

Establecimiento de un modelo de infección in vitro, con los cuatro serotipos del virus dengue, mediado por el mecanismo de potenciación dependiente de anticuerpos

Establish an Infection Model with the Four DENV Serotypes, Mediated by the Antibody-Dependent Enhancement Mechanism

Autor: 1. Jorge López-Dubón (1)
 2. Vanessa Loaiza-Cano (1) (ORCID 0000-0002-5000-7089)
 3. Jaime Cardona-Ospina (2) (ORCID 0000-0003-3996-2293)
 4. Julián Ruíz-Saénz (1) (ORCID 26656111100)
 5. Marlen Martínez-Gutiérrez (1) (ORCID 0000-0002-9429-0058)

Sobre el autor: 1. Universidad Cooperativa de Colombia, Grupo de Investigación en Ciencias Anima les-GRICA, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Bucaramanga, Colombia

2. Grupo de Biomedicina, Facultad de Medicina, Institución Universitaria Visión de las Américas. Pereira, Colombia

Información del manuscrito: Recibido/Received: 20-11-24
 Aceptado/Accepted: 08-07-25

Contacto de correspondencia: jorge.lopezd@udea.edu.com

Resumen

Introducción: Los anticuerpos de la infección primaria por DENV pueden favorecer la infección secundaria por serotipos heterólogos, a través del mecanismo ADE, potenciando la entrada, replicación viral y una respuesta inmune exacerbada, asociados con la gravedad del dengue. El objetivo del presente estudio fue establecer in vitro un modelo de infección con los cuatro serotipos DENV, mediado por el mecanismo ADE. **Metodología:** Se realizó una curva de crecimiento con células VERO y U937 infectadas con cada serotipo de DENV a MOI de 1; de las 24, hasta 96 hpi se recolectaron sobrenadantes para cuantificar partículas virales infecciosas por plaqueo y efecto citopático por MTT. Para el modelo DENV-ADE se realizaron mezclas virus: anticuerpos monoclonales de serotipos específicos, inoculadas sobre las células U937 y 48 hpi se recolectaron sobrenadantes para cuantificar PVI. Las monocapas se usaron para determinar genoma viral (RT-qPCR) y proteína viral (CELL-ELISA). Además, se evaluó la expresión relativa de citoquinas por RT-qPCR. Resultados: El ECP de los cuatro serotipos fue mayor al 50 % en células VERO, en U937 DENV-3 y 4 causaron daño celular hasta 96 hpi. La replicación de DENV-1 y DENV-4 fue similar en ambas líneas celulares. DENV-2 presentó mayor replicación 72 hpi en VERO y 96 hpi en U937. La mayor actividad replicativa para DENV-3 se obtuvo 72 hpi. Los Anti-DENV heterotípicos potenciaron las PVI por los serotipos DENV-1 y 2, y Anti-DENV-2 neutralizó la infección por los cuatro serotipos. En la infección ADE-DENV-2, la expresión de IL-6 incrementó proporcionalmente con las

PVI y $\text{TNF-}\alpha$ no presentó diferencias entre la infección primaria y secundaria por DENV. **Conclusiones:** El ECP-DENV fue mayor en células VERO que en U937, la actividad replicativa mostró diferencias entre serotipos y líneas celulares. En la infección por ADE, DENV-1 y DENV-2 potenciaron la producción de PVI por anticuerpos heterotípicos y la expresión de IL-6 incrementó en la infección ADE-DENV-2.

Palabras clave: dengue, virus, ADE, serotipos, anticuerpos

Abstract

Introduction: Antibodies from primary DENV infection can promote secondary infection with heterologous serotypes through the ADE mechanism, enhancing viral entry, replication, and an exacerbated immune response, all associated with dengue severity. The objective of this study was to establish an in vitro model of infection with the four DENV serotypes, mediated by the ADE mechanism. **Methodology:** A growth curve was performed with VERO and U937 cells infected with each DENV serotype at an MOI of 1; supernatants were collected from 24 to 96 hpi to quantify infectious viral particles by plating and cytopathic effect (MTT). For the DENV-ADE model, virus-specific monoclonal antibody mixtures were inoculated onto U937 cells, and supernatants were collected at 48 hpi to quantify PVI. The monolayers were used to determine viral genome (RT-qPCR) and viral protein (CELL-ELISA). In addition, relative cytokine expression was assessed by RT-qPCR. **Results:** The CPE of all four serotypes was greater than 50% in VERO cells; in U937, DENV-3 and DENV-4 caused cell damage up to 96 hpi. Replication of DENV-1 and DENV-4 was similar in both cell lines. DENV-2 presented the highest replication at 72 hpi in VERO and 96 hpi in U937. The highest replicative activity for DENV-3 was obtained at 72 hpi. Heterotypic Anti-DENV antibodies enhanced PVI for DENV-1 and DENV-2 serotypes, and Anti-DENV-2 neutralized infection by all four serotypes. In ADE-DENV-2 infection, IL-6 expression increased proportionally with PVI, and $\text{TNF-}\alpha$ did not differ between primary and secondary DENV infections. **Conclusions:** DENV-CPE was higher in VERO cells than in U937 cells, and replication activity differed between serotypes and cell lines. In ADE infection, DENV-1 and DENV-2 enhanced PVI production by heterotypic antibodies, and IL-6 expression increased in ADE-DENV-2 infection.

Keywords: DENV, ADE, serotypes, antibodies

Introducción

El virus del dengue (DENV) es un flavivirus transmitido a los humanos por los mosquitos del género *Aedes* principalmente *Aedes aegypti*. La arbovirosis producida por este virus es una de las infecciones con mayor prevalencia en las áreas tropicales y subtropicales del planeta, implicando un importante impacto en términos de carga y costos de enfermedad para los países endémicos (1). El dengue es causado por cuatro serotipos diferentes del virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (2), que, al contraer la infección por un serotipo, se generan anticuerpos neutralizantes específicos que confieren inmunidad de por vida contra ese serotipo, fenómeno conocido como inmunidad homotípica (3,4). Estos anticuerpos también pueden reaccionar de forma cruzada con los otros tres serotipos (inmunidad heterotípica), pero con el tiempo los títulos pueden caer por debajo de los niveles neutralizantes, favoreciendo el desarrollo de la infección secundaria y las formas graves de la enfermedad (5,6).

Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar los mecanismos asociados con la gravedad del dengue, entre ellas la asociación de una infección previa por un serotipo de DENV que confiere la preexistencia de anticuerpos potenciadores. Además, la sobreproducción de citoquinas proinflamatorias por la activación de fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos y células dendríticas) células B y células T con reacción cruzada en la respuesta a la infección por DENV. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos asociados con la evolución a complicaciones clínicas, no se han dilucidado completamente (4,7).

La infección potenciada por anticuerpos o ADE, por sus siglas en inglés (Antibody Dependent Enhancement), postula que el virus causante de la infección secundaria es reconocido por los anticuerpos generados en una infección previa (infección primaria); sin capacidad de neutralizarlo. Por el contrario, el virus es capaz de ingresar a las células susceptibles mediante receptores Fc gamma (Fc- γ), los cuales se encuentran en la superficie de células inmunes, que reconocen la porción Fc de las inmunoglobulinas G (IgG) y a su vez desencadenan una amplia gama de funciones efectoras (8). La fagocitosis mediada por estos receptores facilita el ingreso del virus; lo cual genera un aumento en la replicación viral e induce modificaciones en la respuesta inmune celular con un incremento en la secreción de citocinas, que contribuyen en la patogenia del dengue (9,10).

Las células U937 obtenidas a partir de linfoma histiocítico, son una línea celular tipo monocito-macrófago que permite estudiar la infección por el DENV. Estas células también permiten el análisis de proteínas involucradas de manera directa con la respuesta inmune ante el virus.

(11). Este modelo celular también ha permitido realizar estudios de inmunomodulación y evaluar compuestos con potencial antiviral. Además, expresan receptores tipo FCG lo que permite usarlas en sistemas de infección mediados por anticuerpos y con ello poder estudiar aspectos relacionados tanto con la infección primaria como secundaria por DENV (12).

