



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

FACULTAD DE FARMACIA



**“PAPEL DE TGF- $\beta$ 1 EN MACRÓFAGOS  
INFECTADOS CON VIRUS DENGUE”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**L.C. Brenda Ramírez Agüero**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Judith González Christen**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**JUNIO 2018**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**FACULTAD DE FARMACIA**

Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

**Fecha:** 16 de febrero de 2018

**Asunto:** Jurado

**Medio de notificación:** Impresa/personal

**Folio:** FF/D/SAc/CIP/MF/056/2018

**L.C. BRENDA RAMÍREZ AGÜERO**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA**  
**P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asignó el siguiente jurado para evaluar la tesis "Papel de TGF- $\beta$ 1 en macrófagos infectados con Virus Dengue".

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

**PRESIDENTE:** Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza  
**SECRETARIO:** Dra. Leticia González Maya  
**VOCAL 1:** Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza  
**VOCAL 2:** Dra. Lourdes Rodríguez Fragoso  
**VOCAL3:** Dra. María Angélica Santana Calderón

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*  
*Una universidad de excelencia*

**Dr. Julio César Rivera Leyva.**  
Jefatura de Posgrado



ccp: archivo  
mitv

**Este trabajo se realizó en la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (CISEI-INSP), campus Morelos.**

**Agradecimientos a CONACYT, no. de becario 741828 y a PROMEP-SEP por el apoyo al proyecto 103.5/13/5259.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

Antes que nada quiero agradecerle a Dios por brindarme la familia que tengo, por los buenos amigos y por todas las enseñanzas que he recibido a lo largo de mi vida.

En particular, me gustaría dar las gracias a mi familia por estar conmigo en los momentos más difíciles, por el apoyo, comprensión y fe que han depositado en mí. A mi mamá por todo el amor, consejos y educación que me ha dado y que me han permitido convertirme en la persona que soy. A mi papá por apoyarme en la parte moral y económica, además de su cariño y confianza. A mi hermano por apoyarme en todos los aspectos de mi vida, por estar conmigo siempre que lo necesito, por sus consejos y por todos los momentos que hemos vivido juntos. Los amo mucho.

Estoy especialmente agradecida con la Dra. Judith González por haberme aceptado en su grupo de investigación, por todas las enseñanzas que recibí de su parte, por el apoyo que me brindó durante todo este tiempo y por la confianza que depositó en mí.

A mis compañeros del laboratorio Jesús, Daniel, Emmanuel, Josías, Trinidad, Tonatiuh, Andrés e Iván. De manera especial a Miriam, Sandra, Maritza, Isabel, Elio y Samantha por la amistad, el apoyo y todos los buenos momentos que compartimos. Los quiero mucho.

A mis amigos de toda la vida Andrea, por su amistad incondicional y por estar conmigo en los momentos más complicados. A Nayeli, porque a pesar de todas las dificultades que ha tenido nuestra amistad siempre has estado al pendiente de mí. A Pablo, pese a que tomamos caminos diferentes, sigues siendo parte de mi vida y sé que puedo contar contigo siempre que lo necesite. A Joss, por todo lo que hemos compartido durante todos los años que llevamos de amistad, por tu apoyo y todos tus consejos. A Vane, porque aunque siempre nos hemos llevado bien, pienso que las experiencias de estos últimos años me han permitido identificarme más contigo haciendo que seamos más unidas.

A Lety, por haberme brindado su amistad y por todo lo que hemos vivido juntas. A Anabel, porque a pesar de ser tan diferentes hemos establecido una excelente amistad, compartiendo muchas vivencias. A Julieta, por haber sido mi primera amiga durante la maestría y por todo el apoyo que me has dado durante esta etapa. A Sandra, por la amistad que me has brindado desde que nos conocimos, por todas las risas, consejos y momentos compartidos. A Miriam,

porque siempre hiciste más divertida mi estancia en el laboratorio y porque sé que puedo contar contigo en cualquier momento. A Maritza por ser una excelente amiga y persona, por sus consejos y por estar siempre conmigo. Los quiero mucho.

De manera especial quiero agradecer a Daniela, porque me apoyaste desde que estaba en la licenciatura con tu amistad y consejos. A Roberto, por las sugerencias que me brindaste para que mi proyecto saliera mejor y por supuesto por tu amistad.

Me gustaría dar las gracias al Dr. Humberto Lanz Mendoza por la supervisión y dirección durante la realización de mi proyecto y por haberme recibido en su laboratorio para que pudiera continuar con mis experimentos.

A la Dra. Angélica Santana por despertar mi interés por la Inmunología y por dedicarle su tiempo a la revisión de este trabajo. Muchas gracias.

Al Dr. José Luis Montiel por sus comentarios, opiniones y sugerencias para la realización de este proyecto.

A los Dres. Jorge Reyes Esparza, Leticia González Maya y Lourdes Rodríguez Fragoso por los comentarios, el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo y por lo que aportaron para la mejora de la misma.

A todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron al desarrollo de este proyecto.

Esta tesis está dedicada a todos los ángeles que me cuidan desde el cielo.

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.”

Marie Curie

## ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 Dengue .....	3
3.1.1 Generalidades del Dengue.....	3
3.2 Manifestaciones clínicas del Dengue.....	4
3.3 El virus Dengue .....	7
3.4 Respuesta inmune frente a la infección por el virus Dengue.....	8
3.5 Mediadores de la respuesta inmune.....	10
3.6 Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ).....	11
3.7 Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ ).....	13
4. ANTECEDENTES .....	16
5. JUSTIFICACIÓN. ....	17
6. HIPÓTESIS.....	18
7. OBJETIVOS .....	18
7.1 Objetivo General .....	18
7.2 Objetivos Particulares.....	18
8. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	19
8.1 Cultivo Celular y virus.....	19
8.2 Ensayo para determinar el efecto del pre-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 en macrófagos infectados con el virus Dengue .....	19
8.3 Ensayo para determinar el efecto del post-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 en macrófagos infectados con el virus Dengue .....	20
8.4 Ensayo para establecer el efecto del inhibidor de la señalización por TGF- $\beta$ .....	21
8.6 Detección de la infección por RT-PCR .....	22
8.7 Detección por RT-PCR de la expresión de IL-1 $\beta$ en macrófagos infectados con virus Dengue.....	25
8.8 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para cuantificar IL-1 $\beta$ en el sobrenadante de macrófagos infectados con el virus Dengue.....	26
8.9 Efecto de la infección por el virus Dengue sobre las proteínas Smad 2,3 y 7 .....	27

9. RESULTADOS.....	29
9.1 Detección de la infección en macrófagos infectados por virus Dengue.....	29
9.2 Efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre la producción de IL-1 $\beta$ en macrófagos infectados con el virus Dengue.....	30
9.3 Efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de IL-1 $\beta$ en macrófagos infectados con el virus Dengue.....	34
9.4 Efecto de TGF- $\beta$ 1 y la infección por el virus Dengue sobre las proteínas Smad.....	37
10. DISCUSIÓN .....	38
12. PERSPECTIVAS.....	44
13. BIBLIOGRAFÍA.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución global del Dengue .....	4
<b>Figura 2.</b> Etapas clínicas de la enfermedad.....	5
<b>Figura 3.</b> Manifestaciones clínicas consideradas por la OMS.....	6
<b>Figura 4.</b> Estructura del virus Dengue .....	7
<b>Figura 5.</b> Vías de señalización activadas por IL-1 $\beta$ .....	12
<b>Figura 6.</b> Señalización mediada por TGF- $\beta$ .....	14
<b>Figura 7.</b> Tratamientos realizados en el ensayo pre-infección .....	20
<b>Figura 8.</b> Tratamientos realizados en el ensayo post-infección .....	21
<b>Figura 9.</b> Detección de la infección por Dengue mediante Microscopía de Fluorescencia.....	29
<b>Figura 10.</b> Detección de la infección por RT-PCR .....	30
<b>Figura 11.</b> Cuantificación de IL-1 $\beta$ (ensayo pre-infección).....	31
<b>Figura 12.</b> Cuantificación de IL-1 $\beta$ (ensayo post-infección) .....	32
<b>Figura 13.</b> Cuantificación de IL-1 $\beta$ (ensayo con el inhibidor de TGF- $\beta$ RI).....	33
<b>Figura 14.</b> RT-PCR para IL-1 $\beta$ (ensayo pre-infección) .....	34
<b>Figura 15.</b> RT-PCR para IL-1 $\beta$ (ensayo post-infección).....	35
<b>Figura 16.</b> RT-PCR para IL-1 $\beta$ (ensayo con el inhibidor de TGF- $\beta$ RI)..	36
<b>Figura 17.</b> Detección de proteínas Smad2/3..	37

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos y cantidades requeridas para la síntesis de cDNA. ....	23
Tabla 2. Condiciones utilizadas para la síntesis de cDNA. ....	23
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para determinar infección por Dengue serotipo 2 mediante RT-PCR. ....	24
Tabla 4. Reactivos y cantidades necesarias para la amplificación. ....	24
Tabla 5. Condiciones de amplificación para detectar infección por virus Dengue serotipo 2. ...	24
Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación. ....	25
Tabla 7. Reactivos y cantidades requeridas para la amplificación. ....	25
Tabla 8. Condiciones de amplificación utilizadas para IL-1 $\beta$ y $\beta$ -actina. ....	25

## 1. RESUMEN

El dengue es una enfermedad viral transmitida por mosquitos, principalmente de las especies *Aedes aegyptis* y *A. albopictus*. Los síntomas de la enfermedad pueden abarcar desde un estado febril leve hasta un amplio rango de manifestaciones clínicas que han sido clasificadas como Dengue leve (con y sin signos de alarma) y Dengue Severo. Aún son desconocidos los factores que conllevan a que un individuo desarrolle las manifestaciones más severas, sin embargo, genotipos más virulentos, predisposición genética y la respuesta inmune exacerbada del huésped, han sido relacionados con este desarrollo.

La producción alterada de citocinas, como TGF- $\beta$ , se ha relacionado con la patogénesis de la enfermedad. Esta citocina normalmente favorece muchas funciones entre las que destacan: proliferación, migración, muerte y regulación de la respuesta inmune debido a que es capaz de regular la expresión y secreción de diferentes mediadores inflamatorios. Algunos estudios han demostrado la participación de TGF- $\beta$  en el desarrollo de la severidad del Dengue. Por otra parte, se ha visto que una de las proteínas generada en respuesta a la señalización por TGF- $\beta$ , regula de manera negativa a la vía de señalización de IL-1 $\beta$ , demostrando una relación entre estas citocinas.

En base a esto, nosotros estudiamos el efecto de TGF- $\beta$ 1 en la expresión y producción de IL-1 $\beta$  en un modelo de macrófagos (células THP-1 diferenciadas a macrófagos) infectados con virus Dengue serotipo 2 con la finalidad de determinar el papel que juega esta citocina durante este proceso, lo cual permitirá un mejor entendimiento de los procesos patológicos de esta enfermedad.

La pre-estimulación con TGF- $\beta$ 1 provocó la inhibición de la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados con el virus Dengue; no obstante, los macrófagos infectados y posteriormente estimulados con TGF- $\beta$ 1 secretaron niveles similares de IL-1 $\beta$  a los macrófagos que fueron únicamente infectados. Por otra parte, la inhibición de la señalización de TGF- $\beta$  aumentó la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados con el virus Dengue. Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de IL-1 $\beta$  en respuesta al estímulo con TGF- $\beta$ 1 en ninguno de los casos. Estos resultados sugieren que TGF- $\beta$ 1 podría estar implicada en las primeras etapas del proceso de infección por el virus Dengue a través de la modulación de la secreción de IL-1 $\beta$ .

## 2. ABSTRACT

Dengue is a viral disease transmitted by mosquitoes like *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Manifestations of the disease ranges from a mild febril state to a wide spectre of clinical manifestations, classified as Dengue Fever (mild Dengue with or without alarm signs) and Severe Dengue. Why certain individuals develop severe manifestations is unknown, but it has been proposed that the factors involved are: virulent genotypes, genetic predisposition and the immune response of patients.

Altered cytokine production, such as TGF- $\beta$ , has been linked with the disease pathogenesis. This cytokine participates in proliferation, migration, death and regulation of immune response, because it regulates the expression and secretion of different inflammatory mediators.

Some studies have shown the participation of TGF- $\beta$  in the development of severity of Dengue. On the other hand, one of the proteins produced in response to TGF- $\beta$  regulates negatively the signaling of IL-1 $\beta$ , showing a relationship between these cytokines.

In order to determine the role of this cytokine during dengue infection, we studied the effect of TGF- $\beta$ 1 in the expression and secretion of IL-1 $\beta$  in a model of macrophages (THP-1 cells differentiated to macrophages) infected with Dengue virus serotype 2. This will allow a better understanding of the pathological processes of this disease.

Pre-stimulation with TGF- $\beta$ 1 caused the inhibition of IL-1 $\beta$  secretion in macrophages infected with Dengue virus; however, macrophages infected and subsequently stimulated with TGF- $\beta$ 1 secreted similar levels of IL-1 $\beta$  to macrophages that were only infected. On the other hand, the inhibition of TGF- $\beta$  signaling increased the production of IL-1 $\beta$  in macrophages infected with Dengue virus. However, no changes were observed in the expression of IL-1 $\beta$  in response to stimulation with TGF- $\beta$ 1 in any of the cases. These results suggest that TGF- $\beta$ 1 could be involved in the early stages of the Dengue virus infection process through the modulation of IL-1 $\beta$  secretion.

### **3. INTRODUCCIÓN**

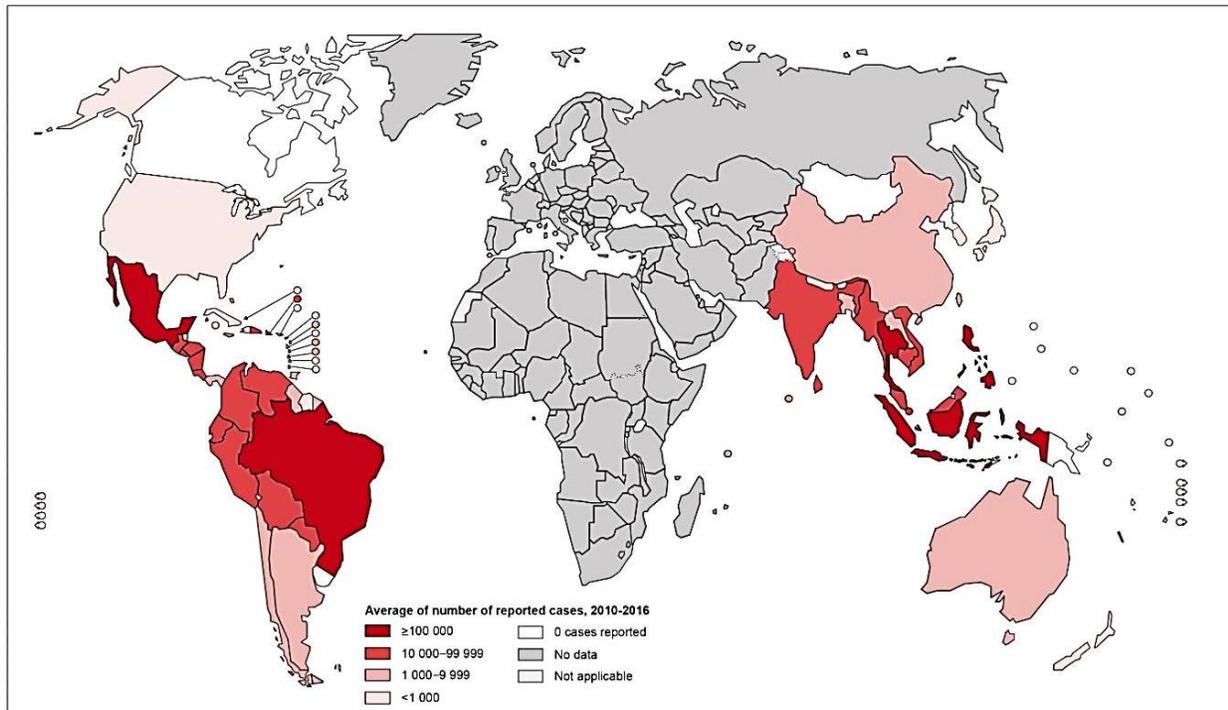
#### **3.1 Dengue**

##### **3.1.1 Generalidades del Dengue**

El dengue se define como una enfermedad febril aguda provocada por la infección del virus Dengue (DENV). Esta afecta a una gran parte de la población mundial que vive en zonas de riesgo, por la presencia del mosquito vector, como son las regiones tropicales y sub-tropicales del planeta<sup>1</sup>. Es endémica en más de 100 países, como se observa en la figura 1, y se han reportado tasas de mortalidad de 5 a 20% en algunas zonas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que cada año se infectan aproximadamente 390 millones de personas, de las cuales 96 millones presentan sintomatología<sup>2</sup>. Las estimaciones de la incidencia de esta enfermedad han estado entre 50 y 200 millones, sin embargo, estudios recientes utilizando aproximaciones cartográficas indican que la cifra se encuentra cercana a los 400 millones<sup>3</sup>.

