purificado para inmunizar ratones e inducir la formación de anticuerpos específicos. Los resultados muestran que la inmunización con viriones purificados es eficiente para la producción de MAbs neutralizantes específicos contra el DENV-2, y estos MAbs pueden ser herramientas útiles para el estudio o tratamiento de las infecciones por

DENV. Además, el uso de partículas virales completas como antígenos para inducir anticuerpos específicos es útil y de bajo costo. Se obtuvieron y caracterizaron cinco MAbs, los cuales mostraron diferente actividad neutralizante *in vitro* frente a DENV-2. Estos anticuerpos reconocieron los antígenos naturales del virus y desnaturalizaron las proteínas virales, sugiriendo que ellos podrían ser herramientas útiles para el estudio de la infección por DENV. Sorprendentemente, la combinación de dos líneas de MAbs mostró una protección más poderosa contra la infección por DENV, en comparación con un único MAb. Esto demuestra efectos de sinergismo y/o adición de las combinaciones de dos o más MAbs en la neutralización del DENV. La combinación de dos MAbs contra dos epítopes neutralizantes puede aumentar la eficacia de la neutralización y prevenir la evasión del virus a la misma [4].

Referencias

- [1] Damonte E. (2006). Dengue: un viejo y nuevo desafío para la quimioterapia antiviral. Revista Química Viva número 2, año 5, agosto.
- [2] Acosta E., Castilla V., Damonte E. (2008). Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. Journal of General Virology, 89, 474–484.
- [3] Seema, Jain S. (2005). Molecular mechanism of pathogenesis of dengue virus: entry and fusion with target cell. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 20 (2) 92-103.
- [4] Chen Z., Liu L., Gao N., Xu X., Zhang J., Wang J., An J. (2009). Passive Protection Assay of Monoclonal Antibodies Against Dengue Virus in Suckling Mice. Curr Microbiol 58:326–331.
- [5] Talarico L. (2008). La entrada del virus dengue a la célula como un potencial blanco antiviral: estudio de polisacáridos sulfatados como antivirales. Química Viva, Julio-Agosto, año/vol. 7, número 002.
- [6] Lim H., Ng M. (1999). A different mode of entry by dengue-2 neutralisation escape mutant virus. Arch Virol 144: 989–995.
- [7] López C., Gil L., Lazo L., Menéndez I., Marcos E., Sánchez J., Valdés I., Falcón V., de la Rosa M., Márquez G., Guillén G., Hermida L. (2009). In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus. Arch Virol 154:695–698.
- [8] Premkumar A., Horan C., Gage P. (2005). Dengue Virus M Protein C-Terminal Peptide (DVM-C) Forms Ion Channels. J. Membrane Biol. 204, 33–38.
- [9] Tarima S., Takasaki T., Kurane I. (2008). Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. Virus Genes 36:323–329.
- [10] Crabtree M., Kinney R., Miller B. (2005). Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: Construction and characterization of mutant viruses. Arch Virol 150: 771–786.
- [11] Laille M., Gerald F., Debitus C. (1998). In vitro antiviral activity on dengue virus of marine natural products. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 54 167–170.

- [12] Laurent D., Baumann F., Benoit A., Mortelecq A., Nitatpattana N., Desvignes I., Debitus C., Laille M., Gonzalez J., Chungue E. (2005). Structure-Activity relationships of Dengue antiviral polycyclic quinones. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. Vol 36 N° 4 July 2005.
- [13] Chen W., Gao N., Wang J., Tian Y., Chen Z., An J. (2008). Vimentin is required for dengue virus serotype 2 infection but microtubules are not necessary for this process. *Arch Virol* 153:1777–1781.
- [14] Sierra B., Kourí G., Guzmán M. (2007). Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol* 152: 533–542.
- [15] Soundravally R., Hoti S. (2008). Significance of Transporter Associated with Antigen Processing 2 (TAP2) Gene Polymorphisms in Susceptibility to Dengue Viral Infection. *J Clin Immunol* 28:256–262.
- [16] Qin C., Qin E. (2006). Capsid-targeted viral inactivation can destroy dengue 2 virus from within *in Vitro*. *Arch Virol* 151: 379–385.
- [17] Yennamalli R., Subbarao N., Kampmann T., McGeary R., Young P., Kobe B. (2009). Identification of novel target sites and an inhibitor of the dengue virus E protein. *J Comput Aided Mol Des* 23:333–341.
- [18] Falconar K. (1999). Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins. *Arch Virol* 144: 2313–2330.
- [19] Blaney J., Manipon G., Murphy B., Whitehead S. (2003). Temperature sensitive mutations in the genes encoding the NS1, NS2A, NS3, and NS5 nonstructural proteins of dengue virus type 4 restrict replication in the brains of mice. *Arch Virol* 148: 999–1006.
- [20] Bernardo L., Hermida L., Martin J., Alvarez M., Prado I., López C., Martínez R., Rodríguez-Roche R., Zulueta A., Lazo L., Rosario D., Guillén G., Guzmán M. (2008). Anamnestic antibody response after viral challenge in monkeys immunized with dengue 2 recombinant fusion proteins. *Arch Virol* 153:849–854.
- [21] De Paula S., Lima D., de Oliveira França R., Gomes-Ruiz A., Lopes da Fonseca B. (2008). A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *Arch Virol* 153:2215–2223.