Las células VERO derivadas de riñón de mono verde africano, adherentes y con morfología epitelial, constituyen uno de los principales modelos celulares en estudios de infecciones con DENV, debido a la alta permisividad a la infección por flavivirus, facilitando el estudio de la replicación viral sin la interferencia de mecanismos antivirales naturales como la respuesta de interferón tipo I, ya que dichas células presentan una delección en el cromosoma que contiene los genes para la producción de esta citoquina. También es una línea celular ampliamente utilizada y estandarizada, lo que permite comparar resultados y el diseño de protocolos comunes en la investigación biomédica (13)

En este contexto, en el presente trabajo se realizó una caracterización de la infección de cada serotipo DENV, en términos de efecto citopático y actividad replicativa en las líneas celulares U937 y VERO. Además, se estableció un modelo de infección con los cuatro serotipos de DENV en células U937, basado en el mecanismo ADE, permitiendo evaluar el comportamiento de la infección en presencia y ausencia de anticuerpos Anti-DENV y a la vez permitir a mediano plazo hacer investigaciones enfocadas en la comprensión de la fisiopatogénesis de la infección mediada por anticuerpos; la identificación de biomarcadores pronósticos, dianas terapéuticas específicas y/o la búsqueda de agentes antivirales, y con ello contribuir no solo a un mejor entendimiento del mecanismo; sino también al desarrollo de estrategias de control y prevención eficaces contra el dengue.

Mantenimiento de líneas celulares VERO/U937

Las células derivadas de riñón de mono (VERO), obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) CCL-81TM y la línea celular de monocitos subclón adherentes obtenidas a partir de linfoma histiocítico (U937) se cultivaron en Dulbecco Modified Eagles Minimal (DMEM) suplementado con 2 % de suero fetal bovino (SFB), 0.25 µg/mL de anfotericina B (GIBCO), 100 µg/mL de estreptomycin (GIBCO), 100 U/mL de penicilina (GIBCO). Ambas líneas celulares fueron mantenidas en incubación a 37 °C con atmósfera de CO₂ al 5 % y humedad relativa hasta alcanzar su máxima confluencia. Posteriormente, se hizo pase celular para lo cual se usó tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) al 0.25 para lograr desprendimiento de la monocapa, la tripsina se inactivó con un volumen duplicado de DMEM 10 % SFB. El botón de células se resuspendió en 1 mL de DMEM 10 % SFB y se contó para hacer las siembras necesarias para los experimentos.

Virus

Se usó una cepa de referencia de cada serotipo de DENV. Las cepas DENV-1/West Pac 74, genotipo IV, DENV-2/S16803, genotipo asiático-americano, DENV-3/CH53489, genotipo III y DENV-4/TVP360, genotipo II se reprodujeron en células VERO para cosechar virus para los diferentes experimentos. Se hicieron siembras de 5x10⁶ células en botellas de 75 cm², las cuales se incubaron 24 h a 37 °C para alcanzar una confluencia aproximadamente del 80 %, luego se infectaron con 1 200 µl del inóculo viral y se incubó por 2 h a 37 °C a fin de lograr la internalización del virus en las células, posteriormente se completó un volumen de 15 mL con DMEM 2 % SFB para una incubación a 37 °C hasta observar efecto citopático (ECP) producto de la replicación viral. La recolección del virus se hizo entre el día 6-8 postinfección; se realizó un desprendimiento de la monocapa celular y la suspensión se trasvasó en un tubo cónico estéril, se centrifugó a 2 000 rpm por 10 min a temperatura de refrigeración (4 °C). El sobrenadante obtenido se suplementó con 30 % de SFB y se realizaron alícuotas de los diferentes lotes virales para su crioconservación a -80 °C. El título viral (UFP/mL) se determinó por ensayo de placa y la serotipificación se confirmó por PCR en tiempo real.

Anticuerpos monoclonales Anti-DENV

Los anticuerpos usados en el presente estudio fueron donados por el Center for Diseases (CDC) de los Estados Unidos de América: Anti-DENV-1 (MAB D2-1F1-3); Anti-DENV-2 (MAB 3H5-1-21); Anti-DENV-3 (MAB-D6-8A1-12); y Anti-DENV-4 (MAB 1H10-6-7).

Estos son anticuerpos monoclonales (mAb), cuyo origen biológico es a partir de ratón, siendo una inmunoglobulina purificada de isotipo IgG1, que reconocen el dominio III de la proteína E de DENV. Caracterizados por ser de tipo-específico y han sido usados en ensayos de neutralización (PRNT), ADE e identificación serológica. En el presente trabajo se utilizó una sola concentración de Acs equivalente a 25 ng/µL, la cual se obtuvo con base a reportes de ensayos previos.

Ensayo de viabilidad celular para determinar el efecto citopático de los cuatro serotipos DENV

La viabilidad de las células VERO y U937 se determinó mediante la técnica de MTT (Sigma-Aldrich), la cual se basa en la reducción metabólica de la sal 3-4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-bromuro de tetrazol (tetrazolio) por acción de la enzima succinato deshidrogenasa al convertirla en un compuesto insoluble de color azul (Formazán) cuya concentración es directamente proporcional a la actividad metabólica y, por lo tanto, a la viabilidad celular.

Se sembraron 3×10^4 células VERO y 1.5×10^4 células U937 por pozo con DMEM al 2 % SFB en placas de 96 pozos, 24 h posterior a la siembra se infectaron con los serotipos de DENV a MOI de 1 y se incubaron hasta las 96 h posterior a la infección a 37 °C y 5 % de CO₂.

Seguidamente, se retiró el medio y se hicieron dos lavados con PBS IX, se agregó 50 µl de MTT por pozo a una concentración de 0.5 mg/mL, se protegió de la luz y se incubó durante 2 horas a 37 °C. Luego se adicionó 100 µL de DMSO, el cual actúa como disolvente de los cristales de formazán y se incubó por 15 minutos a Temperatura Ambiente (TA).

Posteriormente, se procedió hacer la lectura espectrofotométrica a una densidad óptica (DO) de 450 nm en el equipo Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific), las absorbancias obtenidas se usaron para calcular la viabilidad celular, las DO de los controles sin virus (CSV) representan el 100 % de viabilidad. Cada ensayo se realizó en dos unidades experimentales (UE) independientes con cuatro réplicas cada una (n: 8). El efecto citopático (ECP) de DENV se expresó como la reducción en la viabilidad celular causada por cada uno de los serotipos DENV, aplicando la siguiente formula $ECP = 100 - \text{viabilidad celular (\%)}$, donde un 0 % de ECP indica que la infección no afectó la viabilidad.

Curva de replicación de los 4 serotipos DENV en células VERO y U937

Se hicieron siembras de 8×10^4 células VERO y 6×10^4 células U937 por pozo en DMEM al 2 % SFB en placas de 24 pozos. Luego de 24 horas, se infectaron con cada una de las cepas de los serotipos DENV a una MOI de 1 y se incubó 2 h a 37 °C y 5 % CO₂. Luego se retiró el inóculo viral y se agregó medio fresco (DMEM 2 %) y se incubaron 0, 24, 48, 72 y 96 h a 37 °C y 5 % CO₂. Al completar cada uno de los tiempos antes descritos, se recolectaron los sobrenadantes, los cuales se usaron para cuantificar partículas virales infecciosas por técnica de plaqueo. Las monocapas fueron lavadas con PBS 1x y se crioconservaron a -80 °C. Cada ensayo se realizó en dos UE independientes (n: 6) con tres réplicas cada una.

Modelo de infección in vitro con los cuatro serotipos DENV, mediado por el mecanismo de potenciación dependiente de anticuerpos

El establecimiento del modelo de infección in vitro con los cuatro serotipos DENV se realizó en células U937. Se hicieron siembras de 1.5×10^4 células por pozo con DMEM 2 % SFB en placas de 96 pozos, 24 h después, las células se infectaron con los inóculos de cada condición experimental incluidas en el modelo. Se usó una MOI de 0.5 y una sola concentración de anticuerpos monoclonales serotipo-específico de 25 ng/µL [80, 81].

Condiciones experimentales del modelo de infección DENV-ADE

Controles de infección: Corresponden a la de infección en ausencia de anticuerpos también denominado infección primaria. Se hicieron mezclas de cada uno de los serotipos DENV (DENV1-4) (MOI de 0.5) en DMEM 2 % SFB y se incubaron durante 1 h a 37 °C y 5 % CO₂.

Control de neutralización: Cada uno de los serotipos DENV (MOI de 0.5) se mezcló con sus respectivos anticuerpos homotípicos (concentración de 25 ng/µL) a una relación 1:1 en DMEM 2 % SFB y se incubaron 1 h a 37 °C y 5 % CO₂.

Infección dependiente de anticuerpos: Se hicieron mezclas 1:1 de cada uno de los serotipos DENV (MOI de 0.5) con sus correspondientes anticuerpos heterotípicos (concentración de 25 ng/µL), usando DMEM 2 % SFB y se incubaron 1 h a 37 °C y 5 % CO₂, para garantizar la formación de los inmunocomplejos (IC) virus/anticuerpo.