En el año 2012, el Dengue se clasificó como la principal enfermedad viral transmitida por mosquito en todo el mundo; observándose una rápida propagación de los 4 serotipos en diferentes regiones de Asia, América, África y el Mediterráneo Oriental<sup>3,4</sup>. El año 2016 se caracterizó por un aumento significativo en los brotes de Dengue en todo el mundo; por ejemplo, en América se registraron 2,380,000 casos de los cuales 1,500,000 correspondieron a Brasil, reportándose además 1032 muertes por esta enfermedad<sup>5</sup>.

Datos de la Organización Panamericana de la Salud para el 2017, reportaron un total de 483,208 casos tan solo en el continente Americano<sup>6</sup>, siendo Brasil, Perú y México los países con el mayor número de casos. En México, el dengue se ha diseminado de sur a norte principalmente en las entidades que cuentan con las condiciones propicias para el vector. Es posible observar que los 4 serotipos del virus así como combinaciones del mismo se encuentran en circulación. En general, la epidemiología del Dengue ha mostrado un comportamiento irregular debido a que se han observado tasas altas y bajas de morbilidad cada año<sup>7</sup>.



**Figura 1.** Distribución global del Dengue. En el mapa se muestra el número promedio de casos confirmados o sospechosos reportados por la OMS durante el período 2010-2016 indicados mediante color rojo.

Tomado de: <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>

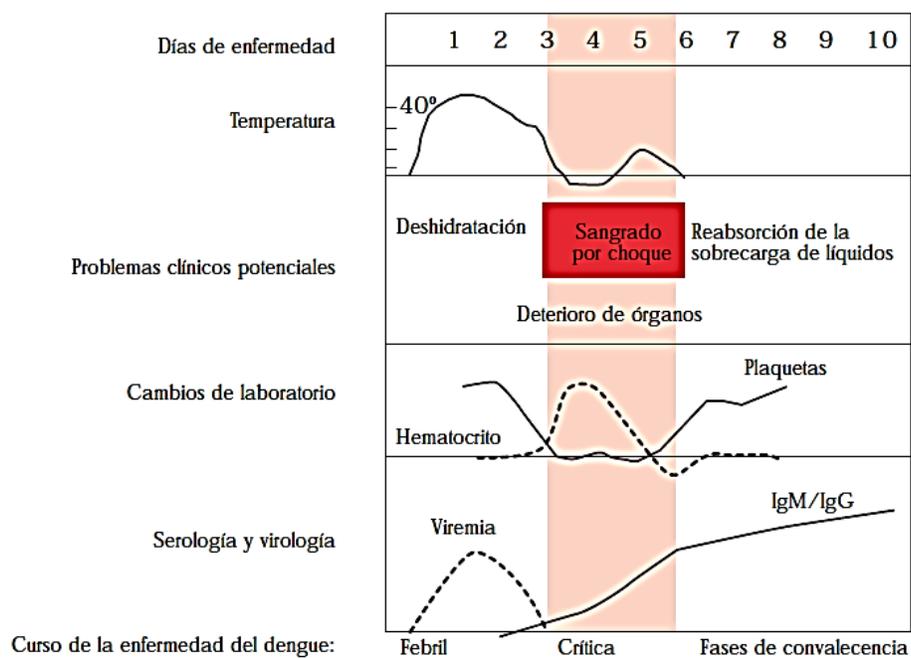
### 3.2 Manifestaciones clínicas del Dengue

En algunos casos, la infección por el virus Dengue no genera síntomas; sin embargo, es posible que un pequeño porcentaje presente manifestaciones leves e incluso algunas personas desarrollen manifestaciones clínicas más severas de la enfermedad. El curso de la enfermedad se ha dividido en tres fases como se observa en la figura 2 y se describen a continuación<sup>8,9</sup>:

1) *Fase Febril*, dura aproximadamente 2 a 7 días, los pacientes presentan fiebre mayor o igual a 38.5° así como dolor de cabeza, de cuerpo, retro-orbital y de articulaciones; el vómito y las náuseas son comunes en esta fase. En la mayoría de los casos, los pacientes pueden pasar o no a la fase 3 sin mayores complicaciones en esta etapa.

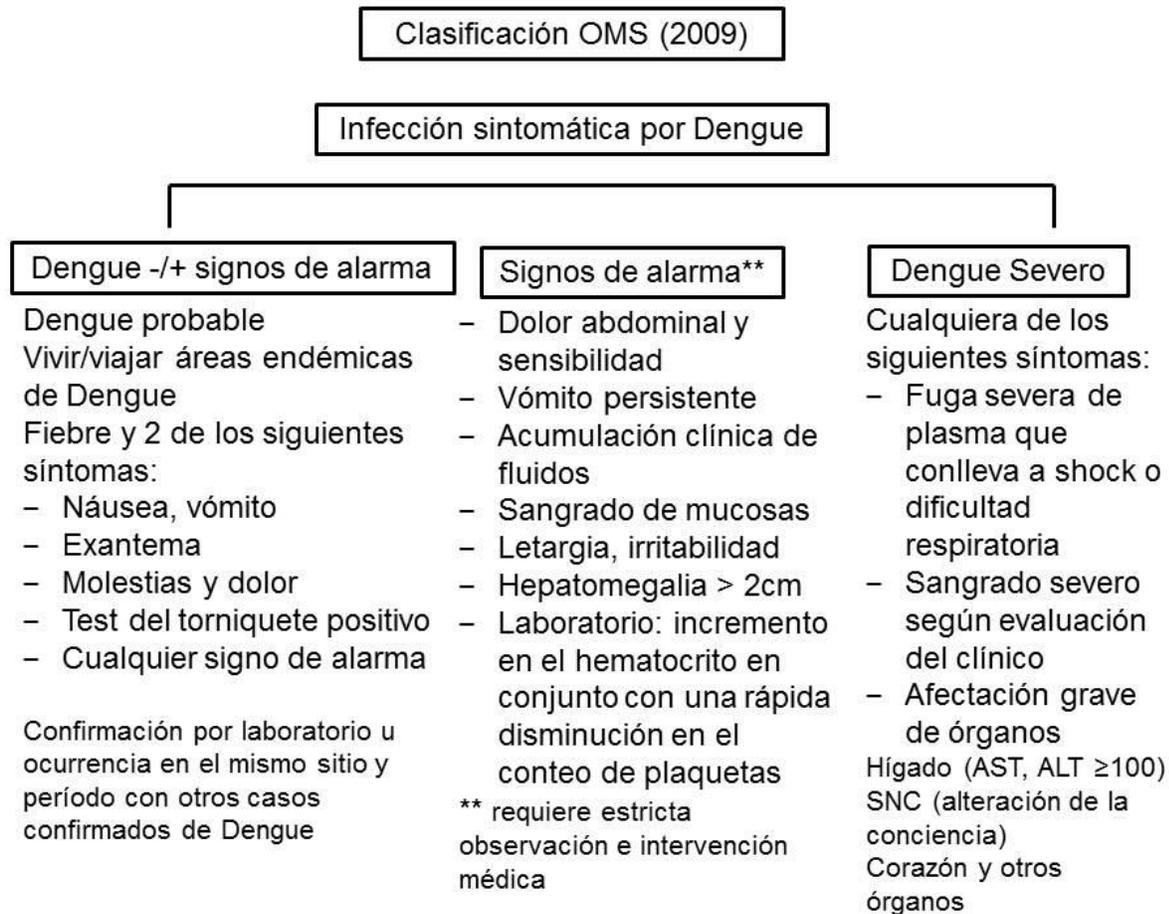
2) *Fase crítica*, suele coincidir con el período de defervescencia (disminución de la fiebre) y se caracteriza por leucopenia progresiva seguida por una disminución en el conteo de plaquetas que en la mayoría de las ocasiones coincide con la fuga vascular; el aumento en el hematocrito que provoca disminución en la presión sanguínea suele ser un indicativo de la severidad de la fuga. Cabe mencionar que cuando ocurre una pérdida importante de plasma debida a la fuga vascular se puede presentar el Síndrome de Shock por Dengue que se caracteriza por hipotensión, hemorragias severas y deterioro de los órganos que puede conllevar a la muerte.

3) *Fase de recuperación*, si los pacientes logran sobrevivir a la fase crítica de la enfermedad, ocurre la reabsorción espontánea de los fluidos en las 48 a 72 horas siguientes generando estabilización del hematocrito y un aumento en el número de células y plaquetas que conlleva a una mejora de los pacientes.



**Figura 2.** Etapas clínicas de la enfermedad.  
Tomado de Dengue: guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. OMS, 2009.

Desde el año 2009, la OMS propuso una clasificación basada en la severidad de la enfermedad que permite distinguir con mayor facilidad los casos más graves y que requieren una mayor atención médica; esta incluye el Dengue sin síntomas de alarma, Dengue con síntomas de alarma y Dengue Grave<sup>10</sup>. En la figura 3, se indican los parámetros que se utilizan en esta clasificación.



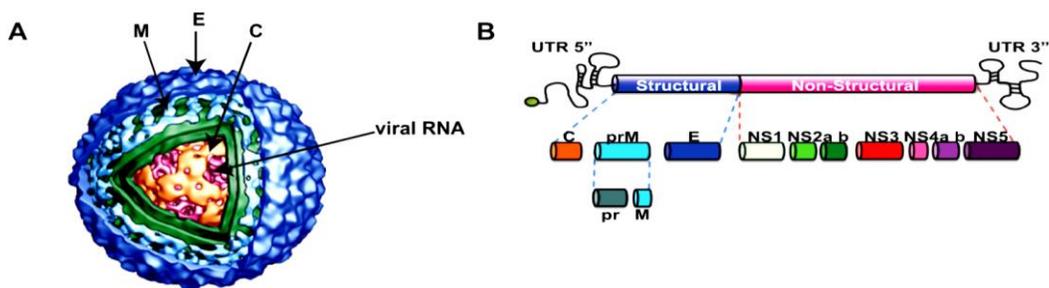
**Figura 3.** Manifestaciones clínicas consideradas por la OMS. Esta clasificación permite incluir a un paciente dentro de alguno de los 3 grupos: Dengue sin síntomas de alarma, Dengue con síntomas de alarma y Dengue Grave.

Traducido de Sudulagunta *et al.*, 2015.

### 3.3 El virus Dengue

El agente etiológico de la enfermedad es el virus Dengue, un arbovirus transmitido principalmente por mosquitos como *Aedes aegypti* y *A. albopictus*<sup>11</sup>. Este virus pertenece a la familia *Flaviviridae* y se relaciona con los virus que causan la fiebre amarilla, la encefalitis del oeste del Nilo, encefalitis japonesa, encefalitis transmitida por garrapata y fiebre por Zika<sup>12</sup>. El virus infecta principalmente células del sistema inmune innato como son: monocitos, macrófagos, células dendríticas maduras e inmaduras<sup>13</sup>.

Su genoma consiste en un ARN monocatenario positivo de aproximadamente 11 kb que codifica para tres proteínas estructurales: Cápside (C), Membrana (M) y Envoltura (E) así como para siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5<sup>14</sup> implicadas en diferentes procesos. NS1, NS2A, NS4A y NS4B participan en la replicación del ARN junto con NS5 que posee actividad de polimerasa en la posición C-terminal. NS2B y NS3 participan en el procesamiento de la poliproteína<sup>15</sup>. Una vez que entra a la célula, el genoma se libera y se traduce a una poliproteína que se procesa por proteasas tanto del virus como de la célula, liberando las proteínas estructurales y no estructurales antes mencionadas. Las proteínas NS comienzan la replicación del genoma viral que se asocia a la proteína C para formar la nucleocápside y se sintetizan las proteínas E y prM, que deben glicosilarse para su correcto plegamiento. Una vez que dimerizan entre ellas, se unen al virión y se proyectan en su superficie. El virión pasa a través del trans-Golgi donde la furina corta a la proteína prM en la forma activa (M) y la secreción de los viriones ocurre vía exocitosis<sup>16,17</sup>.



**Figura 4.** Estructura del virus Dengue. A) El virus Dengue es un virus envuelto constituido por 3 proteínas estructurales: las proteínas M y E que se encuentran ancladas a la membrana del virus y la proteína C que rodea y protege al ARN viral. B) El genoma consiste en un ARN monocatenario de polaridad positiva que codifica para 3 proteínas estructurales así como para 7 proteínas no estructurales implicadas en la replicación del virus y en el procesamiento de la poliproteína.

Tomado de Del Ángel & Reyes-Del Valle, 2013

### 3.4 Respuesta inmune frente a la infección por el virus Dengue

La primera línea de defensa contra la infección por el virus Dengue requiere el reconocimiento del ARN viral, entre otros por los Receptores Tipo Toll (TLR's, por sus siglas en inglés), de manera particular por TLR3, TLR4 y TLR7<sup>18</sup>. La activación de estos inicia una cascada de señalización que culmina en la activación de factores de transcripción como IRF-3, NF- $\kappa$ B y AP-1 que promueven la expresión y secreción de Interleucinas (IL's) como IL-8 e IL-1 $\beta$  así como de Interferones (IFN)  $\alpha/\beta$ <sup>19</sup>. La unión de IFN  $\alpha/\beta$  al receptor de IFN tipo I conlleva a la activación de cinasas Jak-Jak1 y Tyk2-que a su vez fosforilan y activan a STAT1 y STAT2. Una vez activas, estas proteínas se dimerizan formando un factor de transcripción que se transloca al núcleo, donde promueven la transcripción de genes involucrados en la respuesta antiviral<sup>20</sup>.

La cinasa PKR es una de las primeras proteínas que se produce en respuesta al IFN  $\alpha/\beta$ , esta fosforila al factor eIF2a promoviendo su unión irreversible con eIF2B, impidiendo así que participe en el proceso de traducción de las proteínas virales. Además PKR fosforila a la proteína cinasa I $\kappa$ B, permitiendo la liberación de NF- $\kappa$ B que se transloca al núcleo donde promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF<sup>21</sup>. Otra proteína que participa en la respuesta antiviral es RNasa L, que al activarse por la unión de oligómeros de adenosina, corta tanto el ARN viral como el celular y por lo tanto inhibe la traducción de las proteínas del virus<sup>22</sup>.

El virus Dengue ha desarrollado diferentes estrategias para evadir la respuesta antiviral del huésped, particularmente inhibiendo la expresión y acción de IFN  $\alpha/\beta$ . Algunos ejemplos incluyen la degradación de STING que fosforila al IRF-3<sup>16</sup> por NS2B3, la degradación de STAT2 por NS5 y la inhibición de la activación de STAT1 por las proteínas virales NS2A, NS4A y NS4B<sup>20,23</sup>.

Además de esto, se induce una respuesta más pronunciada por medio de la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, que permite la expresión de mediadores pro-inflamatorios entre los que se encuentran: IL-6, TNF, IL-1 $\beta$ , quimiocinas como IL-8 y RANTES, que promueven el reclutamiento de diferentes células, entre las que destacan: células dendríticas, monocitos, neutrófilos, células cebadas, células NK y células T que cumplen diferentes funciones durante el proceso inflamatorio y que se describen de manera breve a continuación.

Las células cebadas se encuentran dentro de los límites de los vasos sanguíneos y son capaces de liberar mediadores pre-formados como histamina, prostaglandinas, así como citocinas formadas de *novo* en respuesta a la infección por el virus Dengue<sup>24,25</sup> lo que se ha relacionado con funciones protectoras así como con la severidad de la enfermedad<sup>26,27</sup>. Las células NK tienen actividad citotóxica contra las células infectadas y además son una de las principales fuentes de IFN- $\gamma$  que activa a las células dendríticas y macrófagos<sup>28</sup> las cuales presentan el antígeno viral en el contexto del MHC a células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que producen diferentes citocinas como TNF, IL-2, IFN- $\gamma$ , entre otras, y actúan sobre diferentes células permitiendo su activación y promoviendo la producción de otros intermediarios incluyendo más citocinas<sup>29</sup>. En el caso de Dengue, se ha observado una participación dual, debido a su papel protector a través de los mecanismos descritos anteriormente. Sin embargo, se ha observado que el virus Dengue puede inducir la sobre-expresión de moléculas MHC-I, convirtiéndose en una señal negativa de activación para las NK, permitiendo así la evasión de esta respuesta. Por otro lado, la presencia de anticuerpos anti-Dengue, puede facilitar el reconocimiento de células infectadas induciendo su apoptosis. No obstante, en casos de alta carga viral, parece que esta estrategia es negativa para el paciente, ya que se puede asociar a la destrucción de células hepáticas, así como a otros tipos de daños tisulares<sup>30</sup>.