Cada una de las mezclas antes descritas se inocularon sobre las células U937 y se incubaron por 2 h a 37 °C y 5 % CO₂. Posteriormente, se retiró el inóculo y se agregó medio fresco (DMEM 2 % SFB) para una incubación de 48 h a 37 °C y 5 % CO₂. Luego de este tiempo, se procedió a recolectar sobrenadantes, los cuales se crioconservaron y se usaron para cuantificar partículas virales infecciosas por ensayo de placa. Las monocapas se lavaron y se les agregó 200 µl de PBS1x por pozo para conservarse a -80 °C y posteriormente determinar copias genómicas virales y expresión relativa de citocinas por PCR tiempo real. Además, las monocapas celulares se fijaron con PFA al 4 % para determinar proteína viral por CELL-ELISA. Se realizaron dos unidades experimentales independientes cada una con un n=4.

Cuantificación de partículas virales infecciosas

La cuantificación de partículas virales infecciosas a partir de sobrenadantes recolectados de las curvas de replicación DENV y del modelo de infección DENV-ADE se hizo por titulación viral con la técnica de plaqueo. Se sembraron 8x10⁴ células VERO por pozo con DMEM al 2 % SFB en placas de 24 pozos y se incubaron a 37 °C y 5 % CO₂ durante 24 h. Posterior a la siembra se hicieron diluciones seriadas en base 10 de los sobrenadantes y se inoculó 200 uL de cada dilución sobre la monocapa celular; se incubó por 2 h a 37 °C y 5 % CO₂, se retiró el inóculo viral y se adicionó 1 mL de Carboximetilcelulosa (Sigma-Aldrich) CMC/DMEM 1.5 % /1X SFB al 2 %. Las titulaciones se dejaron incubando a 37 °C y 5 % CO₂ durante 9 días, luego se retiró el medio semisólido y se hicieron lavados con PBS IX. Las monocapas se fijaron usando 400 µL de paraformaldehído (PFA) al 4 % y se incubó a TA por 30 min.

Finalmente, se retiró el PFA y se hizo la tinción usando cristal violeta el cual se dejó actuar por 10 minutos, se retiró el colorante y las monocapas se lavaron con agua. Los pozos se dejaron secar para hacer el conteo de unidades formadoras de placas (UFP) y poder cuantificar las partículas virales infecciosas.

Cuantificación de proteína viral intracelular

La cuantificación de proteína viral en el ensayo DENV-ADE se realizó por la técnica de CELL-ELISA. Las monocapas de cada una de las condiciones experimentales se fijaron con PFA 4 % durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS 1x y luego se permeabilizaron con 0.1 % de Triton X-100 durante 30 minutos. Posteriormente se inactivaron las peroxidasas endógenas celulares con 0.3 % de H₂O₂ en 10 % metanol diluido en PBS y se incubó por 30 min. El bloqueo de sitios inespecíficos se hizo con SFB 10 % diluido en PBS y se incubó por 30 min a TA. Seguidamente se agregaron los anticuerpos primarios Anti-DENV según serotipo y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se hicieron lavados de las monocapas y se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa de BioRad y se incubó por 1 hora a TA. Se realizó un último lavado de las monocapas para agregar el sustrato TMB (3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina) el cual se incubó por 15 min y posteriormente se hicieron lecturas de las absorbancias a 450 nm en el lector de ELISA Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific). Adicionalmente, se agregó ácido clorhídrico 1 N y se hicieron lecturas a la longitud de onda de 450 nm.

Cuantificación de genoma viral

La extracción del RNA viral se hizo a partir de monocapas celulares de cada una de las condiciones experimentales incluidas en el modelo de infección DENV-ADE usando el kit MGIEasy nucleic acid extration, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La calidad y cantidad del RNA se determinó en un espectrofotómetro NANODROP™ ONE/ONEC (Thermo Fisher Scientific®). La síntesis de cDNA a partir de RNA se hizo con el kit High Capacity cDNA reverse transcription (Thermo Fisher Scientific®).

La cuantificación del genoma viral se hizo por PCR tiempo real (qPCR) utilizando el kit PowerUp™ SYBR Green Master Mix (Thermofisher Scientific®). El perfil térmico utilizado en el equipo QuantStudio design para los cuatro serotipos DENV fue 95 °C por 5 min, 35 ciclos (95 °C por 30 s, 55 °C por 45 s, 72 °C por 45 s) con una extensión final a 72 °C por 10 min. Los cebadores usados para cada serotipo DENV amplifican un fragmento de la región C-prM. Los cebadores para DENV-1 amplifican una región de 208 pb.

- D1-F-5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG AGA GAA ACC G-3'
- mTS1-R-5'-CCC GTA ACA CTT TGA TCG CT-3'

Los cebadores para DENV-2 amplifican una región de 119 pb.

- D1-F-5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG AGA GAA ACC G-3'
- mTS2-R-5'-CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG TTT-3'

Los cebadores para DENV-3 amplifican una región de 288 pb.

- D1-F-5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG AGA GAA ACC G-3'
- mTS3-R-5'-TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C-3'

Los cebadores para DENV-4 amplifican una región de 260 pb.

- D1-F-5'-TCA ATA TGC TGA AAC GCG AGA GAA ACC G-3'
- mTS4-R-5'-TTC TCC CGT TCA GGA TGT TC-3'

Los resultados de la qPCR se analizaron en el programa QuantStudio design & analysis software. Para la cuantificación absoluta de copias genómicas virales se usaron plásmidos recombinantes.

La normalidad de los datos se determinó por la prueba de Shapiro Wilk. La homocasticidad de las varianzas se determinó por el test de Bartlett. La significancia estadística se identificó usando la prueba paramétrica t-Student (datos con distribución normal) o la prueba no paramétrica U de Mann Whitney (datos con distribución no normal), considerando para todos los casos diferencias estadísticamente significativas con un valor p menor a 0.05 ($p < 0.05$).

Análisis estadísticos

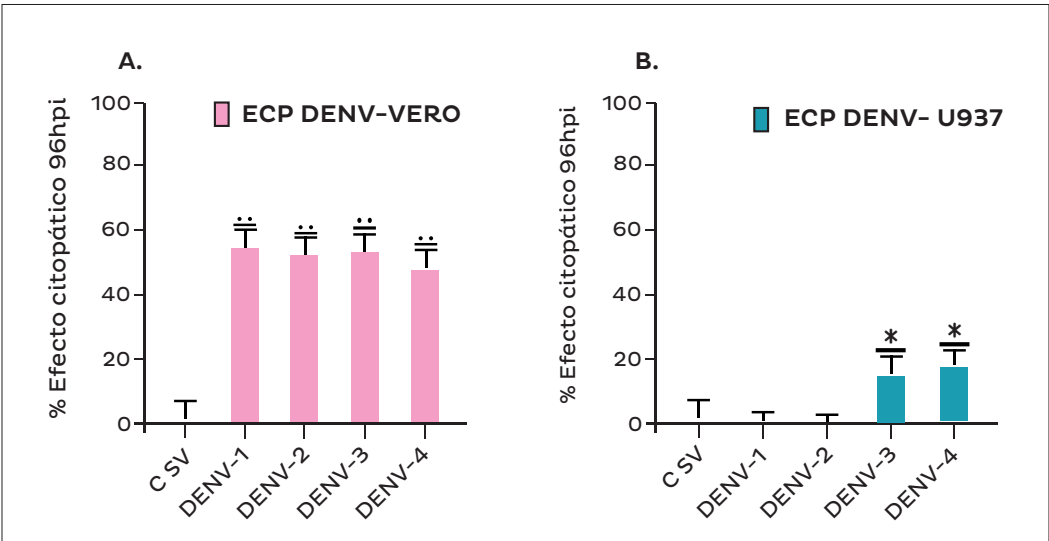
Para determinar los porcentajes de efecto citopático, se hicieron comparaciones entre las células no infectadas con virus (CSV) y las células infectadas con cada uno de los serotipos DENV. También un análisis de correlación entre el efecto citopático para cada serotipo con la prueba de Kruskal Wallis.

En los análisis derivados del modelo de infección DENV-ADE, se hicieron comparaciones entre los controles de infección primaria (células infectadas con cada serotipo DENV) y las infecciones en presencia de anticuerpos homotípicos y heterotípicos. También se hicieron comparaciones de la actividad replicativa de cada uno de los serotipos a diferentes tiempos posinfección, entre las líneas celulares U937 y VERO, para lo cual se usó la prueba t-Student con corrección de Welch.

1. El efecto citopático del virus dengue es diferente entre serotipos y población celular infectada

El ECP producido por cada uno de los serotipos del DENV sobre las células VERO y U937 se determinó por la técnica de MTT luego de 96 horas posinfección a una MOI de 1. En la línea celular VERO, DENV-1 indujo un ECP del 55.7 %, DENV-2 del 53.3 %, DENV-3 del 54 % y DENV-4 causó un ECP del 48.9 % (Figura 1A). En los monocitos adherentes (U937) los serotipos DENV-1 y DENV-2 no generaron ECP luego de 96 hpi; en cambio DENV-3 generó un ECP del 16.4 % y DENV-4 del 19.3 % (Figura 1B). El ECP causado por DENV fue mayor sobre las células VERO en comparación con las U937, estos resultados indican que el daño celular causado por DENV es diferente entre las poblaciones celulares permisibles a la infección, así como entre los serotipos infectantes. Los resultados de la viabilidad como una medida indirecta del ECP fueron estadísticamente significativos frente al control de células no infectadas.

Figural. Efecto citopático de los cuatro serotipos DENV en células VERO (A) y células U937 (B) a las 96 hpi. Los porcentajes relativos de ECP fueron calculados de acuerdo a los resultados obtenidos en la técnica de MTT. En todos los casos, se asumió que el control sin virus representa el 0 % de ECP. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control sin virus (* $p < 0,5$ ** $p < 0,01$) y las barras de error indican el error estándar de la media (n: 8).

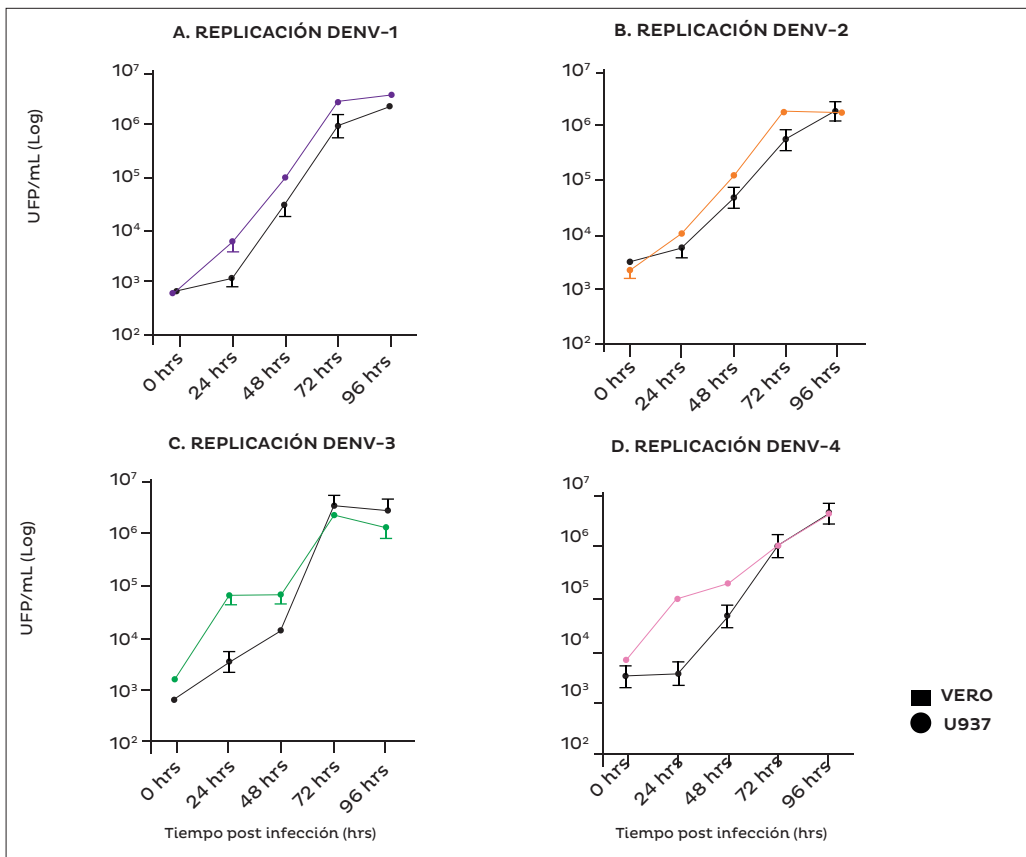


2. La actividad replicativa de DENV es diferente entre los serotipos y la población celular infectada

La actividad replicativa de los cuatro serotipos DENV en células VERO y U937 se determinó por cuantificación de partículas virales infecciosas a partir de titulaciones de sobrenadantes recolectados a diferentes tiempos posinfección 0, 24, 48, 72 y 96 h. Los serotipos DENV-1 y DENV-4 presentaron mayor actividad replicativa a las 96 hpi en ambas líneas celulares

(Figura 2A, 2D). La replicación de DENV-2 fue diferente entre las dos poblaciones celulares; en células VERO la mayor producción de partículas virales infecciosas se produjo a las 72 hpi, 2.6×10^6 UFP/mL; en cambio en las células U937 a las 96 hpi, 1.8×10^6 UFP/mL. (Figura 2B.) DENV-3 presentó su mayor actividad replicativa a las 72 hpi en células VERO, 2.3×10^6 UFP/mL y en U937, 3.2×10^6 UFP/mL (Figura 2C.) En general en células U937, se observó la mayor replicación viral a las 96 hpi, para los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-4 con excepción de DENV-3 que mostró la máxima producción de PVI a las 72hpi y evidenció una disminución replicativa del 12.3 % a las 96hpi. En las células VERO; DENV-1 y DENV-4 presentó mayor replicación a las 96 hpi y los serotipos DENV-2 y DENV-3 a las 72 hpi. Al comparar la replicación entre ambas líneas celulares, se observó que DENV-2 generó mayor producción de PVI en células VERO y DENV-3 en células U937 luego de 72 hpi. Por su parte, DENV-1 y 4 no presentaron diferencias significativas en la producción de PVI entre ambas poblaciones celulares hasta las 96 hpi.

Figura 2. Actividad replicativa de los cuatro serotipos DENV en células VERO y U937 a las 0, 24, 48, 72 y 96 hpi. Los resultados se calcularon a partir de la cuantificación de unidades formadoras de placas obtenidos por la técnica de plaqueo (UFP/mL). En todas las condiciones experimentales las células se infectaron con cada uno de los serotipos DENV a MOI de 1 y se incubaron a diferentes tiempos posinfección. Se llevaron a cabo dos experimentos independientes con tres réplicas cada uno (n: 6). Las barras de error indican el error estándar de la media.



3. La infección por DENV-1 y DENV-2 se potencia en presencia de anticuerpos Anti-DENV heterotípicos

Para determinar la potenciación de la infección de cada uno de los serotipos DENV dependiente de anticuerpos; utilizamos anticuerpos heterotípicos Anti-DENV de tipo IgG, los cuales se mezclaron con cada uno de los serotipos DENV para formar inmunocomplejos Virus-Anticuerpos, los cuales son fagocitados por las células U937; permitiendo la entrada viral y posterior aumento de la replicación, fenómeno conocido como amplificación de la infección dependiente de anticuerpos (ADE). La cuantificación de partículas virales infecciosas (UFP/mL) evidenció que la infección por DENV-1 se potenció en presencia de Anti-DENV-3 (2, 9 veces) y con Anti-DENV-4 (3, 2 veces), la concentración de Anti-DENV-2 usada neutralizó la infección por DENV-1, al igual que el anticuerpo homotípico Anti-DENV-1. (Figura 3). La infección por DENV-2 se amplificó con los anticuerpos Anti-DENV-1 (5, 8 veces), Anti-DENV-3 (6, 8 veces) y Anti-DENV-4 (90 veces), la infección se neutralizó en un 100 % en presencia de anticuerpos homotípicos Anti-DENV-2. (Figura 4) La concentración usada de anticuerpos Anti-DENV-heterotípicos no potenciaron la infección por los serotipos DENV-3 y DENV-4 reflejando una neutralización de esta. (Figura 5 y 6) El anticuerpo Anti-DENV-2 mostró un papel neutralizante para los 4 serotipos DENV. La producción de proteína viral no se vio afectada por el mecanismo de infección dependiente de anticuerpos y se correlacionan con los hallazgos antes descritos. Estos resultados permiten dilucidar el mecanismo de infección ADE para DENV; como uno de los aspectos fundamentales en la comprensión de la fisiopatogenia de la enfermedad y a la vez caracterizar la infección tanto primaria como secundaria asociada a este arbovirus y sus serotipos. Este modelo de infección permitirá a la vez establecer otros estudios relacionados con la respuesta inmune, antivirales y vacunas contra el dengue lo cual sigue siendo objeto de investigación hasta la fecha.