Las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se activan después de la infección viral al reconocer diferentes epítopes en proteínas estructurales y no estructurales; sin embargo, NS3 se ha identificado como la principal proteína inmunodominante debido a que contiene múltiples epítopes en su estructura<sup>31</sup>. El papel de las células T no es completamente entendido, pero diferentes estudios han mostrado su participación durante la infección por el virus Dengue. Un estudio mostró que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son capaces de migrar a la piel durante la fase aguda y pueden ejercer funciones antivirales debido a que producen IFN- $\gamma$ <sup>32</sup>. Sin embargo, se han observado diferencias en la función de las células T durante el desarrollo de la enfermedad ya que un estudio demostró que las células T CD8<sup>+</sup> de pacientes con Fiebre Dengue son capaces de desgranular pero producen niveles bajos de TNF e IFN- $\gamma$  mientras que en infecciones secundarias y Dengue Severo se observó un efecto contrario, es decir, estos linfocitos presentan una capacidad disminuida de desgranulación y producen niveles elevados de TNF e IFN- $\gamma$ , sugiriendo un efecto negativo en el control viral y por otra parte su participación en la patología de la enfermedad a través de la producción elevada de citocinas inflamatorias<sup>33</sup>.

### 3.5 Mediadores de la respuesta inmune.

Las causas que conllevan hacia formas más severas de la enfermedad aún se desconocen, sin embargo, se ha observado que genotipos virulentos descritos para los serotipos 2 y 3, polimorfismos en HLA y en citocinas como IL-10, IL-6, TNF, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 y principalmente la respuesta inmune del huésped se relacionan con la patogénesis de la enfermedad<sup>34-36</sup>

Como se mencionó anteriormente, en respuesta a la infección se producen diferentes intermediarios. Varios estudios han descrito la presencia de niveles elevados de TNF, IL-6, IL-8, CCL2, CCL3, CXCL10 e IFN- $\gamma$  en infecciones primarias y secundarias<sup>37</sup>. Otros estudios demostraron un aumento en los niveles de IL-4, IL-6 e IL-10 en casos severos de la enfermedad así como un aumento en IFN- $\gamma$  e IL-2 en pacientes con Fiebre Dengue, sugiriendo que el cambio en el perfil de citocinas inflamatorias hacia anti-inflamatorias está relacionado con la severidad de la enfermedad<sup>38</sup>.

La mayoría de las investigaciones han mostrado niveles elevados de **IL-1 $\beta$** , IL-4, IL-7, IL-13, GM-CSF, IL-10, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-18, **TGF- $\beta$ 1**, TNF, CXCL10, MCP-1, ICAM-1, Eotaxina, CCR1, CCL3<sup>39-45</sup> así como niveles bajos de IFN- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , VEGF, FGF e IL-7<sup>39,41,46-49</sup> en pacientes con las manifestaciones más graves. Por otra parte, algunos estudios han reportado niveles elevados de otros mediadores como hCF, TF, MIF, sTM, sVEGFRI, IL-9, IL-17e IL-1Ra<sup>38,44,47,49-52</sup> en los casos más graves de la enfermedad.

Estos intermediarios pueden inducir de forma directa o indirecta la fuga vascular observada en los pacientes con manifestaciones severas de la enfermedad. Por ejemplo, se ha demostrado que TNF es capaz de inducir fuga vascular en modelos *in vitro*<sup>53,54</sup> así como en modelos animales<sup>55</sup>. De igual manera, se han encontrado niveles elevados de esta citocina en pacientes con Dengue Severo o síndrome de shock por Dengue<sup>56,57</sup>. Otro ejemplo es IFN- $\gamma$ , que actúa indirectamente sobre la fuga vascular al promover la producción de TNF además de interactuar con dicha citocina para activar a las células endoteliales en modelos *in vitro*<sup>55</sup>.

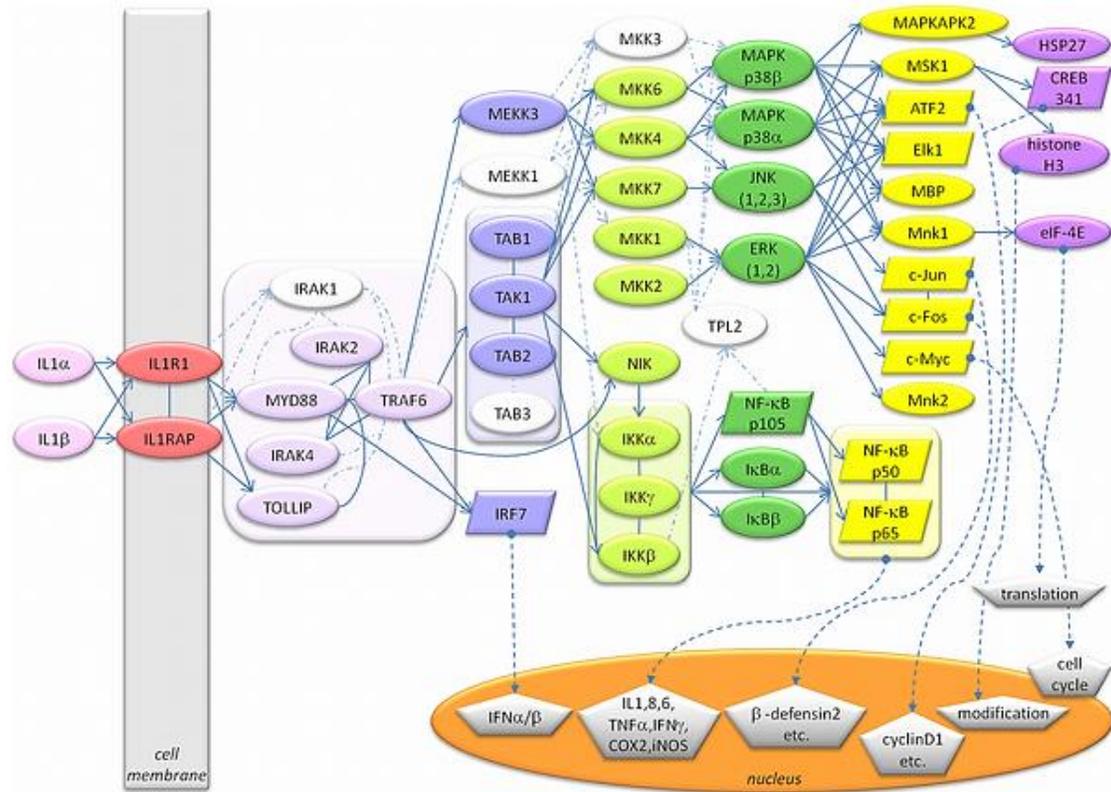
Por otra parte, se sabe que las citocinas son capaces de inducir la producción y liberación de más citocinas así como otros intermediarios conllevando a una compleja red de interacciones que resulta en el incremento de diferentes mediadores, fenómeno conocido como “tormenta de citocinas” que se ha relacionado con el desarrollo de la enfermedad<sup>29,36,58</sup>.

### 3.6 Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ )

La IL-1 $\beta$  es producida principalmente por células del sistema inmune como monocitos, macrófagos y células dendríticas en respuesta a la señalización mediada por TLR, a otras citocinas o debido a un “loop” de retroalimentación positivo. Se produce como un precursor inactivo de 31 kDa que requiere un corte mediado principalmente por caspasa 1, que a su vez se activa por un complejo multiproteico conocido como inflammasoma; posterior a este evento, IL-1 $\beta$  se secreta rápidamente de la célula<sup>59</sup>. Se han descrito diferentes mecanismos de secreción de la forma activa de IL-1 $\beta$  como la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, lisosomas secretores, microvesículas y exosomas<sup>60</sup>.

Esta citocina presenta diversas funciones entre las que destacan: regulación en la expresión de otras citocinas, proteínas de fase aguda y enzimas encargadas de la remodelación de tejidos; infiltración de leucocitos hacia el sitio de daño; activación de linfocitos además de actuar como un potente pirógeno<sup>59</sup>. IL-1 $\beta$  juega un papel importante durante la defensa frente a patógenos debido a que tiene la capacidad de activar a neutrófilos y macrófagos que fagocitan y eliminan al patógeno a través de la producción de radicales de oxígeno y nitrógeno así como otras proteínas efectoras; además, al unirse a su receptor desencadena una cascada de señalización que conlleva a la expresión y producción de otras citocinas inflamatorias como TNF e IL-6 y la polarización de las células T hacia un fenotipo Th17<sup>61</sup>.

La regulación génica ocurre principalmente a través de vías que involucran proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), cinasas MAPKK (MKK/MAP2Ks), cinasas MAPKKK (MKKK/MAP3K/MEKKs) así como las proteínas que se encuentran río abajo que en conjunto permiten la activación de factores de transcripción involucrados en la expresión de diferentes genes relacionados principalmente en la defensa del huésped<sup>62</sup>. La unión de IL-1 $\beta$  a su receptor (IL-1RI) promueve la unión de este con la proteína accesoria (IL-1RAcP); dicho complejo interactúa con la proteína adaptadora Myd88 y conlleva al reclutamiento de diferentes proteínas involucradas en diferentes vías de señalización<sup>63</sup> como se mencionó anteriormente.



**Figura 5.** Vías de señalización activadas por IL-1β. La unión de IL-1β desencadena la activación de diferentes vías de señalización involucradas principalmente en procesos como la defensa del huésped, ciclo celular, apoptosis, entre otros.

Tomado de Acuner-Ozbabacan *et al.*, 2014.

Hablando particularmente de Dengue, se ha observado que la activación de caspasa 4 en respuesta a la infección conlleva a la activación de caspasa 1 y en consecuencia a la producción de IL-1β sin la necesidad de señales secundarias que estimulen el ensamblaje del inflamasoma<sup>64</sup>. Otro estudio mostró que las plaquetas de pacientes infectados con virus Dengue expresan y producen IL-1β<sup>65</sup>. Por otra parte, IL-1β se ha asociado con formas severas de Dengue ya que se encontraron niveles elevados de esta citocina a nivel de RNA y proteína en pacientes con Dengue Grave; además se observó que en conjunto con TNF e IFN-γ incrementa la permeabilidad vascular, proceso relacionado con la patogénesis de la enfermedad<sup>66</sup>.

### 3.7 Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ )

El TGF- $\beta$  pertenece a la superfamilia del mismo nombre, la cual está constituida por proteínas como Activina, Nodal, BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), entre otras<sup>67</sup>. El TGF- $\beta$ , en mamíferos, presenta tres isoformas que sólo se diferencian en ciertos aminoácidos, sin embargo, actúan a través del mismo receptor. El TGF- $\beta$ 1 es la isoforma más abundante en la mayoría de los tejidos<sup>68</sup>.

TGF- $\beta$  se sintetiza como un polipéptido precursor compuesto por 3 segmentos: un péptido de señalización que se elimina cuando la proteína se transloca al lumen del retículo endoplásmico rugoso; una región N-terminal denominada péptido asociado a latencia (LAP por sus siglas en inglés), que se elimina mediante proteólisis para la activación de TGF- $\beta$  y una región carboxilo-terminal que representa la forma activa de la proteína<sup>69</sup>.

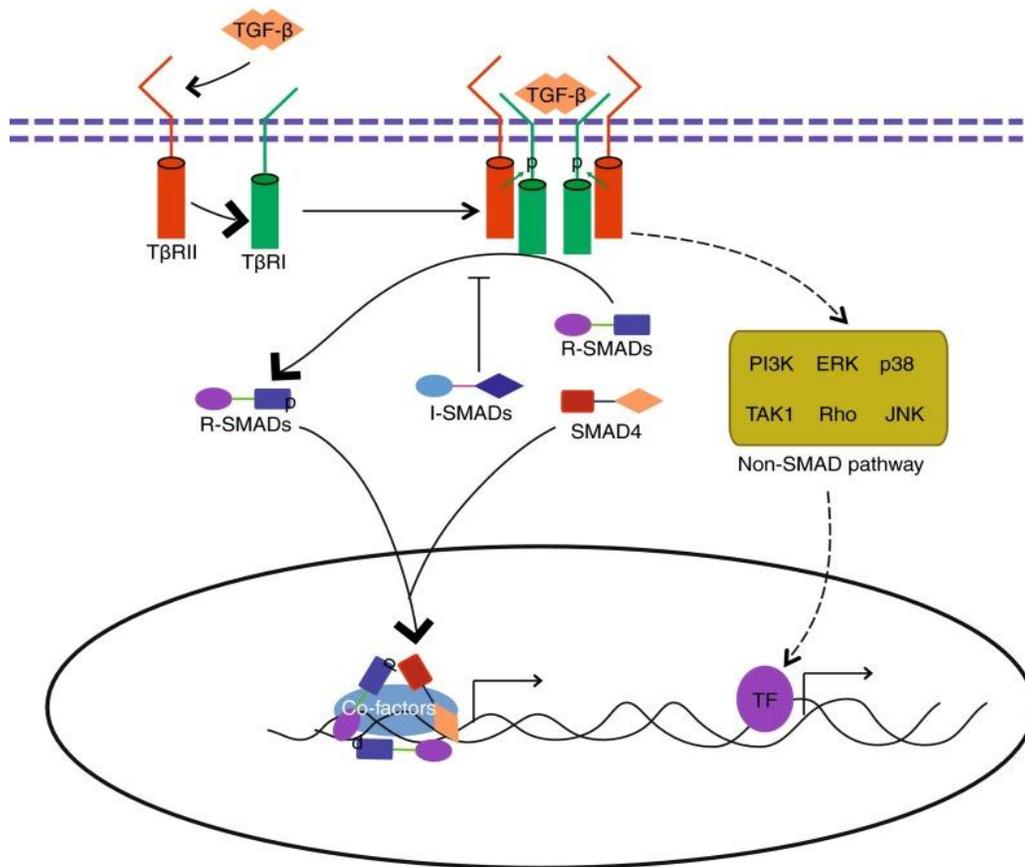
Esta proteína participa en diferentes procesos como son proliferación, diferenciación, muerte, migración y, principalmente, regulación de la respuesta inmune<sup>68,70</sup>, debido a que se ha observado que ratones que carecen de TGF- $\beta$ 1 mueren a temprana edad por una inflamación sistémica<sup>71</sup>.

Por otro lado, las proteínas Smad son mediadores importantes en la señalización por TGF- $\beta$ . En humanos se conocen ocho proteínas (Smad 1-8), sin embargo, sólo las proteínas Smad 2, 3, 4, 6 y 7 son activadas por éste<sup>72</sup>. A su vez, estas proteínas se clasifican en tres categorías: activadas por receptor (R-Smads), mediador común (Co-Smad) e inhibidoras (I-Smads). Las R-Smads engloban a Smad 2 y 3; Smad 4 es la única proteína que funciona como mediador común y Smad 6 y 7 son las proteínas inhibidoras<sup>73</sup>. Las proteínas Smad contienen aproximadamente 500 aminoácidos y están formadas por dos dominios globulares unidos por una región "linker". El dominio N-terminal o MH1 está conservado en todas las R-Smads y en Smad4; las I-Smads carecen de este dominio. El dominio C-terminal o MH2 está presente en todas las Smads. La región "linker" es flexible y contiene diferentes sitios de unión para la ubiquitin ligasa Smurf, sitios de fosforilación y en el caso de Smad4, una señal de exportación nuclear (NES)<sup>74</sup>.

La unión de TGF- $\beta$  al receptor tipo II permite el reclutamiento y la fosforilación del receptor tipo I; dicho complejo fosforila y activa a las proteínas R-Smad que se unen a la Smad común (Smad4) formando un complejo que es capaz de translocarse al núcleo y dirigir la expresión de diferentes genes como Smad 6 y 7<sup>69</sup>. Smad 7 actúa como un regulador negativo de la

señalización por TGF- $\beta$  al unirse al receptor de TGF- $\beta$  tipo I inhibiendo el reclutamiento y la fosforilación de las R-Smads y promoviendo el reclutamiento de ubiquitin ligasas que participan en la degradación del receptor<sup>75</sup>.

TGF- $\beta$  activa otras vías de señalización como ERK, JNK y p38 que participan en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), uno de los principales efectos de TGF- $\beta$ . Además promueve la activación de la vía de Rho permitiendo la regulación de procesos como organización del citoesqueleto y movilidad celular. Por otra parte, es capaz de activar la vía PI3K promoviendo la reorganización de los filamentos de actina, migración celular así como evasión de la apoptosis<sup>76,77</sup>.



**Figura 6.** Señalización mediada por TGF- $\beta$ . La unión de TGF- $\beta$  al receptor tipo II permite el reclutamiento y la fosforilación del receptor tipo I; dicho complejo fosforila y activa a las proteínas R-Smad que se unen a la Smad común (Smad4) formando un complejo que es capaz de translocarse al núcleo y dirigir la expresión de diferentes genes. TGF- $\beta$  es capaz de inducir otras vías de señalización como PI3K, p38 y MAPK.

Tomado de Zhang *et al.*, 2014.

TGF- $\beta$  es capaz de actuar como una citocina inflamatoria o anti-inflamatoria dependiendo de su concentración. Se ha observado que puede inducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias para el control de infecciones; sin embargo, también disminuye la producción de radicales libres e inhibe la función de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 a la vez que induce la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10<sup>38</sup>. En este contexto, algunos estudios han mostrado que las proteínas Smad6/7 que se producen en respuesta a la señalización de TGF- $\beta$  son capaces de unirse a la proteína adaptadora Pellino-1, interrumpiendo el complejo de señalización IRAK4-IRAK1-Pellino-1-TRAF6 y por lo tanto reduciendo la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. De esta manera, TGF- $\beta$  regula de manera negativa a IL-1 $\beta$ , ya que se impide la señalización del IL-1R<sup>78</sup>.