Figura 3. Infección por DENV-1 mediada por el mecanismo dependiente de anticuerpos. Los porcentajes relativos de infección fueron calculados a partir de los resultados obtenidos por la técnica de plaqueo (UFP/mL) de sobrenadantes colectados del sistema de infección ADE-DENV-1 (A), CELL-ELISA (B) y qPCR (C) de las monocapas celulares. En todos los casos, el control representa la infección sin anticuerpos o compuesto, que se asumió como 100 % de infección. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control. (* $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ t-Student) y las barras de error indican el error estándar de la media (n: 4).

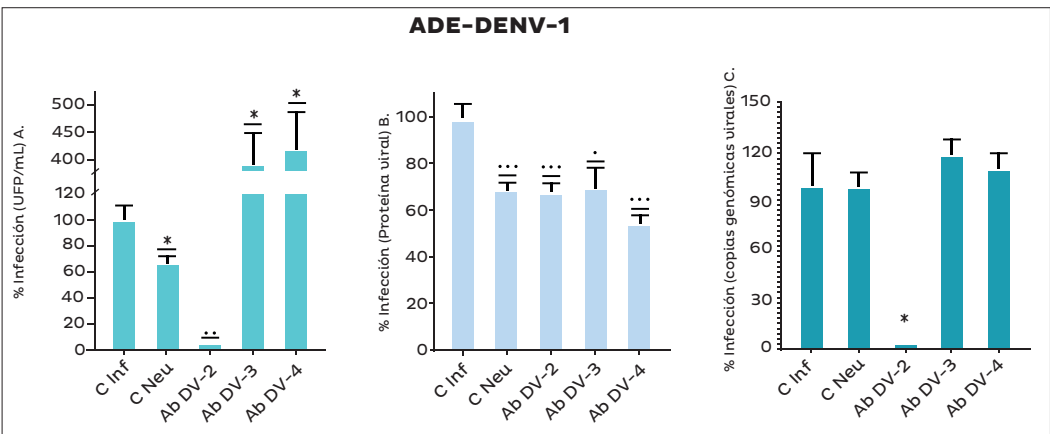


Figura 4. Infección por DENV-2 mediada por el mecanismo dependiente de anticuerpos. Los porcentajes relativos de infección fueron calculados a partir de los resultados obtenidos por la técnica de plaqueo (UFP/mL) de sobrenadantes colectados del sistema de infección ADE-DENV-2 (A), CELL-ELISA (B) y qPCR (C) de las monocapas celulares. En todos los casos, el control representa la infección sin anticuerpos o compuesto, que se asumió como 100 % de infección. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control. (* $p<0.5$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ t-Student) y las barras de error indican el error estándar de la media (n: 4).

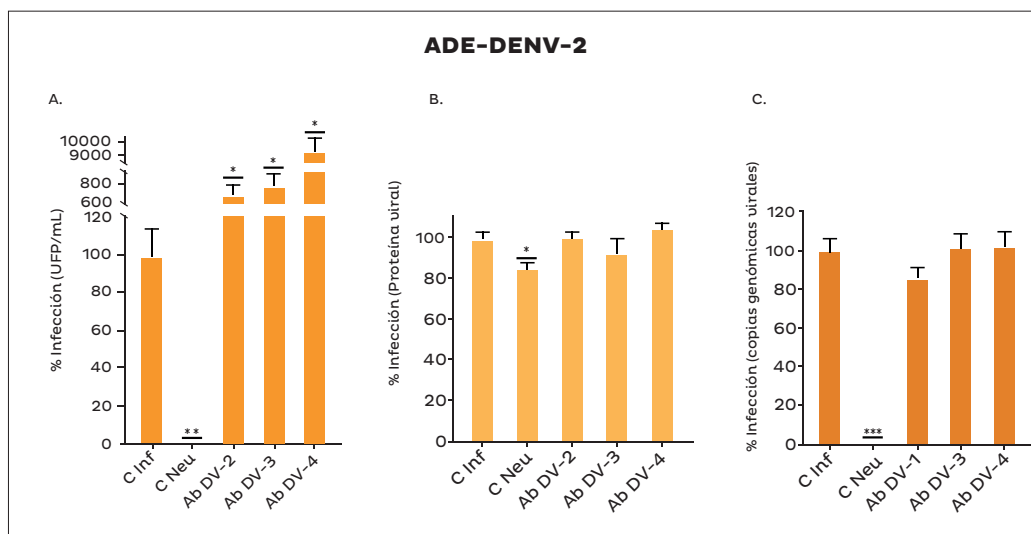


Figura 5. Infección por DENV-3 mediada por el mecanismo ADE. Los porcentajes relativos de infección fueron calculados a partir de los resultados obtenidos por la técnica de plaqueo (UFP/mL) de sobrenadantes colectados del sistema de infección ADE-DENV-3 (A), CELL-ELISA (B) y qPCR (C) de las monocapas celulares. En todos los casos, el control representa la infección sin anticuerpos o compuesto que se asumió como 100 % de infección. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control. (* $p<0.5$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ t-Student) y las barras de error indican el error estándar de la media (n: 4).

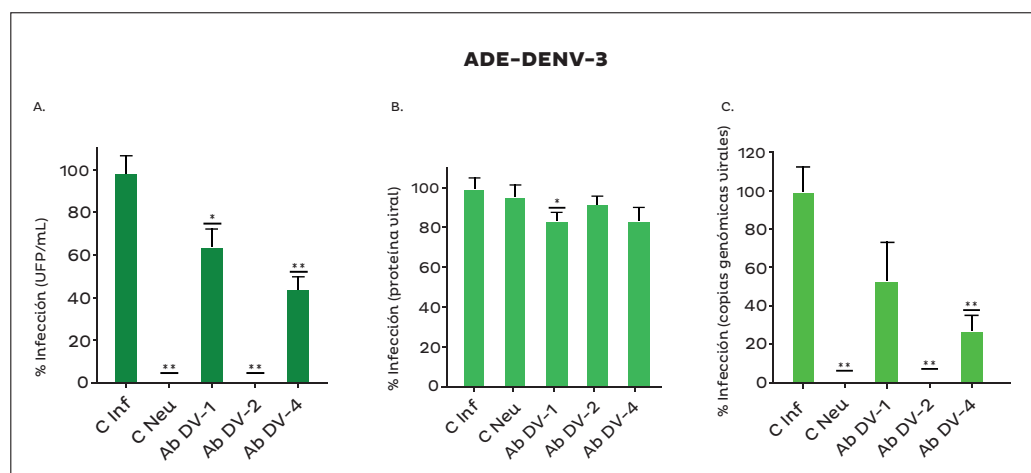
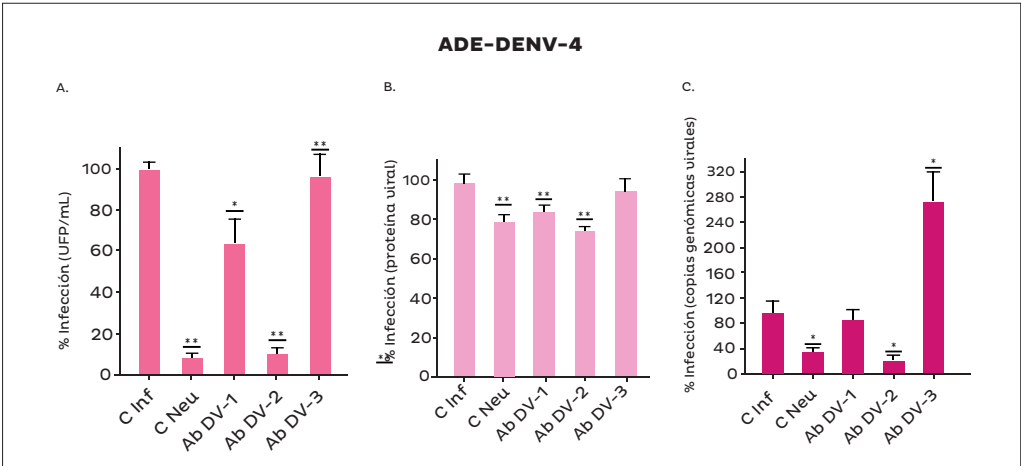


Figura 6. Infección por DENV-4 mediada por el mecanismo de ADE. Los porcentajes relativos de infección fueron calculados a partir de los resultados obtenidos por la técnica de plaqueo (UFP/mL) de sobrenadantes colectados del sistema de infección ADE-DENV-4 (A), CELL-ELISA (B) y qPCR (C) de las monocapas celulares. En todos los casos, el control representa la infección sin anticuerpos o compuesto, que se asumió como 100 % de infección. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control. (* $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ t-Student) y las barras de error indican el error estándar de la media (n: 4).



Discusión

Se han propuesto algunas hipótesis para explicar los mecanismos asociados con la patogenicidad y las formas clínicas de la infección por DENV, entre ellos factores genéticos del virus que determinan su virulencia y potencial epidémico. Así como también; el serotipo y cepa viral pueden influir en la actividad replicativa y el desarrollo de las formas graves del dengue. Con respecto a los factores del hospedero, se ha discutido sobre el papel patogénico de la respuesta inmune en la progresión a la infección secundaria, ya sea por el fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) o por el pecado antigénico original (16). Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa desempeñan un papel importante en la protección contra DENV, pero a la vez pueden inducir procesos patológicos que ponen en riesgo la salud de quienes presentan la enfermedad. Por lo tanto, comprender los mecanismos que regulan la protección mediada por el sistema inmune frente a la patogenicidad, es fundamental para el desarrollo de estrategias terapéuticas y de prevención eficaces contra el dengue (9,17).

Considerando que la inmunopatogénesis y las formas clínicas del dengue pueden ser dependientes del serotipo viral; en el presente trabajo se realizó la caracterización in vitro de la infección de los cuatro serotipos DENV en función del daño celular (ECP) y la actividad replicativa, sobre las líneas celulares VERO y U937; las cuales han sido ampliamente utilizadas en otros estudios con DENV (14). Los resultados mostraron que en células VERO; el efecto citopático causado por cada uno de los serotipos DENV, fue mayor al 50 % (Figura 1A). Un resultado similar se obtuvo en otro estudio donde el serotipo DENV-2 presentó un ECP del 75 % sobre las células VERO, luego de 5 días postinoculación (18). Otro estudio reportó un incremento en las vacuolas intracelulares y acúmulos de células VERO inducidos por DENV-1 (19). En cambio, en las células U937 los serotipos DENV-1 y

DENV-2 no indujeron ECP y el daño celular asociado a DENV-3 y DENV-4 fue menor al 20 %, luego de 96 horas posinfección (Figura 1B). Lo anterior coincide con lo reportado en un estudio con dos cepas diferentes de DENV-2, donde se evidenció que la infección con este serotipo no produjo cambios morfológicos en células U937 (20). También se ha reportado ausencia de ECP por DENV-3 en células C6/36 luego de 8 días posinfección (21). En células HeLa el serotipo DENV-1 no logró producir ECP (22). Un estudio sobre la mutagénesis de la proteína NS2A de DENV reveló un dominio responsable del efecto citopático inducido por el virus sobre las células HEK-293 (23).

La actividad replicativa o cinética de crecimiento de DENV también fue diferente entre cada uno de los serotipos y líneas celulares. DENV-1 presentó su mayor replicación a las 96 hpi en células VERO y U937 (Figura 2A), lo cual se correlaciona con los hallazgos encontrados en un estudio sobre infectividad viral, donde 3 cepas diferentes de DENV-1 presentaron mejores resultados a los 5 dpi; tanto en células VERO como HepG2 (24). DENV-2 mostró tener una actividad replicativa diferente entre ambas poblaciones celulares; en U937 se obtuvo la mayor replicación viral a las 96 hpi, en cambio en células VERO a las 72 hpi (Figura 2B), lo cual coincide con un estudio sobre la curva de crecimiento de DENV-2 en células U937 donde el mayor título viral se obtuvo a las 96 hpi (25). El serotipo DENV-3 evidenció la mayor producción de partículas virales infecciosas (PFU/mL) a las 72 hpi, tanto en células VERO como en U937 (Figura 2C). Por su parte, la replicación de DENV-4 mostró la mayor cuantificación de PVI a las 96 hpi en ambas líneas celulares (Figura 2D). Resultados similares se obtuvieron en un experimento; donde se determinó el título viral para los cuatro serotipos DENV en células VERO, U937 y BHK-21 (25). Las diferencias encontradas tanto en el ECP como en la replicación de los serotipos DENV pueden deberse a cambios en la expresión de los receptores celulares, vías de internalización, respuesta inmune celular, factores de transcripción y traducción, microambiente celular entre otros factores celulares específicos que son claves para la replicación viral, así como también a las diferencias genéticas y antigénicas entre cada uno de los serotipos DENV.

Luego del análisis de la infección primaria de cada uno de los serotipos DENV, se planteó investigar algunos aspectos asociados con la infección secundaria; para lo cual se estableció un modelo de infección *in vitro* con los cuatro serotipos DENV mediado por el mecanismo dependiente de anticuerpos (ADE), utilizando la línea celular U937. Este sistema permitió monocitos humanos, donde sueros humanos con inmunidad previa contra DENV-2, 3 o 4 potenciaron significativamente la infección por DENV-1 (26). Otro estudio demostró que anticuerpos maternos contra serotipos distintos a DENV-1 potenciaron la infección y enfermedad grave en lactantes infectados con DENV-1 (27). Además, células primarias humanas y modelos murinos con infecciones por DENV-1 evidenciaron que la infección se potenció en presencia de anticuerpos heterotípicos (28). Expuesto lo anterior el DENV-1 está implicado tanto en el desarrollo de infecciones primarias como secundarias y en la progresión a las manifestaciones clínicas graves de la enfermedad (29). Por su parte los anticuerpos Anti-DENV-2 mostraron un resultado antagónico; con una reducción significativa de la infección por DENV-1 en términos de genoma, proteína viral y PVI (Figura 3 A, B y C), lo cual puede asociarse a que la concentración de anticuerpos usada en el ensayo logró el espacio necesario para alcanzar el umbral de neutralización del virus, limitando de esta forma la unión e internalización viral y las subsecuentes etapas del ciclo replicativo de DENV.

La infección por DENV-2 mediada por anticuerpos homotípicos se neutralizó significativamente, evidenciando una reducción en la cuantificación de copias genómicas, proteínas virales y PVI. En contraste, los anticuerpos heterotípicos potenciaron la producción de partículas virales infecciosas de DENV-2; los anticuerpos Anti-DENV-1 la potenciaron 5.8 veces, An-

ti-DENV-3, 6. 8 veces y Anti-DENV-4, 90 veces. Sin embargo, la cuantificación de copias genómicas y proteína viral no mostró diferencias significativas en comparación con el control de infección primaria (Figura 4 A, B y C), lo cual puede estar asociado con la alta producción de nuevas PVI. Resultados similares se obtuvieron en un estudio con macrófagos U937-DC-SIGN donde la infección por DENV-2 se potenció en presencia de anticuerpos monoclonales 4G2 (30). Otro estudio con macrófagos humanos primarios evidenció una mejora de la infección por DENV-2 mediada por anticuerpos monoclonales, donde se obtuvo un incremento de 6, 8 veces en la cuantificación de PVI (31). Un estudio in vivo también demostró que la inmunización previa con DENV-1 potenció la infección de DENV-2 con un incremento en la carga viral, así como en las formas graves de la enfermedad (27).

En el modelo de infección DENV-3-ADE, los resultados de cuantificación de genoma y PVI indicaron que los anticuerpos homotípicos neutralizaron la infección en un 100 %, un resultado similar se obtuvo para la mediación con Anti-DENV-2. Además, se evidenció que los anticuerpos heterotípicos Anti-DENV-1 y Anti-DENV-4 también indujeron una reducción significativa en la producción de partículas virales infecciosas y copias genómicas virales (Figura 5 A, B y C). Lo anterior puede ser indicativo que la concentración de anticuerpos utilizada en el ensayo no representó niveles subneutralizantes capaces de inducir la opsonización del virus y la consecuente fagocitosis de este, que pudiera potenciar la infección. Esto también se correlaciona con lo reportado en otras investigaciones, donde se caracterizar la infección en presencia de anticuerpos homotípicos y heterotípicos, en cuanto a producción de partículas virales infecciosas (UFP/mL), proteínas y copias genómicas virales.