Por otra parte, se ha visto que TGF- $\beta$  en conjunto con IL-6 promueven la diferenciación de células Th17 al permitir que células T vírgenes sean más susceptibles a señales como IL-21 que a su vez permite la expresión del receptor de IL-23 (IL-23R). De esta forma, IL-21, IL-23 y TGF- $\beta$  inducen la producción de IL-17 y de otras citocinas para completar el desarrollo de las células Th17<sup>79</sup>.

Además, TGF- $\beta$  permite la diferenciación de células T reguladoras (Treg) mediante la inducción de Foxp3 que en conjunto con IL-2 aumenta la expresión de marcadores como CTLA4 que al interactuar con moléculas co-estimuladoras como CD80/86 interfiere con la activación y proliferación de células T efectoras, CD25 que les permite competir con otras células por las fuentes de IL-2 y la secreción de citocinas como IL-10 que suprime la respuesta de las células T al interferir con la expresión de IL-2, IFN- $\gamma$  y GM-CSF<sup>80,81</sup>.

#### 4. ANTECEDENTES

En la infección por Dengue, los niveles de TGF- $\beta$  en pacientes se han correlacionado con la severidad de la enfermedad<sup>38, 82</sup>. Dos estudios han demostrado que la concentración de TGF- $\beta$ 1 es menor en pacientes con fiebre Dengue; además, se observó un aumento gradual conforme a la evolución de la enfermedad en pacientes con formas severas de Dengue<sup>38,82</sup>. Por otra parte, en un estudio donde midieron las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 en suero se observó un aumento en los niveles de esta citocina indistintamente del grado de la enfermedad comparado con el grupo control<sup>83</sup>. Uno de los pocos estudios a nivel *in vitro* que sugiere la participación de TGF- $\beta$  en Dengue mostró que el knock-down de Smad7 redujo en un 40% la infección por el virus Dengue en células Huh7 (línea celular de hepatoma humano)<sup>84</sup>.

Resultados de nuestro grupo de investigación mostraron que los macrófagos infectados con el virus Dengue secretan niveles elevados de citocinas como TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  durante las primeras 48 horas post-infección. Sin embargo, después de 72 horas post-infección, los macrófagos muestran una disminución considerable de estas citocinas, principalmente TNF e IL-1 $\beta$  así como un aumento en la secreción de TGF- $\beta$ <sup>85</sup>.

## **5. JUSTIFICACIÓN.**

Actualmente no se comprende la razón por la que ciertos pacientes desarrollan manifestaciones severas durante la infección por Dengue. La falta de un modelo animal inmunocompetente que reproduzca el cuadro humano, ha dificultado comprender la participación de la respuesta inmune en este contexto.

Existe evidencia firme que la respuesta inmune tiene un papel importante tanto para el control de la infección, como en la patología de la enfermedad, hablándose incluso de un estado de “tormenta de citocinas”, en el que la producción excesiva de diversos mediadores se asocian al daño del endotelio y la pérdida de plasma vascular.

En este sentido, entender el papel que tiene una citocina reguladora de la respuesta inmune, como es el TGF- $\beta$ 1, permitirá una mejor comprensión del desarrollo de la enfermedad contribuyendo de esta forma al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento.

## **6. HIPÓTESIS.**

TGF- $\beta$ 1 inhibirá la producción y expresión de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados con el virus Dengue.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo General**

- Determinar el efecto de TGF- $\beta$ 1 en la producción y expresión de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados por el virus Dengue.

### **7.2 Objetivos Particulares**

- Evaluar el efecto del tratamiento de TGF- $\beta$ 1 pre y post-infección sobre la expresión y secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos.
- Evaluar el efecto de un inhibidor de TGF- $\beta$ 1 sobre la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados.
- Establecer el efecto de TGF- $\beta$ 1 y la infección con el virus Dengue sobre las proteínas Smad2, 3 y 7.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **8.1 Cultivo Celular y virus**

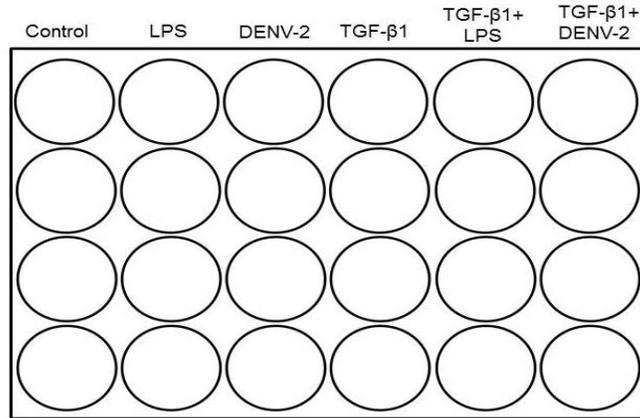
Se cultivó la línea celular monocítica humana THP-1(ATCC® TIB-202™) en medio RPMI-1640 Advanced (Gibco) con 3% de SFB (Suero Fetal Bovino) y 2 mM de glutamina. Las células se conservaron a 37°C en ambiente humidificado y con 5% de CO<sub>2</sub>. Para su diferenciación, las células se trataron con 10 nM de PMA (Sigma-Aldrich) durante 72 horas<sup>86-88</sup>, en las mismas condiciones descritas.

Para las infecciones se utilizó el virus Dengue serotipo 2 (DENV-2) cepa Nueva Guinea, crecido en cerebro de ratón neonato. Este virus fue donado por el Dr. Celso Ramos García del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (CISEI-INSP).

### **8.2 Ensayo para determinar el efecto del pre-tratamiento con TGF-β1 en macrófagos infectados con el virus Dengue**

Las células THP1, diferenciadas in vitro por 72 horas, se lavaron con PBS pH 7.4; se colocaron en medio de cultivo sin suero y se incubaron durante 2 horas (período de ayuno); posteriormente, se agregó TGF-β1 (Human TGF-β1, PeproTech) a una concentración final de 20 ng/ml durante 3 horas<sup>89</sup> en los pozos correspondientes. Al término de este tiempo, se retiró el medio y se repitió el lavado; se colocó PBS Dulbecco's en todos los pozos y se agregó el virus Dengue (MOI=1) en los pozos correspondientes.

Las células se dejaron incubando durante 2 horas y posteriormente se retiró el sobrenadante, se hizo un lavado con PBS y se adicionó medio de cultivo nuevo en todos los pozos. Se realizó el estímulo con LPS (E. Coli 011:B4, SIGMA) a una concentración final de 10 ng/ml en los pozos correspondientes. En la siguiente imagen se indican los tratamientos realizados.

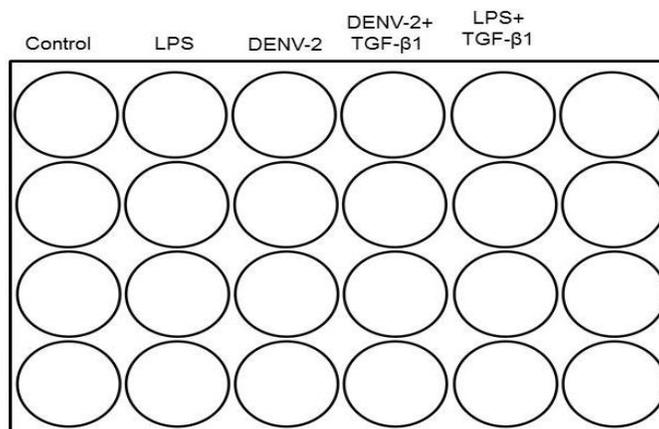


**Figura 7.** Tratamientos realizados en el ensayo pre-infección. Se formaron 6 grupos diferentes: Control (células sin tratamiento), estímulo con LPS, DENV-2 (infectadas), estímulo con TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1+LPS (estimuladas con TGF- $\beta$ 1 durante 3 horas y posteriormente estimuladas con LPS) y TGF- $\beta$ 1+DENV-2 (estimuladas con TGF- $\beta$ 1 durante 3 horas y posteriormente infectadas).

Después de 24 horas se recolectaron los sobrenadantes en tubos eppendorf y se centrifugaron a 575.1-xg (Spectrafuge™ 24D, Labnet) durante 10 minutos. Posteriormente, los sobrenadantes se recuperaron en tubos nuevos y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las células se lavaron 2 veces con PBS, se agregó 0.25 ml de TRI Reagent® en cada pozo; los lisados se recuperaron en tubos eppendorf y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

### **8.3 Ensayo para determinar el efecto del post-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 en macrófagos infectados con el virus Dengue**

A las células THP-1 diferenciadas se les retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con PBS Dulbecco's; se colocó este mismo reactivo en todos los pozos y se agregó el virus Dengue (MOI=1) en los pozos correspondientes. Se dejó incubando durante 2 horas. Después se retiró el sobrenadante, se hizo un lavado con PBS y se adicionó medio de cultivo fresco en todos los casos. Por último se realizó el estímulo con LPS a una concentración final de 10 ng/ml y con TGF- $\beta$ 1 a una concentración final de 20 ng/ml en los pozos correspondientes. A continuación se indican los tratamientos realizados.



**Figura 8.** Tratamientos realizados en el ensayo post-infección. Se formaron 5 grupos diferentes: Control (células sin tratamiento), estímulo con LPS, DENV-2 (infectadas), DENV-2+TGF-β1 (células infectadas y posteriormente estimuladas con TGF-β1) y LPS+TGF-β1 (estimuladas con LPS y TGF-β1 al mismo tiempo).

Después de 24 horas, se recolectaron los sobrenadantes y las células se almacenaron en TRI Reagent®, como fue descrito en el ensayo pre-infección.

#### 8.4 Ensayo para establecer el efecto del inhibidor de la señalización por TGF-β

Después de la diferenciación de las células THP-1, se retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con PBS; se colocó medio de cultivo sin suero y se agregó el inhibidor SB 505124 (inhibidor selectivo de TGF-βRI, TOCRIS) a una concentración final de 1 μM<sup>90,91</sup>; se dejó incubando durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se agregó TGF-β1 a una concentración final de 20 ng/ml durante 3 horas en todos los pozos.

Al término de este período, se retiró el medio y se repitió el lavado; se colocó PBS Dulbecco's en todos los pozos y se agregó el virus Dengue (MOI=1) en el pozo correspondiente. Se dejó incubando durante 2 horas y posteriormente se retiró el sobrenadante, se hizo un lavado con PBS y se adicionó medio de cultivo nuevo en todos los pozos. Se realizó el estímulo con LPS (E. Coli 011:B4, SIGMA) a una concentración final de 10 ng/ml en el pozo correspondiente.

## **8.5 Detección de la infección por Dengue mediante Microscopía de Fluorescencia**

Se realizó el mismo ensayo pre-infección descrito anteriormente pero en este caso las células se diferenciaron sobre cubreobjetos; se agregó una solución de Metanol: Acetona (50-50) fría durante 20 minutos. Posteriormente, se retiró esta solución y las células se almacenaron hasta su uso.

Para el ensayo de Microscopía, las células se hidrataron con 500 µl de agua destilada realizando dos cambios cada cinco minutos. Después se lavaron con PBS 2 veces (lavados rápidos). En cada pozo se colocaron 300 µl de una solución de BSA 1% (SIGMA-ALDRICH)-IgG humana (SIGMA) 0.01% en PBS y se dejó incubando durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se hicieron dos lavados con PBS cada cinco minutos y tres lavados rápidos adicionales. Se agregaron 300 µl del anticuerpo α-Dengue (Abcam, ab155042) diluido 1:20 en una solución de BSA 0.1%-PBS/Tween 0.05% y se dejó incubando durante 2 horas. Se repitieron los lavados descritos anteriormente.

Se agregó el anticuerpo secundario AlexaFluor 488 (Jackson Immunology) diluido 1:200 en PBS y se incubó durante 2 horas en la oscuridad. Se repitieron los primeros 3 lavados y se incubó con 300 µl de DAPI durante dos minutos. Se hicieron 3 lavados rápidos con PBS. Por último, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con una solución de Glicerol-PBS 50% y se visualizaron en el microscopio de Fluorescencia (Nikon ECLIPSE E400) con el filtro FITC (488 nm excitación, 520 nm emisión) y DAPI (350 nm excitación, 461 nm emisión); las imágenes se analizaron mediante el programa ND2.

## **8.6 Detección de la infección por RT-PCR**

Para determinar la infectividad del virus Dengue, se pusieron a diferenciar  $4 \times 10^6$  células THP-1 en dos botellas de cultivo T25 durante 72 horas y una de ellas se infectó durante 24 horas (la otra se dejó como control negativo a la infección); posteriormente, se retiró el sobrenadante, se hicieron dos lavados con PBS y se agregó 1 ml de Trizol (TRI Reagent®, Sigma-Aldrich). Se hizo la extracción de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras se vortexearon y se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente para disociar los complejos núcleo-proteína. A continuación se agregaron 200 µl de cloroformo, se vortexearon vigorosamente durante 15 segundos y se dejaron 4 minutos a

temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 13362.3 xg (Eppendorf® Microcentrifuge 5415R) durante 15 minutos a 4°C.

Transcurrido este tiempo, se transfirió la fase acuosa (ARN) a un tubo nuevo, se adicionaron 500 µl de isopropanol frío y se dejó durante 15 minutos a -20°C; después, las muestras se centrifugaron a 13362.3 xg durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol al 75% y se vortexearon ligeramente; se centrifugaron a 7,500 rpm durante 5 minutos. Se descartó nuevamente el sobrenadante y los pellets se dejaron secando. Finalmente, los pellets se resuspendieron en agua libre de nucleasas (Thermo Scientific) y se incubaron a 55-60°C durante 10 minutos. Se realizó la cuantificación del ARN mediante el programa Take3™ (BioTek systems) y se verificó la integridad del ARN en un gel de agarosa al 1.5%.

Posteriormente se realizó la síntesis del cDNA utilizando un kit (Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit), a continuación se indican los reactivos y las cantidades necesarias para la mezcla de reacción.

Reactivo	Cantidad (µl)
Buffer de reacción	4
Inhibidor de RNasa RiboLock	1
dNTP's 10 mM	2
Enzima transcriptasa reversa (RevertAid M-MULV)	1
Hexámeros (random primers)	1

Tabla 1. Reactivos y cantidades requeridas para la síntesis de cDNA.

Se colocaron 1.5 µg de cada ARN en los tubos correspondientes que contenían la mezcla de reacción y se sometieron a las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
65	5
25	10
42	60
70	10

Tabla 2. Condiciones utilizadas para la síntesis de cDNA.

Transcurrido el tiempo, se cuantificó el cDNA utilizando el programa Take3™ (BioTek systems) y se ajustó el volumen a 500 ng/μl para la primera reacción de PCR. Los productos de amplificación resultantes se diluyeron 1:100 en agua libre de nucleasas y se sometieron a una segunda etapa de amplificación utilizando las mismas condiciones de amplificación (PCR anidado). En las siguientes tablas se indican las secuencias de los oligonucleótidos que fueron proporcionados por el grupo del Dr. Humberto Lanz Mendoza del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) campus Cuernavaca así como los reactivos y las condiciones de ciclado.

Nombre	Secuencia
DENV ALL RV	5' CCCCATCTATTCAGAATCCCTGC 3'
DENV ALL F	5' CAATATGCTGAAACGAGAGAGAA 3'
DENV 2RV	5' TGCTGTTGGTGGGATTGTTA 3'

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para determinar infección por Dengue serotipo 2 mediante RT-PCR.

\*Durante la primera amplificación se usaron los oligonucleótidos DENV ALL RV y DENV ALL F; para la segunda amplificación se utilizaron los oligonucleótidos DENV 2RV y DENV ALL F.

Reactivos	Cantidad (μl)
Master Mix (Thermo Fisher Scientific)	5
Oligonucleótidos	0.5 c/u
cDNA	4

Tabla 4. Reactivos y cantidades necesarias para la amplificación.

Temperatura (°C)	Tiempo
94	5 minutos
95	20 segundos
60	30 segundos
72	1 minuto
72	5 minutos
4	∞

} 35 ciclos

Tabla 5. Condiciones de amplificación para detectar infección por virus Dengue serotipo 2.

Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 2%.

### 8.7 Detección por RT-PCR de la expresión de IL-1 $\beta$ en macrófagos infectados con virus Dengue

El procesamiento de las células recuperadas con Trizol de los ensayos pre, post-infección y con el inhibidor se realizó de la forma que se describe en el apartado anterior. Para cada caso, se hicieron diluciones 1:100 del cDNA en agua libre de nucleasas y se utilizaron los siguientes oligonucleótidos, reactivos y condiciones de amplificación:

Nombre	Sentido	Anti-sentido
IL-1 $\beta$	5' GTCATTCGCTCCCACATTCT 3'	5' CTTCTTGCCCCCTTTGAAT 3'
$\beta$ -actina	5' GCTCCGGCATGTGCAA 3'	5' AGGATCTTCATGAGGTAGT 3'

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación.

Reactivo	Cantidad ( $\mu$ l)
Master Mix	5
Oligonucleótidos	0.5 c/u
cDNA	4

Tabla 7. Reactivos y cantidades requeridas para la amplificación.

Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo	
95	2 minutos	} 35 ciclos
95	30 segundos	
57	1 minuto	
72	30 segundos	
72	1 minuto	
4	$\infty$	

Tabla 8. Condiciones de amplificación utilizadas para IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina.

Los productos de la amplificación se verificaron en un gel de agarosa al 1.5%.

## **8.8 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) para cuantificar IL-1 $\beta$ en el sobrenadante de macrófagos infectados con el virus Dengue**

Se utilizó un kit de ELISA específico para IL-1 $\beta$  humana (Human IL-1 $\beta$  ELISA MAX™ Deluxe, Biolegend®). Primero, se diluyó el diluyente A 5X colocando 12 ml de esta solución en 48 ml de PBS (dilución 1:5) y se reconstituyó la proteína estándar IL-1 $\beta$  liofilizada en el mismo vial agregando 200  $\mu$ l del diluyente A 1X, obteniendo una concentración final de 90 ng/ml; se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos, se vortexeó durante unos segundos y se hicieron alícuotas de 25  $\mu$ l que se almacenaron a -70°C.

Se diluyó el buffer de bloqueo A 5X agregando 2.4 ml de este reactivo en 9.6 ml de agua MQ (dilución 1:5); se hizo una dilución 1:200 del anticuerpo de captura (200X) en buffer de bloqueo A 1X. En una placa de 96 pozos, se dejó incubando el anticuerpo de captura toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo y se realizaron 4 lavados con 300  $\mu$ l de PBS/Tween 0.05%, eliminando la mayor cantidad de líquido mediante golpes firmes sobre una toalla absorbente; se agregaron 100  $\mu$ l del diluyente A 1X y se incubó durante 1 hora. Durante este tiempo se realizaron las diluciones correspondientes para la proteína estándar así como para las muestras como se indica a continuación:

1) Se diluyeron 10  $\mu$ l de la proteína estándar reconstituida en 90  $\mu$ l de diluyente A 1X; se tomaron 13.9  $\mu$ l de este stock y se diluyeron en 986  $\mu$ l de diluyente A 1X dando una concentración de 125 pg/ml a partir de la cual se realizaron 6 diluciones seriadas 1:1.

2) Para el caso de las muestras, se diluyeron 1:1 en diluyente A 1X.

Cabe mencionar que en cada pozo se colocaron 50  $\mu$ l del buffer de ensayo D como se indica en el protocolo del kit.

Transcurrido el tiempo, se retiró el diluyente A 1X de la placa y se repitieron los lavados; se colocaron las diluciones de la proteína estándar en orden descendente por duplicado y las muestras diluidas de igual manera, por duplicado. Se dejaron incubando durante 2 horas, 5 minutos antes de terminar esta incubación, se preparó el anticuerpo de detección haciendo una dilución 1:200 en diluyente A 1X.

Posteriormente, se retiraron las diluciones y se hicieron nuevamente los lavados; se agregaron 100  $\mu$ l del anticuerpo de detección a cada pozo y se dejó incubando por 1 hora. Después se retiró el anticuerpo y se repitieron los lavados. Se agregaron 100  $\mu$ l de la avidina-

HRP previamente preparada (se hizo una dilución 1:1000 en diluyente A 1X) y se dejó incubando durante 30 minutos. Transcurrido este período, se hicieron los mismos lavados pero en esta ocasión adicionando un lavado más y permitiendo que los lavados duraran 30 segundos aproximadamente; se agregaron 100 µl de la solución substrato F proporcionada por el fabricante y se dejó incubando durante 30 minutos más en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 100 µl de la solución de paro ( $H_2SO_4$  2N) y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Epoch, BioTek).

### **8.9 Efecto de la infección por el virus Dengue sobre las proteínas Smad 2,3 y 7**

Para evaluar el efecto de la infección por el virus Dengue sobre las proteínas Smad 2, 3 y 7, se hicieron grupos con diferentes tratamientos, como se indica a continuación:

Grupo 1: Control

Grupo 2: DENV-2

Grupo 3: TGF-β1

Grupo 4: DENV-2 + TGF-β1

Se colocaron  $4 \times 10^6$  células en 5 ml de medio RPMI en frascos de cultivo y se diferenciaron a macrófagos como se describió anteriormente. Posteriormente se hizo la infección en los grupos correspondientes (2 y 4), incubando el virus a una  $MOI=1$  durante 2 horas; para el caso de los grupos 1 y 3 se colocó únicamente PBS. Transcurrido este tiempo, se retiró el virus al igual que el PBS y se hicieron dos lavados con PBS pH 7.4; se colocó medio de cultivo sin suero (período de ayuno) y se dejaron incubando durante 4 horas más (tiempo post-infección: 6 horas). Para el caso de los grupos 3 y 4 se agregó TGF-β1 en concentración final de 10 ng/ml durante 30 minutos más. Las células se lisaron con buffer frío que contenía 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 0.25% deoxicolato de sodio, 1mM EGTA y 1mM PMSF suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas.

Se incubaron durante 15 minutos en agitación continua en frío; transcurrido este período, las células se despegaron con una espátula y el contenido se transfirió a tubos eppendorf. Se centrifugó a 15549.9-xg (Spectrafuge™ 24D, Labnet) durante 10 minutos y el sobrenadante se almacenó a  $-20^\circ C$  en tubos nuevos hasta su posterior uso.

Se determinó la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford<sup>92</sup>. Se mezclaron 42 µg de proteína total con buffer de muestra 4X y se calentaron a 100 °C durante 5 minutos. Las muestras y el marcador de peso molecular se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% y se corrieron en buffer de corrida (25mM Tris, 190mM glicina, 0,1% SDS pH 8.3) a 35 mA constantes por aproximadamente 40 minutos. Transcurrido el tiempo, se hizo la transferencia a una membrana PVDF en buffer de transferencia (200 mM Glicina, 25 mM Tris y 20% MeOH) a 200 V, 500 mA constantes durante 1 hora.

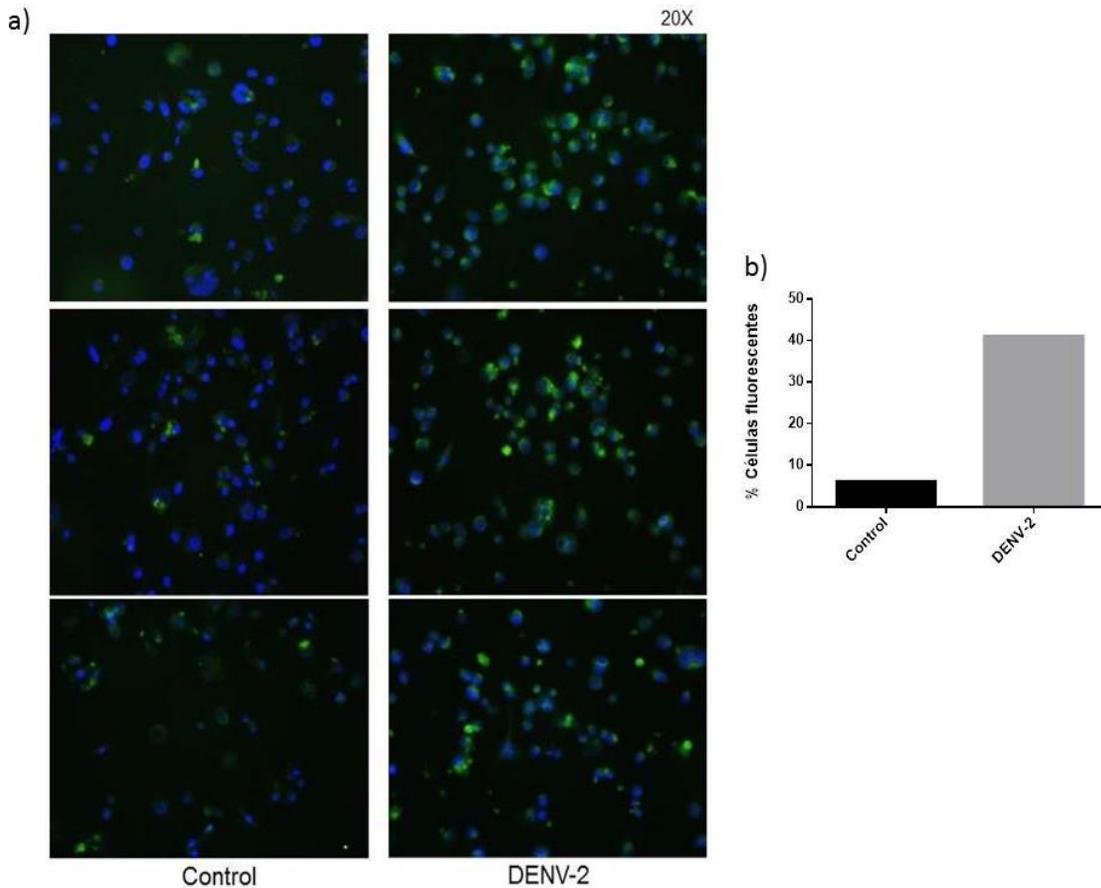
Se verificó la transferencia mediante tinción por Rojo Ponceau; posteriormente, la membrana se bloqueó con leche al 5% en PBS/ 0.05% Tween 20® durante 2 horas en agitación continua, se hicieron dos lavados con TBS/0.07% Tween 20® cada 10 minutos y se incubó con α-p-Smad2/3 (#L0314, Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:4000 (diluido en TBS/0.07% Tween 20®+1% BSA) toda la noche. Al día siguiente, se realizaron nuevamente los lavados y se incubó con el anticuerpo secundario α-conejo en dilución 1:1500 (diluido en leche al 5% en TBS/0.07%Tween 20®) durante 2 horas. Se repitieron los lavados y la detección de las proteínas se hizo mediante el método de quimioluminiscencia (Western Lightning™ Plus-ECL) realizando una mezcla de 500 µl de reactivo oxidante y 500 µl de reactivo luminol; la membrana se incubó con la mezcla durante un minuto y se reveló, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La misma membrana se incubó con solución stripping (7 M Guanidina-HCl, 0.1 M KCl, 0.05 M Glicina, 0.5 M EDTA, 0.14% β-mercaptoetanol) durante 10 minutos y se hicieron múltiples lavados con agua MQ para eliminar el exceso de la solución. La membrana se bloqueó con leche al 5% en PBS/ 0.05% Tween 20® durante 2 horas; transcurrido el tiempo se repitieron los lavados como se ha describe anteriormente. La membrana se incubó con α-Smad2/3 (#G2916, Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:1000 (diluido en leche 5%/PBS/0.05% Tween 20®) durante toda la noche; al siguiente día, se hicieron los lavados y se incubó con el anticuerpo secundario α-ratón en dilución 1:1000 (diluido en leche 5%/PBS/0.05% Tween 20®) durante 2 horas. Posteriormente, se realizaron nuevamente los lavados y la membrana se reveló como se describe anteriormente. Se realizó el mismo procedimiento, pero incubando en esta ocasión con α-actina (#K1814, Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:1000 y utilizando el anticuerpo secundario α-cabra en dilución 1:5000 (ambos diluidos en leche al 5% /PBS/0.05% Tween 20 ®).

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Detección de la infección en macrófagos infectados por virus Dengue

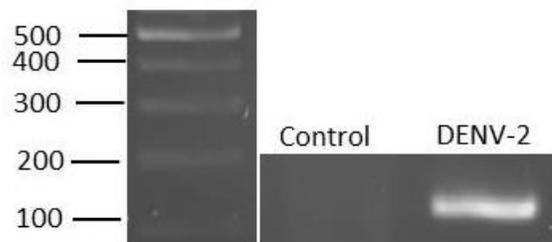
Para determinar la infección por el virus Dengue serotipo 2 se utilizaron dos estrategias experimentales diferentes: Microscopía de Fluorescencia y RT-PCR. En el primer caso, se utilizó un anticuerpo dirigido contra la proteína E del virus y como se observa en la figura 9, las células infectadas presentaron una mayor intensidad de fluorescencia en comparación con las células no infectadas (Control); el análisis de las imágenes reveló que un 40% de las células fueron positivas para Dengue a las 24 horas.



**Figura 9.** Detección de la infección por Dengue mediante Microscopía de Fluorescencia. a) Imágenes de 3 campos diferentes para cada grupo: Control (células sin infectar) y DENV-2 (células infectadas); los núcleos se tiñeron con DAPI (color azul) y la tinción en color verde indica la proteína E del virus Dengue.

b) Porcentaje de células infectadas respecto al conteo total. Se hizo un conteo total de células ( $n=200$ ) en cada campo para cada condición; además se contaron las células teñidas en color verde y se obtuvo el porcentaje de células fluorescentes tanto en los macrófagos control (células sin infectar) como en los macrófagos infectados con el virus Dengue. ( $n=1$ )

Por otra parte, se realizó RT-PCR para detectar infección por el virus Dengue, una vez que se hizo la síntesis de cDNA se procedió a realizar un PCR anidado utilizando 3 oligonucleótidos diferentes; en la primer amplificación se utilizaron los oligonucleótidos DENV ALL RV y DENV ALL F que permiten amplificar la secuencia correspondiente al gen prM del virus mientras que en la segunda etapa, se amplifica un fragmento más pequeño de este mismo gen de aproximadamente 140 pb. Como se observa en la figura 10, en los macrófagos infectados con virus Dengue se detectó una banda correspondiente al tamaño esperado, de igual manera a las 24 horas post-infección.



**Figura 10.** Detección de la infección por RT-PCR. Imagen representativa de la electroforesis de los productos del PCR anidado para detectar infección por el virus Dengue serotipo 2. El producto final es de aproximadamente 100-200 pb. (n=1).

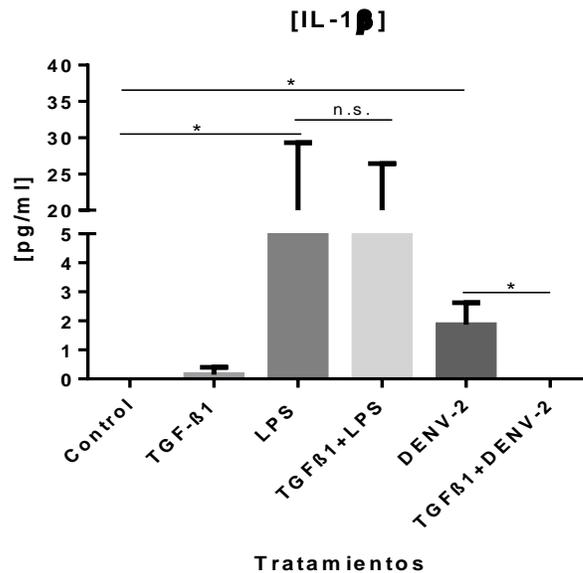
Los resultados de estos experimentos permitieron confirmar que el stock viral utilizado infecta de forma eficiente a los macrófagos, validando de esta forma los resultados de los posteriores ensayos como la cuantificación de IL-1 $\beta$ ; dicha citocina se produce en respuesta a la infección por el virus Dengue y por lo tanto, permite confirmar nuevamente la infección en nuestro modelo.

## **9.2 Efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre la producción de IL-1 $\beta$ en macrófagos infectados con el virus Dengue**

Con el fin de determinar el papel de TGF- $\beta$ 1 durante la infección por el virus Dengue se realizaron tres ensayos diferentes: 1) células THP-1 diferenciadas que fueron pre-tratadas con TGF- $\beta$ 1 durante 3 horas y posteriormente infectadas (ensayo pre-infección), 2) células infectadas y posteriormente estimuladas con TGF- $\beta$ 1 (ensayo post-infección) así como

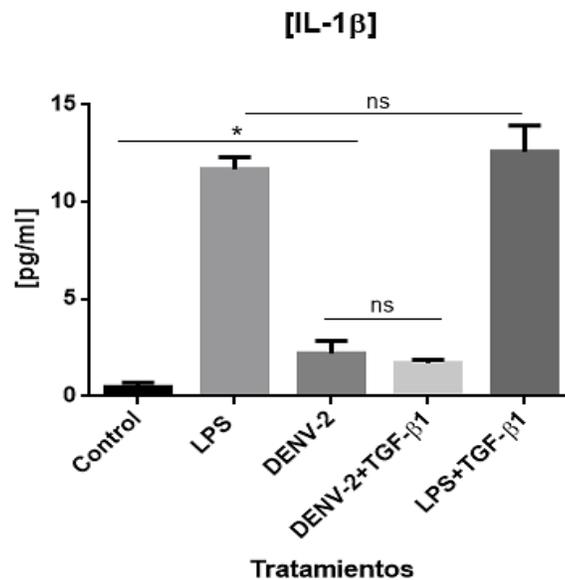
3) células tratadas con un inhibidor de la señalización de TGF- $\beta$ , estimuladas con TGF- $\beta$ 1 durante 3 horas y posteriormente infectadas con el virus Dengue. Los resultados muestran la producción de IL-1 $\beta$  a las 24 horas para todos los casos.