Los resultados de cuantificación de partículas virales infecciosas y proteína viral demostraron que la infección por DENV-1 se neutralizó significativamente en presencia de anticuerpos homotípicos, en cambio los Ac heterotípicos Anti-DENV-3 y Anti-DENV-4 potenciaron la infección 3.9 y 4.2 veces respectivamente, en comparación con el control de infección primaria. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos para la proteína viral; cuya reducción puede deberse a que parte de estas son usadas en la formación de nuevos viriones o PVI (Figura 3 A y B). Hallazgos similares se obtuvieron en un ensayo con células K562 y monocitos humanos, donde sueros humanos con inmunidad previa contra DENV-2, 3 o 4 potenciaron significativamente la infección por DENV-1 (26). Otro estudio demostró que anticuerpos maternos contra serotipos distintos a DENV-1 potenciaron la infección y enfermedad grave en lactantes infectados con DENV-1 (27). Además, células primarias humanas y modelos murinos con infecciones por DENV-1 evidenciaron que la infección se potenció en presencia de anticuerpos heterotípicos (28). Expuesto lo anterior el DENV-1 está implicado tanto en el desarrollo de infecciones primarias como secundarias y en la progresión a las manifestaciones clínicas graves de la enfermedad (29). Por su parte los anticuerpos Anti-DENV-2 mostraron un resultado antagónico; con una reducción significativa de la infección por DENV-1 en términos de genoma, proteína viral y PVI (Figura 3 A, B y C), lo cual puede asociarse a que la concentración de anticuerpos usada en el ensayo logró el espacio necesario para alcanzar el umbral de neutralización del virus, limitando de esta forma la unión e internalización viral y las subsecuentes etapas del ciclo replicativo de DENV.

La infección por DENV-2 mediada por anticuerpos homotípicos se neutralizó significativamente, evidenciando una reducción en la cuantificación de copias genómicas, proteínas virales y PVI. En contraste, los anticuerpos heterotípicos potenciaron la producción de partículas virales infecciosas de DENV-2; los anticuerpos Anti-DENV-1 la potenciaron 5.8 veces, Anti-DENV-3, 6. 8 veces y Anti-DENV-4, 90 veces. Sin embargo, la cuantificación de copias genómicas y proteína viral no mostró diferencias significativas en comparación con

el control de infección primaria (Figura 4 A, B y C), lo cual puede estar asociado con la alta producción de nuevas PVI. Resultados similares se obtuvieron en un estudio con macrófagos U937-DC-SIGN donde la infección por DENV-2 se potenció en presencia de anticuerpos monoclonales 4G2 (30). Otro estudio con macrófagos humanos primarios evidenció una mejora de la infección por DENV-2 mediada por anticuerpos monoclonales, donde se obtuvo un incremento de 6, 8 veces en la cuantificación de PVI (31). Un estudio in vivo también demostró que la inmunización previa con DENV-1 potenció la infección de DENV-2 con un incremento en la carga viral, así como en las formas graves de la enfermedad (27).

En el modelo de infección DENV-3-ADE, los resultados de cuantificación de genoma y PVI indicaron que los anticuerpos homotípicos neutralizaron la infección en un 100 %, un resultado similar se obtuvo para la mediación con Anti-DENV-2. Además, se evidenció que los anticuerpos heterotípicos Anti-DENV-1 y Anti-DENV-4 también indujeron una reducción significativa en la producción de partículas virales infecciosas y copias genómicas virales (Figura 5 A, B y C). Lo anterior puede ser indicativo que la concentración de anticuerpos utilizada en el ensayo no representó niveles subneutralizantes capaces de inducir la opsonización del virus y la consecuente fagocitosis de este, que pudiera potenciar la infección. Esto también se correlaciona con lo reportado en otras investigaciones, donde se ha documentado que los anticuerpos generados en la infección primaria pueden ejercer una neutralización heterotípica transitoria; sobre todo, cuando los títulos serológicos de anticuerpos son altos (32). Un estudio con DENV-3 en células U937 en las que se usaron diferentes concentraciones de anticuerpos IgG mostró que la mejora de la infección fue inversamente proporcional con la concentración de anticuerpos, donde la mayor concentración de anticuerpos ensayada causó una reducción significativa de la infección, lo cual justifica el hallazgo encontrado en el presente estudio (30,33).

La infección por DENV-4 también se neutralizó en presencia de anticuerpos homotípicos con una reducción significativa en la cuantificación del genoma viral y PVI. Un resultado similar se evidenció con Anti-DENV-2. Los anticuerpos heterotípicos Anti-DENV-1 también redujeron la producción de partículas virales infecciosas; en cambio los anticuerpos Anti-DENV-3 potenciaron la replicación viral con un incremento del 1,7 veces en la cuantificación de copias genómicas virales, en comparación con el control de infección primaria. Sin embargo, no hubo incremento en la producción de partículas virales infecciosas (Figura 6 A, B y C), esto sugiere que probablemente etapas posteriores a la replicación; como la traducción, ensamblaje, maduración o liberación no se llevaron a cabo eficazmente impidiendo la formación de nuevas PVI. Resultados obtenidos en un estudio demostraron que DENV-4 en presencia de anticuerpos monoclonales IgG aumentó la infectividad de las células U937 de forma dependiente a la concentración de anticuerpos (30). Otro estudio encontró que aislamientos clínicos de DENV-4 mostraron una potenciación de la infección en células U937 en presencia de anticuerpos, pero no se logró el mismo efecto con cepas adaptadas de laboratorio (34). Lo anterior sugiere; que las diferencias encontradas en este modelo pueden deberse a variaciones en la afinidad que pueden tener cada uno de los anticuerpos por los sitios de unión del virus, así como también a la concentración de anticuerpos que determinan su efecto neutralizante o subneutralizante sobre la infección. En general, nuestros resultados demuestran que en la infección con DENV los anticuerpos juegan un papel dual en el desarrollo y evolución de esta. De acuerdo con las propiedades y cantidades de los anticuerpos homólogos o heterólogos, la interacción virus-anticuerpo puede ser protectora o potenciadora de la infección. El número de moléculas de Acs requeridas para neutralizar la infectividad, es un tema que ha sido ampliamente estudiado y para el caso de los flavivirus; se ha descrito que la inactivación ocurre en función del número de moléculas de anticuerpos unidas al virus (30).

Finalmente, los resultados confirmaron que el sistema de infección in vitro con células U937 permitió caracterizar la infección primaria de los cuatro serotipos DENV y a la vez establecer un modelo de infección mediado por el mecanismo de potenciación dependiente de anticuerpos, donde se logró analizar el efecto neutralizante y subneutralizante de los anticuerpos homotípicos y heterotípicos sobre la infección por DENV. Además, permite estudiar aspectos relacionados con la patogénesis, respuesta inmune y ensayos antivirales que pueden implementarse para el desarrollo de estrategias terapéuticas y de controles eficaces contra el dengue.

Conclusión

La caracterización de la infección primaria por DENV en las líneas celulares VERO y U937 fue diferente entre cada uno de los cuatro serotipos. El efecto citopático evidenció ser mayor en células VERO en comparación con las células U937. De la misma forma; la actividad replicativa de DENV mostró diferencias significativas entre los serotipos y las líneas celulares evaluadas. Por su parte en la infección secundaria mediada por anticuerpos, únicamente los serotipos DENV-1 y DENV-2 potenciaron la producción de partículas virales infecciosas en presencia de anticuerpos heterotípicos, encontrándose que la concentración de anticuerpos monoclonales (25 ng/uL) usada en el modelo de infección DENV-ADE, tuvo un efecto neutralizante o subneutralizante dependiente del serotipo viral.

El efecto citopático causado por DENV fue diferente entre cada una de las líneas celulares, en células VERO los cuatro serotipos DENV indujeron un ECP mayor al 50 %, en cambio en células U937, los serotipos DENV-1 y DENV-2 no causaron cambios morfológicos y el daño celular asociado a la infección por DENV-3 y DENV-4 fue inferior al 20 %. La actividad replicativa o cinética de crecimiento de DENV fue diferente entre cada uno de los serotipos y líneas celulares, DENV-1 y DENV-2 evidenciaron la mayor producción de partículas virales infecciosas a las 96 hpi, tanto en células VERO como en U937. El serotipo DENV-2 presentó su mejor replicación a las 96 hpi en células U937 y en células VERO a las 72 hpi. Por su parte DENV-3 tuvo su mejor actividad replicativa a las 72 hpi en ambas líneas celulares. La infección por cada uno de los serotipos DENV se neutralizó en presencia de anticuerpos homotípicos. Los anticuerpos Anti-DENV-2 también mostraron un efecto neutralizante contra los tres serotipos heterólogos de DENV. Los anticuerpos Anti-DENV-3 presentaron un efecto subneutralizante contra los tres serotipos heterólogos de DENV, favoreciendo el mecanismo de infección dependiente de anticuerpos. La infección por DENV-1 mediada por anticuerpos heterotípicos se potenció en presencia de Anti-DENV-3 y Anti-DENV-4. Por otro lado DENV-2 se potenció en presencia de cada uno de los anticuerpos heterotípicos Anti-DENV. El serotipo DENV-3 no evidenció mejora de la infección por los anticuerpos heterotípicos y DENV-4 únicamente se potenció con los anticuerpos Anti-DENV-3.