En la figura 11 se muestran los resultados del ensayo pre-infección donde se observa que las células Control no secretaron IL-1 $\beta$ , las células tratadas con TGF- $\beta$ 1 secretaron niveles muy bajos o nulos de IL-1 $\beta$ ; las células estimuladas con LPS (control positivo) secretaron niveles altos de IL-1 $\beta$  en comparación con el grupo Control ( $p=0.0458$ ); por otra parte, las células infectadas con virus Dengue secretaron niveles bajos de IL-1 $\beta$  en comparación con el control positivo, sin embargo, la diferencia fue significativa con respecto al Control ( $p=0.0128$ ). El pre-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 y la posterior estimulación con LPS no mostró cambios en los niveles de IL-1 $\beta$  en comparación con las células tratadas únicamente con LPS ( $p=0.8102$ ). Sin embargo, el pre-tratamiento de TGF- $\beta$ 1 inhibió completamente la producción de IL-1 $\beta$  en respuesta a la infección por el virus Dengue ( $p=0.0128$ ).



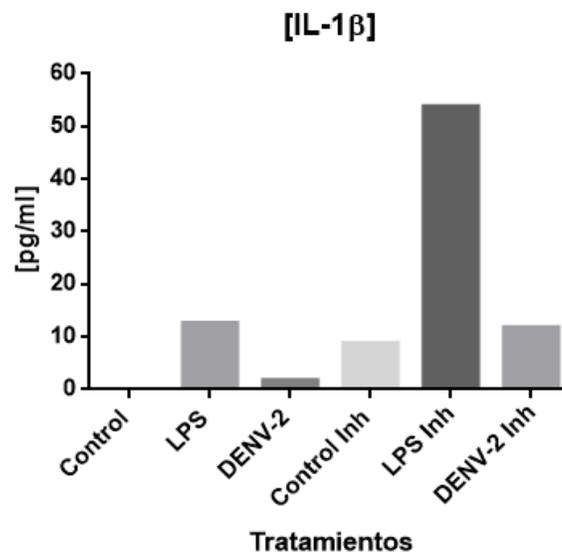
**Figura 11.** Cuantificación de IL-1 $\beta$  (ensayo pre-infección). Células THP-1 diferenciadas durante 72 horas se sometieron a diferentes tratamientos y se determinó la producción de IL-1 $\beta$  a las 24 horas en los sobrenadantes mediante la técnica de ELISA. Los resultados se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 6 utilizando una prueba T no pareada de dos colas. \* $p<0.05$ .

En el ensayo post-infección, como se observa en la figura 12, las células Control secretaron niveles bajos de IL-1 $\beta$ ; las células tratadas con LPS secretaron niveles elevados de IL-1 $\beta$  como en el caso anterior y las células infectadas con virus Dengue secretaron niveles más bajos de IL-1 $\beta$  con respecto a las células estimuladas con LPS, sin embargo, los niveles fueron más elevados con respecto al grupo Control ( $p=0.0334$ ). Para el caso de las células previamente infectadas y posteriormente estimuladas con TGF- $\beta$ 1 no se observaron cambios significativos en la producción de IL-1 $\beta$  con respecto a las células infectadas con Dengue ( $p=0.3272$ ). Además, las células que fueron estimuladas con LPS y TGF- $\beta$ 1 al mismo tiempo tampoco presentaron cambios significativos en la producción de IL-1 $\beta$  con respecto al grupo tratado únicamente con LPS ( $p=0.3787$ ).



**Figura 12.** Cuantificación de IL-1 $\beta$  (ensayo post-infección). Células THP-1 diferenciadas se sometieron a diferentes tratamientos y los niveles de IL-1 $\beta$  se cuantificaron en los sobrenadantes obtenidos a las 24 horas mediante ELISA. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 6 utilizando una prueba T no pareada con corrección de Welch. \* $p<0.05$ .

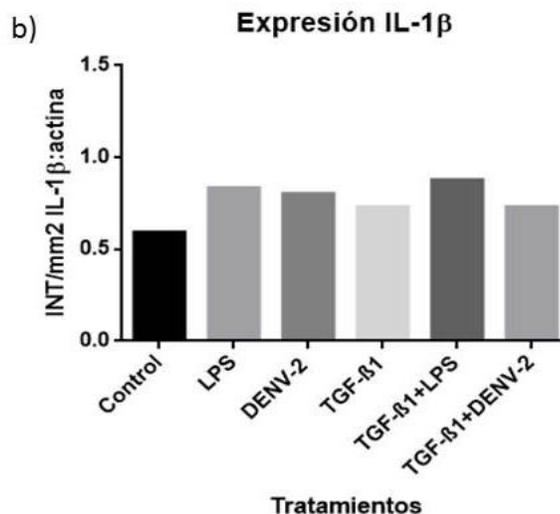
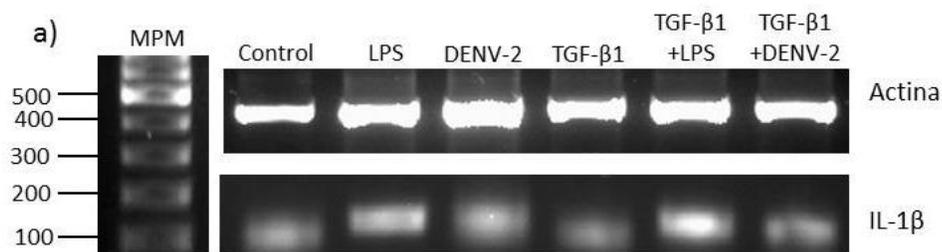
En el tercer ensayo, las células THP-1 diferenciadas se incubaron con el inhibidor de TGF- $\beta$ RI, posteriormente fueron estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y por último se infectaron o se estimularon con LPS. Como se observa en la figura 13, los resultados sugieren que los grupos Control, LPS y DENV-2 que fueron tratados con el inhibidor secretaron niveles más elevados de IL-1 $\beta$  en comparación con los grupos que no recibieron el tratamiento. Cabe mencionar que el aumento en la secreción fue 9 veces más alta para el caso del grupo Control tratado con el inhibidor (Control Inh) comparado con el grupo Control sin inhibidor (Control), 4 veces más elevada en el grupo de macrófagos que recibieron el tratamiento con el inhibidor y que fueron posteriormente estimulados con LPS (LPS Inh) comparado con el grupo que no fue tratado con el inhibidor (LPS) y 7 veces más alta en los macrófagos que fueron tratados con el inhibidor y posteriormente infectados (DENV-2 Inh) en comparación con los macrófagos que sólo fueron infectados (DENV-2).



**Figura 13.** Cuantificación de IL-1 $\beta$  (ensayo con el inhibidor de TGF- $\beta$ RI). Células THP-1 diferenciadas a macrófagos fueron tratadas con el inhibidor SB 505124 durante 2 horas; posteriormente fueron estimuladas con TGF- $\beta$ 1 por 3 horas y por último fueron estimuladas con LPS o infectadas con DENV-2. Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 horas y se determinó la concentración de IL-1 $\beta$  mediante la técnica de ELISA. El análisis de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 6 (n=2).

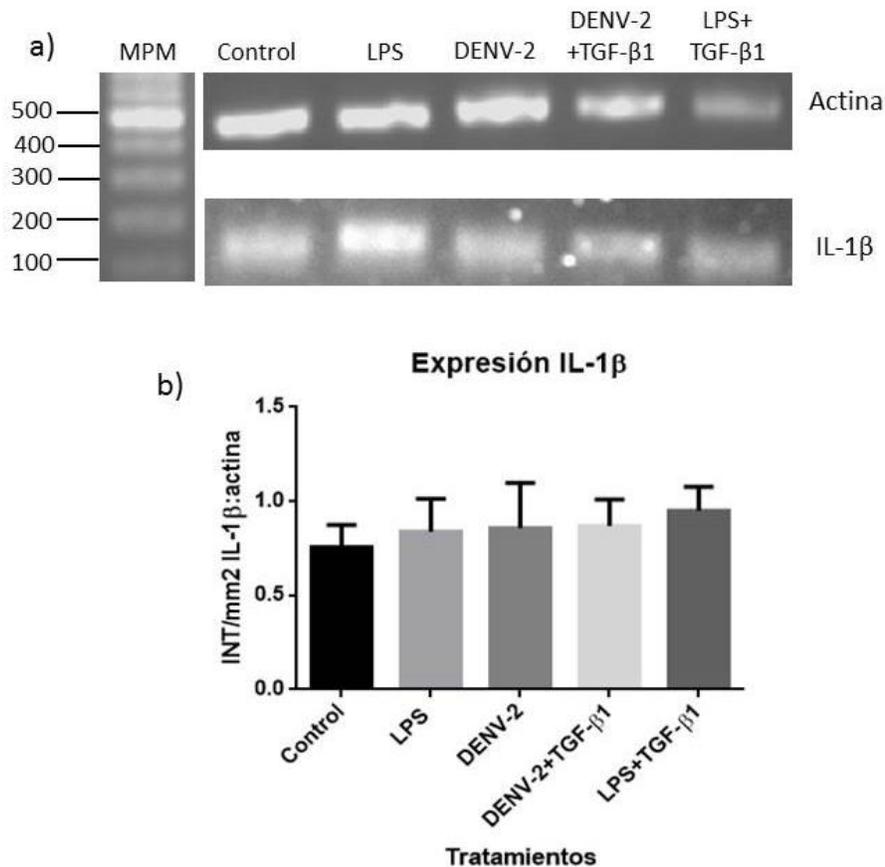
### 9.3 Efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de IL-1 $\beta$ en macrófagos infectados con el virus Dengue

Con el fin de determinar si la expresión de IL-1 $\beta$  se modificaba por los diferentes tratamientos realizados, se procedió a realizar RT-PCR. Para el caso del ensayo pre-infección, en el análisis por densitometría se observó que el tratamiento con LPS y la infección con el virus Dengue parecieron aumentar la expresión de IL-1 $\beta$  con respecto al Control; por otra parte, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 al parecer disminuyó la expresión de IL-1 $\beta$  en comparación con el estímulo con LPS y la infección con Dengue. Además, el pre-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 parece no tener efecto sobre la expresión de IL-1 $\beta$  en respuesta a la infección por el virus Dengue (Figura 14).



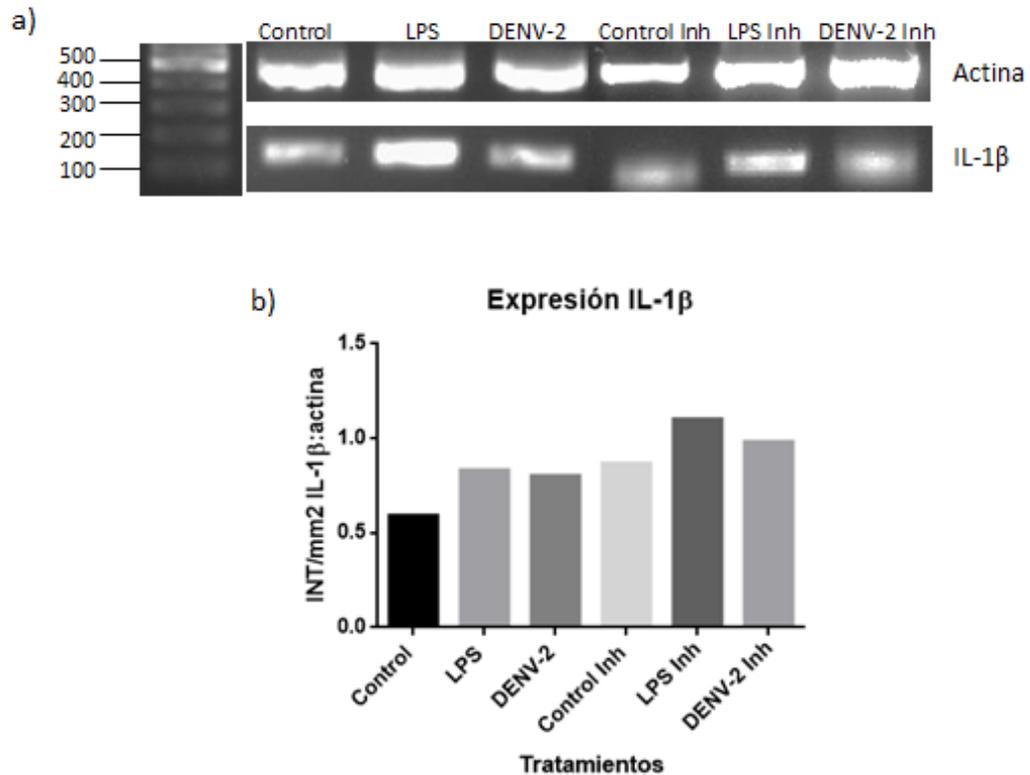
**Figura 14.** RT-PCR para IL-1 $\beta$  (ensayo pre-infección). a) Imagen representativa del PCR para IL-1 $\beta$  (105 pb) de las muestras obtenidas a las 24 horas del ensayo pre-infección. Se utilizó  $\beta$ -actina (542 pb) como control interno. b) Análisis de la intensidad relativa media por mm<sup>2</sup> respecto al control. El análisis de densitometría se realizó mediante el programa Quantity One (BIORAD) y la densidad relativa con el programa GraphPad Prism 6 (n=2).

Por otra parte, como se observa en la figura 15, el análisis por densitometría en el ensayo post-infección parecía indicar un ligero aumento en la expresión de IL-1 $\beta$  en todos los tratamientos en comparación con el control; sin embargo, el análisis estadístico no mostró cambios significativos en la expresión de IL-1 $\beta$  en ninguno de los tratamientos con respecto al control ( $p= 0.8570$ ).



**Figura 15.** RT-PCR para IL-1 $\beta$  (ensayo post-infección). a) Imagen representativa del PCR para IL-1 $\beta$  y actina a partir del cDNA de las muestras del ensayo post-infección que se obtuvieron a las 24 horas. b) Análisis de la intensidad relativa media por mm<sup>2</sup> respecto al control (actina). El análisis de densitometría se realizó mediante el programa Quantity One (BIORAD) y el análisis de la densidad relativa se realizó con el programa GraphPad Prism 6 utilizando una prueba de Dunnet ( $p<0.05$ ).

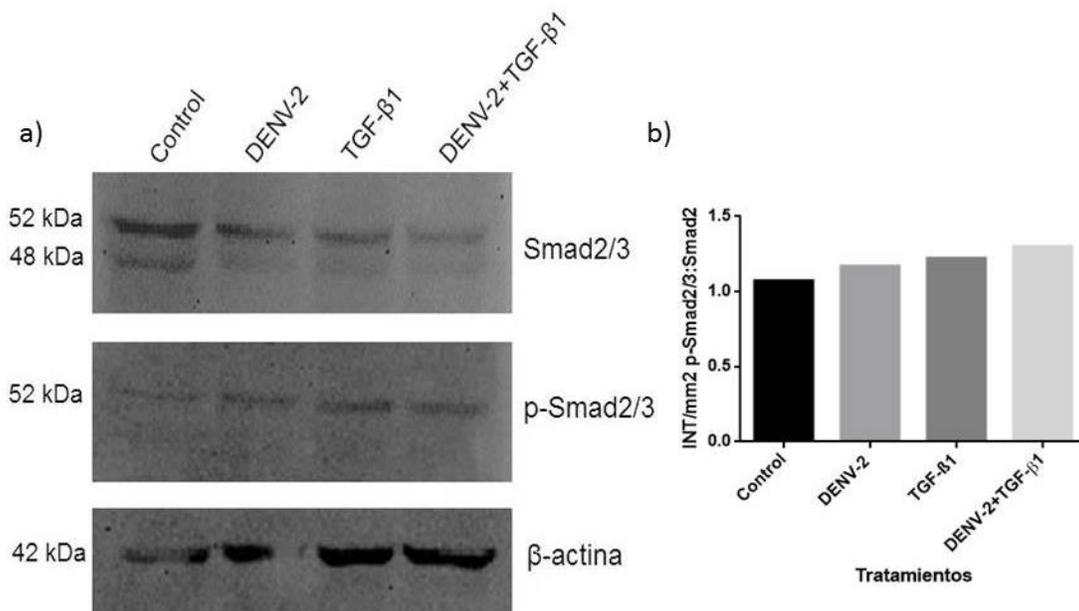
En el tercer caso, los resultados sugieren que los 3 grupos que recibieron el tratamiento con el inhibidor expresaron niveles más elevados de IL-1 $\beta$  en comparación con los grupos que no fueron tratados con el inhibidor. Como se observa en la figura 16, el grupo previamente tratado con el inhibidor y posteriormente estimulado con LPS (LPS Inh) parece ser el que expresó niveles más elevados comparados con los demás grupos.



**Figura 16.** RT-PCR para IL-1 $\beta$  (ensayo con el inhibidor de TGF- $\beta$ RI). a) Imagen representativa del PCR para IL-1 $\beta$  y  $\beta$ -actina de las muestras obtenidas del ensayo con el inhibidor a las 24 horas. b) Análisis de la intensidad relativa media por mm<sup>2</sup> respecto al control (actina). El análisis de densitometría se realizó mediante el programa Quantity One (BIORAD) y la densidad relativa se obtuvo con el programa GraphPad Prism 6 (n=2).

#### 9.4 Efecto de TGF- $\beta$ 1 y la infección por el virus Dengue sobre las proteínas Smad.

Para determinar si la infección por el virus Dengue tenía un efecto sobre las proteínas Smad-mediadores importantes durante la señalización por TGF- $\beta$ -se realizaron diferentes tratamientos: 1) células THP-1 diferenciadas infectadas con DENV-2, 2) células estimuladas con 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1, 3) células infectadas y posteriormente estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y 4) células control (sin ningún tratamiento); se obtuvieron los lisados para detectar la presencia y activación de las proteínas Smad2/3 mediante Western Blot. A simple vista, parecía que los macrófagos infectados con el virus Dengue tenían niveles similares de p-Smad2/3 (forma activada) en comparación con los macrófagos estimulados con TGF- $\beta$ 1 así como a los macrófagos infectados con el virus Dengue y posteriormente estimulados con TGF- $\beta$ 1; sin embargo, el análisis por densitometría sugiere que no hay cambios en ninguno de los tratamientos (Figura 17).



**Figura 17.** Detección de proteínas Smad2/3. Lisados de macrófagos con diferentes tratamientos se analizaron por Western Blot para determinar la presencia y fosforilación de la proteína Smad2/3. La infección por el virus Dengue se hizo durante 6 horas y el estímulo con TGF- $\beta$ 1 por 30 minutos. a) Imagen del western blot donde se observa la presencia y fosforilación de la proteína Smad2/3. b) Intensidad relativa media por mm<sup>2</sup> de p-Smad2/3 con respecto a la proteína basal (Smad2); el análisis de densitometría se realizó mediante el programa Quantity One (BIORAD) y la densidad relativa con el programa GraphPad Prism 6 (n=1).

## 10. DISCUSIÓN

El dengue se ha convertido en una de las enfermedades más comunes e importantes debido a la distribución geográfica, que ha causado una gran tasa de morbilidad y mortalidad en los últimos años<sup>93</sup>. El aumento en la expansión de esta enfermedad se ha atribuido a la circulación de diferentes serotipos (1-4) así como al incremento en el número de cepas virulentas, el comercio global y la expansión de los vectores (*Aedes aegypti* y *A. albopictus*)<sup>94</sup>.

En la mayoría de los casos, la infección por el virus Dengue no genera un cuadro clínico (>75% de los casos); sin embargo, un porcentaje de las personas que se infectan pueden desarrollar manifestaciones clínicas que incluyen el Dengue con y sin síntomas de alarma y el Dengue Severo. La fuga vascular característica de los pacientes que presentan las manifestaciones más severas de la enfermedad provoca hemoconcentración e hipotensión que en el peor de los escenarios puede conllevar a la muerte de los pacientes<sup>16</sup>.

El tratamiento de esta enfermedad radica en el reemplazo de fluidos y la administración de fármacos antipiréticos como el paracetamol; siendo la administración de fluidos la base del tratamiento durante la fase crítica de la enfermedad<sup>95</sup>. Las discrepancias en los estudios basados en biomarcadores, la interpretación de los mismos y la falta de un modelo animal que asemeje el cuadro clínico observado en los pacientes con Dengue han complicado la generación de estrategias nuevas así como un tratamiento efectivo para esta enfermedad<sup>96,97</sup>. Sin embargo, la complejidad de la enfermedad ha impulsado al desarrollo de diversos estudios que contribuyan a su entendimiento y al desarrollo de terapias.

En este contexto, diferentes factores se han relacionado con la patogénesis de la enfermedad como la virulencia de la cepa<sup>34</sup>, susceptibilidad genética<sup>35</sup>, edad y comorbilidades como diabetes, enfermedades cardiovasculares y asma<sup>98</sup>. Sin embargo, se ha visto que la respuesta inmune del huésped juega un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad debido a que se han observado cambios en los niveles de diferentes mediadores, dicho fenómeno se ha denominado “tormenta de citocinas” y sugiere un desbalance en los niveles de diversas moléculas<sup>29,36,58</sup>-principalmente citocinas-que pueden estar relacionados directa o indirectamente con las manifestaciones clínicas, principalmente con la fuga vascular observada en los pacientes con las formas más severas de la enfermedad<sup>54,55</sup>.

En este contexto, nos planteamos estudiar TGF- $\beta$ 1, una citocina que participa en diferentes procesos como muerte, proliferación, migración, así como regulación de la respuesta inmune<sup>68,70,71</sup>. A pesar de que existen pocos estudios, TGF- $\beta$  se ha relacionado con Dengue debido a que se han detectado niveles elevados de esta citocina en pacientes con formas severas de la enfermedad<sup>82,83</sup>; además, resultados de Kwon *et al.*, 2014 mostraron que el knockdown de Smad7 redujo el porcentaje de células infectadas<sup>84</sup> sugiriendo la participación de la vía de señalización de TGF- $\beta$  durante la infección por el virus Dengue. Por otra parte, se ha visto que TGF- $\beta$  regula de forma negativa a IL-1 $\beta$  debido a que Smad7 interrumpe la señalización mediada por esta citocina<sup>78</sup>. Asimismo, resultados previos de nuestro grupo de investigación mostraron que la disminución en los niveles de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados por el virus Dengue coincide con el aumento en los niveles de TGF- $\beta$ <sup>85</sup>.

Debido a esto, nos cuestionamos sobre la relación entre TGF- $\beta$  e IL-1 $\beta$  en el contexto de la infección por el virus Dengue. Para esto, nos planteamos realizar 3 ensayos diferentes: primero, estimular macrófagos con TGF- $\beta$ 1 durante 3 horas y posteriormente infectarlos (ensayo pre-infección) con el fin de cuantificar los niveles de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes recolectados a las 24 horas; segundo, infectar macrófagos y posteriormente estimularlos con TGF- $\beta$ 1 (ensayo post-infección), para determinar los niveles de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes a las 24 horas; y tercero, incubar con un inhibidor de TGF- $\beta$ RI, estimularlos con TGF- $\beta$ 1 durante 3 horas y posteriormente infectarlos y de igual manera cuantificar los niveles de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes recolectados a las 24 horas.

La cuantificación de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes mediante la técnica de ELISA mostró que el pre-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 inhibió la producción de IL-1 $\beta$  en respuesta a la infección por el virus Dengue (ensayo pre-infección; grupo TGF- $\beta$ 1+DENV-2). Por otra parte, en el ensayo post-infección no hubo diferencias significativas en la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados con el virus Dengue (DENV-2) y macrófagos infectados y posteriormente estimulados con TGF- $\beta$ 1 (DENV-2+TGF- $\beta$ 1); en ambos ensayos, el pre-tratamiento (TGF- $\beta$ 1+LPS) o el post-tratamiento (LPS+TGF- $\beta$ 1) con TGF- $\beta$ 1 no tuvo un efecto significativo en la producción de IL-1 $\beta$  mediada por LPS. En el ensayo con el inhibidor, los resultados sugieren que el tratamiento con el inhibidor impide el efecto negativo de TGF- $\beta$ 1 sobre la producción de IL-1 $\beta$  debido a que se observó un incremento en la producción de esta citocina en los 3 grupos (Control Inh, LPS Inh y DENV-2 Inh) en comparación con los grupos que no recibieron el tratamiento con el inhibidor. Este resultado no pudo ser comprobado debido a la falta de tiempo para la realización de más repeticiones.

A nivel de mensajero, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 parece incrementar los niveles de IL-1 $\beta$  en comparación con el grupo Control. Por otra parte, el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 previo a la infección (grupo TGF- $\beta$ 1+DENV-2) parece disminuir los niveles de expresión de IL-1 $\beta$  en comparación con los macrófagos que fueron únicamente infectados (DENV-2). Sin embargo, se requieren otras repeticiones para confirmar dicho resultado. También observamos que el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 post-infección no modificó la expresión de IL-1 $\beta$ ; de hecho, no se observaron cambios significativos en ninguno de los tratamientos en comparación con el grupo Control ( $p=0.8570$ ). En el ensayo con el inhibidor, los niveles de expresión en los macrófagos Control, estimulados con LPS e infectados con Dengue parecen ser más elevados en comparación con los grupos que no recibieron el tratamiento con el inhibidor pero al igual que en el caso del ensayo pre-infección se requieren repeticiones para confirmarlo.

En base a los resultados anteriores, podemos decir que TGF- $\beta$ 1 está actuando a nivel de la secreción de IL-1 $\beta$  debido a que no se observaron cambios significativos a nivel de mensajero. En relación a esto, se ha observado que el procesamiento y la secreción de citocinas como IL-1 $\alpha$ , IL-18 e **IL-1 $\beta$**  pueden ser regulados por mecanismos como la autofagia<sup>99</sup>.

La autofagia es un proceso sumamente coordinado que participa en la degradación de organelos dañados y/o disfuncionales, agregados de proteínas, proteínas solubles así como patógenos<sup>100,101</sup>. Se han descrito 3 tipos de autofagia: 1) Macroautofagia, que requiere la formación de vesículas de doble membrana (autofagosomas) que al fusionarse con los lisosomas permiten la degradación de los componentes citosólicos contenidos en su interior, 2) Microautofagia, que involucra la invaginación de la membrana lisosomal y/o endosomal permitiendo la degradación de las moléculas por proteasas residentes y 3) Autofagia mediada por chaperonas, en donde el reconocimiento por la chaperona citosólica HSC70 dirige a las proteínas blanco hacia el lumen del lisosoma<sup>102</sup>.

Se ha propuesto que la regulación de IL-1 $\beta$  por la autofagia se debe al secuestro de pro-IL-1 $\beta$  e IL-1 $\beta$  en autofagosomas debido a que el uso de inhibidores como 3-MA (3-metiladenina) o el silenciamiento de genes relacionados con la autofagia como Atg16L1 aumentan la producción de IL-1 $\beta$ <sup>103,104</sup>. Por otra parte, se ha visto que los autofagosomas pueden secuestrar y degradar componentes del inflammasoma como ASC y NLRP3, impidiendo de esta forma el procesamiento y por lo tanto la secreción de IL-1 $\beta$ <sup>105</sup>.

Asimismo, se ha visto la participación de TGF- $\beta$  en la regulación de la autofagia debido a que en células de carcinoma hepatocelular humanas se observó que el tratamiento con TGF- $\beta$  indujo la formación de autofagosomas, la degradación de proteínas de vida larga y la expresión de genes relacionados con la autofagia como BECLINA1, ATG5, ATG7 y DAPK; además se observó que el uso de inhibidores de TGF- $\beta$ RI atenuaron la activación de la autofagia mediada por TGF- $\beta$ . De manera interesante, el knockdown de Smad2/3 y Smad4 disminuyó la formación de autofagosomas y la expresión de los genes antes mencionados<sup>106</sup>.

En este contexto, nosotros observamos que el pre-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 anuló la secreción de IL-1 $\beta$  en respuesta a la infección con el virus Dengue, sugiriendo que TGF- $\beta$ 1 posiblemente activó el proceso de autofagia, impidiendo de esta forma la liberación de IL-1 $\beta$ . Sin embargo, este efecto no se observó cuando los macrófagos fueron infectados y posteriormente estimulados con TGF- $\beta$ 1, indicando que una vez que se estableció la respuesta contra el virus Dengue, TGF- $\beta$ 1 no tiene efecto en la secreción de IL-1 $\beta$ . El ensayo con el inhibidor donde observamos un aumento en la secreción de IL-1 $\beta$  podría apoyar la propuesta sobre la posible activación de la autofagia debido a que resultados de Kiyono *et al.*, 2009 mostraron que el uso del inhibidor SB431542 disminuye la activación de la autofagia mediada por TGF- $\beta$ <sup>106</sup>; cabe mencionar que este inhibidor actúa de igual manera que el utilizado en nuestros experimentos, sin embargo, el inhibidor SB505124 es más potente que SB431542<sup>90</sup>.

Estos resultados contrastan con lo observado en los macrófagos estimulados con LPS, debido a que ni el pre-tratamiento ni el post-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 modificó la secreción de IL-1 $\beta$ . La diferencia en la secreción de IL-1 $\beta$  podría deberse a que se ha visto que el LPS puede reconocer directamente a las caspasas 4 y 5, permitiendo su oligomerización y por lo tanto su activación. Una vez activas, pueden activar a caspasa 1 promoviendo el procesamiento de IL-1 $\beta$  y por lo tanto su secreción<sup>107-109</sup>. Para confirmar estos resultados, sería interesante estudiar la formación de autofagosomas en las mismas condiciones empleadas en estos ensayos, con el fin de determinar si la inhibición de la secreción de IL-1 $\beta$  ocurre a través de esta vía.

Por otra parte, en el ensayo de Western Blot observamos que la infección por el virus Dengue posiblemente induce la fosforilación de Smad2/3 (forma activada), lo que podría estar relacionado con la inducción de la autofagia debido a que esta vía parece estar implicada en la formación de los autofagosomas, como se mencionó anteriormente.

Esto podría ser importante durante el establecimiento de la infección por el virus Dengue, debido a las múltiples funciones de IL-1 $\beta$  como: reclutamiento de neutrófilos, inducción de citocinas y quimiocinas así como la estimulación de respuestas adaptativas específicas<sup>110</sup>. En base a esto, sería interesante realizar más repeticiones para confirmar este resultado así como otros ensayos a tiempos post-infección más prolongados (48-72 hrs).

Cabe mencionar que para respaldar los resultados antes descritos fue necesario confirmar la infección por el virus Dengue, para esto se emplearon dos técnicas diferentes: 1) Microscopía de Fluorescencia, en donde mediante el uso de un anticuerpo específico para la proteína E del virus pudimos determinar que aproximadamente un 40% de las células fueron positivas para Dengue y 2) PCR anidado, que consiste de dos rondas de amplificación; la primera permitió amplificar el gen que codifica para prM y en la segunda, se amplificó un fragmento más pequeño del gen de aproximadamente 140 pb que corresponde con lo observado en la electroforesis en gel de agarosa.

En resumen, los resultados del presente trabajo indican que el pre-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 inhibe la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados con virus Dengue; no obstante, el post-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 no tuvo efecto en la secreción de IL-1 $\beta$  por macrófagos infectados con el virus Dengue. En ninguno de los casos se observaron cambios en el nivel de expresión de IL-1 $\beta$ , sugiriendo que TGF- $\beta$ 1 actúa sobre el procesamiento y la secreción de IL-1 $\beta$ .

Esto sugiere que TGF- $\beta$ 1 podría ser importante para el establecimiento y propagación de la infección al inhibir la secreción de IL-1 $\beta$  y por lo tanto impedir sus funciones, entre las que destacan: expresión de genes requeridos durante la inflamación, respuesta adaptativa y el control viral<sup>111</sup>. Existen diferentes reportes que han asociado la carga viral con el resultado clínico de los pacientes; por ejemplo, se ha observado una relación entre altos picos de viremia y la severidad de la enfermedad en niños infectados por los serotipos 1 y 2<sup>112</sup>. Otro estudio mostró una alta viremia en pacientes con Fiebre Hemorrágica por Dengue; además se observó una asociación con la fuga plasmática y trombocitopenia observada en estos pacientes<sup>113</sup>. Debido a esto, los resultados de este trabajo pueden contribuir a un mejor entendimiento sobre la patología de la enfermedad ya que demostramos que TGF- $\beta$ 1 modula la producción de IL-1 $\beta$  en respuesta a la infección por el virus Dengue.

## **11. CONCLUSIONES**

### **Conclusión General**

Puesto que el pre-tratamiento con TGF- $\beta$ 1 inhibió la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados con el virus Dengue, pero no así el post-tratamiento con TGF- $\beta$ 1, nuestra hipótesis es aceptada.

### **Conclusiones parciales**

1. La inhibición de la vía de señalización de TGF- $\beta$  aumentó la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados con el virus Dengue.
2. TGF- $\beta$ 1 no modificó la secreción de IL-1 $\beta$  en respuesta a la estimulación con LPS.
3. El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 no afectó la expresión de IL-1 $\beta$ .