A partir de los resultados se pretende establecer el modelo de infección con DENV, mediado por el mecanismo de potenciación dependiente de anticuerpos, en células primarias como PBMC o en modelos animales que permitan acercarnos más al contexto natural de la infección. Además, integrar estudios de proteómica y metabolómica a manera que se pueda comprender o dilucidar procesos o vías metabólicas implicadas en la patogénesis de la infección primaria y secundaria por DENV. Adaptar nuestro modelo de infección DENV-ADE a investigaciones que evalúan compuestos con potencial Anti-DENV, a fin de comprender los efectos y posibles mecanismos de acción en la infección mediada por anticuerpos e integrar otras técnicas moleculares, serológicas e inmunológicas, con el objetivo de profundizar y validar cada uno de nuestros resultados.

Referencias

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446): 504-7.
2. Kularatne SA, Dalugama C. Dengue infection: Global importance, immunopathology and management. *Clin Med (Lond)*. 2022; 22(1): 9-13.
3. Gupta A, Rijhwani P, Pahadia MR, Kalia A, Choudhary S, Bansal DP, et al. Prevalence of Dengue Serotypes and Its Correlation With the Laboratory Profile at a Tertiary Care Hospital in Northwestern India. *Cureus*. 2021; 13(5): e. 15029.
4. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(4): 564-81.
5. Liu Y, Wang M, Yu N, Zhao W, Wang P, Zhang H, et al. Trends and insights in dengue virus research globally: a bibliometric analysis (1995-2023). *J Transl Med*. 2024; 22(1): 818.
6. Leah C. Katzelnick LG, 2 M. Elizabeth Halloran, 3, 4 Juan Carlos Mercado, 5 Guillermina Kuan, 6 Aubree Gordon, 7 Ángel Balmaseda, 5 Eva Harrisl. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. Research report. 2017.
7. Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Curr Microbiol*. 2021; 78(1): 17-32.
8. Bournazos S, Gupta A, Ravetch JV. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat Rev Immunol*. 2020; 20(10): p. 633-43.
9. Cáceres Munar BA, Castellanos Parra JE, Rodríguez Panduro MH. Amplificación de la infección dependiente de anticuerpos en la inmunopatogénesis del dengue grave, implicaciones para el desarrollo y uso de las vacunas. *Acta Biológica Colombiana*. 2019; 24(3): 439-51.
10. J I. Dengue haemorrhagic fever among adults: an observational study in Chennai, south India. 2010.
11. Puerta-Guardo H, Raya-Sandino A, González-Mariscal L, Rosales VH, Ayala-Dávila J, Chávez-Mungia B, et al. The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability. *J Virol*. 2013; 87(13): 7486-501.
12. Wegman AD, Waldran MJ, Bahr LE, Lu JQ, Baxter KE, Thomas SJ, et al. DENV-specific IgA contributes protective and non-pathologic function during antibody-dependent enhancement of DENV infection. *PLoS Pathog*. 2023; 19(8): e. 1011616.
13. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol*. 2008; Appendix 4: Appendix 4E.
14. Loaiza-Cano V, Monsalve-Escudero LM, Restrepo MP, Quintero-Gil DC, Pulido Muñoz SA, Galeano E, et al. In Vitro and In Silico Anti-Arboviral Activities of Dihalogenated Phenolic Derivates of L-Tyrosine. *Molecules*. 2021; 26(11).

15. Jasso-Miranda C, Herrera-Camacho I, Flores-Mendoza LK, Domínguez F, Vallejo-Ruiz V, Sánchez-Burgos GG, et al. Antiviral and immunomodulatory effects of polyphenols on macrophages infected with dengue virus serotypes 2 and 3 enhanced or not with antibodies. *Infect Drug Resist*. 2019; 12: 1833-52.
16. Wan SW, Wu-Hsieh BA, Lin YS, Chen WY, Huang Y, Anderson R. The monocyte-macrophage-mast cell axis in dengue pathogenesis. *J Biomed Sci*. 2018; 25(1): 77.
17. Costin JM, Zaitseva E, Kahle KM, Nicholson CO, Rowe DK, Graham AS, et al. Mechanistic study of broadly neutralizing human monoclonal antibodies against dengue virus that target the fusion loop. *J Virol*. 2013; 87(1): 52-66.
18. C. Rosmari Rodríguez-Roche LLM, C. Mayling Álvarez Vera, Luis Morier Díaz, C. María G. Guzmán Tirado. Propiedades biológicas de cepas de virus dengue serotipo 2 aisladas durante la epidemia en Santiago de Cuba, 1997. *Rev Cubana Med trop*. 1997.
19. Mildre E. Disla FH y LH. Alteraciones ultraestructurales inducidas por virus dengue en cultivos celulares. *Rev Cost de Ciencias Médicas*. 2006.
20. Martínez-Betancur V, Martínez-Gutierrez M. Proteomic profile of human monocytic cells infected with dengue virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016; 6(11): 914-23.
21. Pimiento F. Comparación de la capacidad de replicación in vitro, susceptibilidad a neutralización por anticuerpos y tipo genético entre una cepa de virus dengue serotipo 3 de Colombia y una del sur de Asia 2018.
22. Buckley SM. Serial Propagation of Types 1, 2, 3 and 4 Dengue Virus in HeLa Cells with Concomitant Cytopathic Effect. *Nature*. 1961; 192(4804): 778-9.
23. Wu RH, Tsai MH, Tsai KN, Tian JN, Wu JS, Wu SY, et al. Mutagenesis of Dengue Virus Protein NS2A Revealed a Novel Domain Responsible for Virus-Induced Cytopathic Effect and Interactions between NS2A and NS2B Transmembrane Segments. *J Virol*. 2017; 91(12).
24. Alicia Aguilar Barroso NAB, Luis Morier Díaz, Ela María Pérez Hernández. Evaluación de la infectividad de cepas de dengue 1 en las líneas celulares HepG2 y Vero. *Rev Cubana Med Trop*. 2005.
25. Varela LN Hernández JP, Díaz PD. Estandarización de una metodología para la cuantificación de títulos virales por citometría de flujo virus dengue y zika. 2020.
26. de Alwis R, Williams KL, Schmid MA, Lai CY, Patel B, Smith SA, et al. Dengue viruses are enhanced by distinct populations of serotype cross-reactive antibodies in human immune sera. *PLoS Pathog*. 2014; 10(10): e. 1004386.
27. Ng JK, Zhang SL, Tan HC, Yan B, Martínez JM, Tan WY, et al. First experimental in vivo model of enhanced dengue disease severity through maternally acquired heterotypic dengue antibodies. *PLoS Pathog*. 2014; 10(4): e. 1004031.
28. Flipse J, Diosa-Toro MA, Hoornweg TE, van de Pol DP, Urcuqui-Inchima S, Smit JM. Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Primary Human Macrophages; Balancing Higher Fusion against Antiviral Responses. *Sci Rep*. 2016; 6: 29201.

29. Leah C. Katzelnick LG, M. Elizabeth Halloran, Juan Carlos Mercado, Guillermina Kuan, Aubree Gordon, Ángel Balmaseda, Eva Harris. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Virology*. 2017.
30. Green AM, Beatty PR, Hadjilaou A, Harris E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol*. 2014; 426(6): 1148-60.
31. Ana P. Goncalvez REE, Marisa St. Claire, Robert H. Purcell, and Ching-Juh Lai. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. 2017.
32. Anderson KB, Gibbons RV, Cummings DA, Nisalak A, Green S, Libraty DH, et al. A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. *J Infect Dis*. 2014; 209(3): 360-8.
33. Carro AC. La entrada de virus dengue a líneas celulares humanas en la infección primaria en ausencia o presencia de anticuerpos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. 2015.
34. Wikan N, Libsittikul S, Yoksan S, Auewarakul P, Smith DR. Delayed antibody dependent enhancement of low passage dengue virus 4 isolates. *BMC Res Notes*. 2015; 8: 399.