## **12. PERSPECTIVAS**

1. Confirmar el efecto del inhibidor en la secreción de IL-1 $\beta$ .
2. Confirmar el efecto de TGF- $\beta$ 1 y el inhibidor de TGF- $\beta$ RI sobre la expresión de IL-1 $\beta$ .
3. Corroborar el efecto de la infección por el virus Dengue sobre las proteínas Smad.
4. Determinar si el mecanismo de autofagia es el responsable de la inhibición de la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos infectados por el virus Dengue mediante el estudio de la formación de autofagosomas, expresión de genes relacionados con la autofagia así como la visualización de pro-IL-1 $\beta$  o IL-1 $\beta$  en autofagosomas.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Guzman, M. G. & Harris, E. Dengue. *Lancet* **385**, 453–465 (2015).
2. Dengue and severe dengue. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
3. Murray, N. E. A., B Quam, M. & Wilder-Smith, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin. Epidemiol.* **5**, 299–309 (2013).
4. World Health Organization (WHO). *Global Strategy for Dengue Prevention and Control*. (2012). doi:www.who.int
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Dengue y dengue grave. (2017). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>.
6. PAHO/WHO. *Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country: Deaths (SD/D) x100 CFR Figures for 2017 (to week noted by each country)*. **2017**, (2017).
7. Fajardo-Dolci, G. *et al.* El dengue en México. *Rev. Médica del IMSS* **50**, 631–639 (2012).
8. Martínez-Torres, E. Dengue. *Estud. Avancados* **22**, 33–52 (2008).
9. World Health Organization (WHO). *Handbook for Clinical Management of Dengue*. (2012).
10. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Dengue: guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control*. (2009).
11. Guzman, M. G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, S7–S16 (2010).
12. Guabiraba, R. & Bernhard, R. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology* **141**, 143–156 (2013).
13. Flipse, J. *et al.* Dengue tropism for macrophages and dendritic cells: the host cell effect. *J. Gen. Virol.* **21** (2016).

14. Aruna, R. Review on Dengue viral Replication , assembly and entry into the host cells. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **3**, 1025–1039 (2014).
15. Idrees, S. & Ashfaq, U. A. A brief review on dengue molecular virology , diagnosis , treatment and prevalence in Pakistan. *Genet. Vaccines Ther.* **10**, 1 (2012).
16. Diamond, M. S. & Pierson, T. C. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell* **162**, 488–492 (2015).
17. Roberts, C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat. Publ. Gr.* **15**, 745–759 (2015).
18. Giraldo, D. *et al.* Differential Expression of Toll-like Receptors in Dendritic Cells of Patients with Dengue during Early and Late Acute Phases of the Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, 11 (2013).
19. Green, A. M., Beatty, P. R., Hadjilaou, A. & Harris, E. Innate Immunity to Dengue Virus Infection and Subversion of Antiviral Responses. *J. Mol. Biol.* **426**, 1148–1160 (2014).
20. Pagni, S. & Fernandez-Sesma, A. Evasion of the human innate immune system by dengue virus. *Immunol. Res.* **54**, 152–159 (2012).
21. Short, J. A. L. Viral evasion of interferon stimulated genes. *Biosci. Horizons* **2**, 212–224 (2009).
22. Li, W. M., Barnes, T. & Lee, C. H. Endoribonucleases – enzymes gaining spotlight in mRNA metabolism. *FEBS J.* **277**, 627–641 (2010).
23. Morrison, J., Aguirre, S. & Fernandez-sesma, A. Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. *Viruses* **4**, 397–413 (2012).
24. St, A. L. *et al.* Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer ( NK ) and NKT-cell recruitment and viral clearance. 1–6 (2011). doi:10.1073/pnas.1105079108/- /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1105079108
25. John, A. L. S., Rathore, A. P. S., Raghavan, B., Ng, M. & Abraham, S. N. Contributions of mast cells and vasoactive products , leukotrienes and chymase , to dengue virus-induced vascular leakage. 1–18 (2013). doi:10.7554/eLife.00481

26. Avirutnan, P. & Matangkasombut, P. Unmasking the role of mast cells in dengue. *Elife* **2**, 2–4 (2013).
27. Chu, Y.-T., Wan, S.-W., Anderson, R. & Lin, Y.-S. Mast cell – macrophage dynamics in modulation of dengue virus infection in skin. *Immunology* **146**, 163–172 (2015).
28. Despre, P., Cedillo-barro, L. & Navarro-sa, E. Innate Immune Responses to Dengue Virus. *Arch. Med. Res.* **36**, 425–435 (2005).
29. Pang, T., Cardoso, M. J. & Guzman, M. G. Of cascades and perfect storms : the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome ( DHF / DSS ). *Immunol. Cell Biol.* 43–45 (2007). doi:10.1038/sj.icb.7100008
30. Beltrán, D. & López-Vergès, S. NK cells during dengue disease and their recognition of dengue virus-infected cells. *Front. Immunol.* **5**, 1–6 (2014).
31. Mathew, A., Townsley, E. & Ennis, F. A. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. *Futur. Med.* **9**, 411–425 (2014).
32. Rivino, L. *et al.* Virus-specific T lymphocytes home to the skin during natural dengue infection Virus-specific T lymphocytes home to the skin during natural dengue infection. *Sci. Transl. Med.* **7**, 9 (2015).
33. Duangchinda, T. *et al.* Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 16922–16927 (2010).
34. Rico-Hesse, R. Dengue Virus Virulence and Transmission Determinants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **338**, 45–55 (2011).
35. Thi, N., Lan, P. & Hirayama, K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. **39**, 73–81 (2011).
36. John, D. V., Lin, Y.-S. & Perng, G. C. Biomarkers of severe dengue disease - a review. *J. Biomed. Sci.* **22**, 83 (2015).
37. Vasconcelos Costa, V., Tavares Fagundes, C., G. Souza, D. & Martins Teixeira, M. Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection. *Am. J. Pathol.* **182**, 1950–1961 (2013).
38. Chaturvedi, U. C. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever : implications for

- pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **28**, 3–8 (2000).
39. Bozza, F. A. *et al.* Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect. Dis.* **8**, 11 (2008).
  40. Brasier, A. R. *et al.* A Three-Component Biomarker Panel for Prediction of Dengue Hemorrhagic Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, 341–348 (2012).
  41. Butthep, P., Chunchakan, S., Yoksan, S. & Tangnararatchakit, K. Alteration of Cytokines and Chemokines During Febrile Episodes Associated With Endothelial Cell Damage and Plasma Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **31**, 232–238 (2012).
  42. Green, S. *et al.* Elevated Plasma Interleukin-10 Levels in Acute Dengue Correlate With Disease Severity. *J. Med. Virol.* **334**, 329–334 (1999).
  43. Laur, F. *et al.* Plasma levels of tumour necrosis factor  $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$ -1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**, 654–656 (1998).
  44. Suharti, C. *et al.* Cytokine patterns during dengue shock syndrome. *Eur. Cytokine Netw.* **14**, 172–177 (2003).
  45. Wang, L. *et al.* Implications of Dynamic Changes among Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Membrane TNF Receptor, and Soluble TNF Receptor Levels in Regard to the Severity of Dengue Infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 297–302 (2007).
  46. De La Cruz Hernández, S. I. *et al.* A strong interferon response correlates with a milder dengue clinical condition. *J. Clin. Virol.* **60**, 196–199 (2014).
  47. Del Moral-Hernández, O. *et al.* Association DENV1 and DENV2 infection with high serum levels of soluble thrombomodulin and VEGF in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **7**, 370–378 (2014).
  48. Kumar, Y. *et al.* Serum Proteome and Cytokine Analysis in a Longitudinal Cohort of Adults with Primary Dengue Infection Reveals Predictive Markers of DHF. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, 14 (2012).
  49. Rathakrishnan, A. *et al.* Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).

50. Huerta-zepeda, A. *et al.* Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection. *Thromb. Haemost.* **99**, 936–943 (2008).
51. Chen, L.-C. *et al.* Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 142–147 (2006).
52. Furuta, T. *et al.* Association of Mast Cell-Derived VEGF and Proteases in Dengue Shock Syndrome. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, 12 (2012).
53. Ferrero, E. *et al.* Roles of tumor necrosis factor p55 and p75 receptors in TNF- alpha - induced vascular permeability. *Am. J. Physiol. Physiol.* **281**, 1173–1179 (2001).
54. Inyoo, S., Suttiheptumrong, A. & Pattanakitsakul, S. Synergistic Effect of TNF- a and Dengue Virus Infection on Adhesion Molecule Reorganization in Human Endothelial Cells. *Jpn. J. Infect. Dis.* **70**, 186–191 (2017).
55. Rothman, A. L. & Ennis, F. A. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Virology* **257**, 1–6 (1999).
56. Vitarana, T., de Silva, H., Withana, N. & Gunasekera, C. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med. J.* **36**, 63–65 (1991).
57. Kittigul, L., Temprom, W., Sujirarat, D. & Kittigul, C. Determination of tumor necrosis factor-alpha levels in dengue virus infected patients by sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* **90**, 51–57 (2000).
58. Espada-Murao, L. A. & Morita, K. Dengue and Soluble Mediators of the Innate Immune System. *Trop. Med. Health* **39**, 53–62 (2011).
59. Garlanda, C., Dinarello, C. A. & Mantovani, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* **39**, 1003–1018 (2013).
60. Dinarello, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood J.* **117**, 3720–3733 (2016).
61. Netea, M. G. *et al.* IL-1 $\beta$  Processing in Host Defense, Beyond the Inflammasomes. *PLOS Pathog.* **6**, 9 (2010).

62. Acuner-Ozbabacan, S. E., Gursoy, A., Nussinov, R. & Keskin, O. The Structural Pathway of Interleukin 1 ( IL-1 ) Initiated Signaling Reveals Mechanisms of Oncogenic Mutations and SNPs in Inflammation and Cancer. *PLOS Comput. Biol.* **10**, 1–14 (2014).
63. Davis, C. N. *et al.* MyD88-dependent and -independent signaling by IL-1 in neurons probed by bifunctional Toll/IL-1 receptor domain/BB-loop mimetics. *PNAS* **103**, 2953–2958 (2006).
64. Cheung, K. T., Sze, D. M., Chan, K. H. & Leung, P. H. Involvement of caspase-4 in IL-1 beta production and pyroptosis in human macrophages during dengue virus infection. *Immunobiology* **4**, 1–9 (2017).
65. Hottz, E. D. *et al.* Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood J.* 1–31 (2015). doi:10.1074/jbc.M115.664136
66. Callaway, J. B. *et al.* Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Mediates IL-1 $\beta$  Induction by Primary Human Monocytes During Antibody-Enhanced Virus Infection. *J. Biol. Chem.* **290**, 17306–17320 (2015).
67. Huang, F. & Chen, Y.-G. Regulation of TGF- $\beta$  receptor activity. *Cell Biosci.* **2**, 9 (2012).
68. Kubiczikova, L., Sedlarikova, L., Roman, H. & Sevcikova, S. TGF- $\beta$  – an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.* **160**, 1463–1475 (2012).
69. Morikawa, M., Derynck, R. & Miyazono, K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb. Lab. Press* 1–25 (2016).
70. Weiss, A. & Attisano, L. The TGF $\beta$  Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**, 47–63 (2013).
71. Travis, M. A. & Sheppard, D. TGF- $\beta$  Activation and Function in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 51–82 (2014).
72. Ueberham, U. & Arendt, T. in *Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision* (ed. Wislet-Gendebien, S.) 366 (InTech, Chapters, 2013).
73. Malhotra, N. & Kang, J. SMAD regulatory networks construct a balanced immune system. *Immunology* 1–10 (2013). doi:10.1111/imm.12076

74. Massagué, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2783–2810 (2005). doi:10.1101/gad.1350705.embryo
75. Yan, X. & Chen, Y.-G. Smad7, not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- $\beta$  signalling. *Biochem. Soc.* **434**, 1–10 (2011).
76. Zhang, Y. E. Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res.* **19**, 128–139 (2009).
77. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nat. Publ. Gr.* **425**, 577–584 (2003).
78. Lee, Y. S. *et al.* Smad7 and Smad6 bind to discrete regions of Pellino-1 via their MH2 domains to mediate TGF- $\beta$ 1-induced negative regulation of IL-1R\_TLR signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 836–843 (2010).
79. Qin, H. *et al.* TGF- $\beta$  promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J. Immunol.* **183**, 97–105 (2009).
80. Pereira, L. M. S., Gomes, S. T. M., Ishak, R. & Vallinoto, A. C. R. Regulatory T Cell and Forkhead Box Protein 3 as Modulators of immune Homeostasis. *Front. Immunol.* **8**, 1–24 (2017).
81. Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. ‘Yin-Yang’ functions of TGF- $\beta$  and Tregs in immune regulation. *Immunol. Rev.* **220**, 199–213 (2007).
82. Agarwal, R., Elbishbishi, E., Chaturverdi, U., Nagar, R. & Mustafa, A. Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. *Int. J. Exp. Pathol.* **80**, 143–149 (1999).
83. Pandey, N. *et al.* Serum levels of IL-8, IFN $\gamma$ , IL-10, and TGF  $\beta$  and their gene expression levels in severe and non-severe cases of dengue virus infection. *Arch. Virol.* **160**, 1463–1475 (2015).
84. Kwon, Y. *et al.* Kinome siRNA screen identifies novel cell-type specific dengue host target genes. *Antiviral Res.* **110**, 20–30 (2014).
85. Flores-Ávila, K. R. Estudio del papel de IgG1 en la liberación de citocinas por el macrófago en la infección por Dengue. (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2013).

86. Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P. & Dieter, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin by binding. *J. Leucoc. Biol.* **59**, 555–561 (1996).
87. Park, E. K. *et al.* Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm. Res.* **56**, 45–50 (2007).
88. Martínez-Cano, O. Estudio comparativo de la apoptosis inducida por la infección con virus Dengue 2 en modelos de monocito/macrófago y de neuroblastoma humanos. (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2008).
89. Zi, Z. *et al.* Quantitative analysis of transient and sustained transforming growth factor- $\beta$  signaling dynamics. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 1–12 (2011).
90. Da Costa Byfield, S., Major, C., Laping, N. J. & Roberts, A. B. SB-505124 Is a Selective Inhibitor of Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* **65**, 744–752 (2004).
91. Li, Q. *et al.* Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor Type 1 Is Essential for Female Reproductive Tract Integrity and Function. *PLoS Genet.* **7**, 1–15 (2011).
92. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
93. Deshpande, A. K., Chauhan, S. G. & Sood, A. Dengue : A Review. *MGM J. Med. Sci.* **1**, 26–33 (2016).
94. Choumet, V. & Desprès, P. Dengue and other flavivirus infections. *Rev. Sci. Tech.* **34**, 473–8, 467–72 (2015).
95. Hasan, S., Jamdar, S. F., Alalowi, M. & Al Ageel Al Beaiji, S. M. Dengue virus : A global human threat : Review of literature. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* **6**, 1–6 (2016).
96. Srikiatkhachorn, A., Mathew, A. & Rothman, A. L. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Semin. Immunopathol.* 1–12 (2017). doi:10.1007/s00281-017-0625-1
97. Srikiatkhachorn, A. & Green, S. in *Dengue Virus* (ed. Rothman, A. L.) (Springer Berlin Heidelberg, 2010). doi:10.1007/978-3-642-02215-9

98. Pang, J., Hsu, J. P., Yeo, T. W., Leo, Y. S. & Lye, D. C. Diabetes , cardiac disorders and asthma as risk factors for severe organ involvement among adult dengue patients : A matched case-control study. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
99. Harris, J. Autophagy and IL-1 family cytokines. *Front. Immunol.* **4**, 1–6 (2013).
100. Dong, Y., Undyala, V. V, Gottlieb, R. A., Mentzer, R. M. & Przyklenk, K. Autophagy : Definition , Molecular Machinery , and Potential Role in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **15**, 220–230 (2010).
101. Deretic, V. Autophagy in infection. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 252–262 (2010).
102. Kaur, J. & Debnath, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 461–472 (2015).
103. Harris, J. *et al.* Autophagy Controls IL-1 $\beta$  Secretion by Targeting Pro-IL-1 $\beta$  for Degradation. *J. Biol. Chem.* **286**, 9587–9597 (2011).
104. Saitoh, T. *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nat. Lett.* **456**, 264–269 (2008).
105. Shi, C.-S. *et al.* Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* **13**, 255–265 (2012).
106. Kiyono, K. *et al.* Autophagy Is Activated by TGF-  $\beta$  and Potentiates TGF-  $\beta$  – Mediated Growth Inhibition in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Res.* **5**, 8844–8853 (2009).
107. Shi, J. *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* **514**, 187–192 (2014).
108. Smith, C., Wang, X. & Yin, H. Caspases come together over LPS. *Trends Immunol.* **36**, 59–61 (2015).
109. Man, S. M. & Kanneganti, T.-D. Converging roles of caspases in and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 7–21 (2015).
110. Sahoo, M., Ceballos-Olvera, I., Del Barrio, L. & Re, F. Role of the Inflammasome, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in Bacterial Infections. *Sci. World J.* **11**, 2037–2050 (2011).

111. Aarreberg, L. D. *et al.* Interleukin-1 beta Signaling in Dendritic Cells Induces Antiviral Interferon Responses. *J. Infect. Dis.* **9**, 1–14 (2018).
112. Vaughn, D. W. *et al.* Dengue Viremia Titer , Antibody Response Pattern , and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. *J. Infect. Dis.* **181**, 2–9 (2000).
113. Libraty, D. H. *et al.* Differing Influences of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections. *J. Infect. Dis.* **185**, 1213–1221 (2002).