

### 33. Virología Molecular

#### **Modulación de la actividad del receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) como posible blanco terapéutico frente a una infección por el virus dengue**

Torti, María Florencia; Damonte, Elsa; García, Cybele; Giovannoni, Federico

[mftorti@qb.fcen.uba.ar](mailto:mftorti@qb.fcen.uba.ar) ; [edamonte@qb.fcen.uba.ar](mailto:edamonte@qb.fcen.uba.ar); [cygarcia@qb.fcen.uba.ar](mailto:cygarcia@qb.fcen.uba.ar) ;  
[fedegiova@qb.fcen.uba.ar](mailto:fedegiova@qb.fcen.uba.ar)

Laboratorio de Estrategias Antivirales, Departamento de Química Biológica,

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,

Universidad de Buenos Aires

---

#### **Resumen**

El receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) es un factor de transcripción activado por ligando asociado al mecanismo de depuración de xenobióticos. Varios estudios señalaron que AHR es capaz de modular el sistema inmune. Se ha descrito el efecto de la activación del AHR sobre la señalización de las vías de IFN. El virus dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y presenta cuatro serotipos (1-4) capaces de generar enfermedad en seres humanos al ser transmitidos por mosquitos del género *Aedes*. Actualmente, se considera que es el virus transmitido por artrópodos de mayor importancia a nivel global. La única vacuna que se ha desarrollado ha demostrado baja efectividad y no existe un

tratamiento específico, por ello es crucial el desarrollo de nuevas estrategias antivirales para el tratamiento del mismo. En el presente trabajo evaluamos la posibilidad de modular la actividad del AHR como posible blanco terapéutico frente a una infección por DENV. Se emplearon agonistas y antagonistas del receptor para tratar cultivos celulares que luego fueron infectados con DENV. Se determinó el rendimiento viral mediante titulaciones por formación de placas de lisis, se cuantificó el genoma viral y proteína viral por RT-PCR e inmunofluorescencia, respectivamente. Los datos preliminares obtenidos permitieron evidenciar que la vía de señalización del AHR está involucrada en

el proceso de replicación de DENV y posee promisorias perspectivas para ser considerada como un blanco terapéutico.

**Palabras clave:** Antivirales, dengue, receptor de hidrocarburo de arilo.

## Introducción

El receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) es un factor de transcripción activado por ligando que clásicamente ha sido asociado al mecanismo de depuración de xenobióticos como un actor clave en la regulación de la síntesis de enzimas que participan en el proceso de detoxificación de los mismos.

En las últimas décadas, se ha podido identificar que el AHR no sólo es capaz de intervenir en la regulación de genes asociados al metabolismo de xenobióticos, sino que además es capaz de interactuar con NFκB, un factor de transcripción crucial en lo que refiere a la activación del sistema inmune innato. Recientemente se ha podido demostrar que NFκB, también es capaz de regular la expresión del AHR, generándose así un mecanismo de retroalimentación negativa entre los mismos. De esta manera, comienzan a surgir contundentes evidencias de la importancia del AHR en la regulación del sistema inmune<sup>1,2</sup>.

Varios reportes han demostrado que AHR está involucrado en la diferenciación y funcionamiento de

linfocitos T, macrófagos y células dendríticas. En lo que respecta a infecciones virales, se puso de manifiesto que la estimulación del AHR, reduce la supervivencia de ratones infectados con el virus influenza A como consecuencia de la inhibición de la proliferación y diferenciación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.<sup>3</sup> Por otro lado, recientemente, un estudio ha descrito el efecto de la activación del AHR sobre la señalización de las vías del interferón (IFN); principales citoquinas involucradas en la respuesta inmune innata antiviral. En dicho trabajo, se ha demostrado que fibroblastos de ratones *knock-out* (KO) para el AHR, presentan una activación de la vía del IFN marcadamente más elevada al ser infectados con diferentes tipos de virus que aquellos provenientes de ratones salvajes (wild type, wt). Esto, finalmente termina provocando una disminución en la replicación de virus tales como el virus del herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y el virus influenza A.<sup>4</sup>

El virus dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae* y presenta cuatro serotipos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) capaces de generar enfermedad en seres humanos al ser transmitidos por mosquitos del género *Aedes*. En los últimos 50 años, la enfermedad por DENV ha aumentado su incidencia, pasando de tener una presentación esporádica a ser

considerado un problema de salud pública con grandes efectos a nivel social y económico<sup>5</sup>. Actualmente, se considera que el DENV es el virus transmitido por artrópodos de mayor importancia a nivel global.

La infección por DENV resulta en un amplio espectro clínico que tradicionalmente se ha clasificado en: infección asintomática o inaparente, cuadro febril por dengue, fiebre hemorrágica por dengue y síndrome de shock por dengue. Entre los cuadros clínicos benignos que provoca se encuentran una infección asintomática, en la que el paciente no suele presentar manifestación alguna de la infección viral y por otro lado, el cuadro febril por dengue, que se caracteriza por ser semejante a un síndrome gripal sin los signos y síntomas de compromiso respiratorio y que ocasionalmente puede cursar con rash. La infección confiere protección de por vida frente al serotipo que ha causado la enfermedad. Por otro lado, en ciertas ocasiones pueden presentarse cuadros de mayor gravedad como lo son la fiebre hemorrágica por dengue y el síndrome de shock por dengue que poseen una alta tasa de mortalidad <sup>5</sup>. Estos últimos, se han asociado a la infección consecutiva por diferentes serotipos del virus, debido a que los anticuerpos que serían protectores frente al virus del serotipo que ha causado

la primo-infección, facilitarían la infección por otro serotipo, generándose por tanto, un cuadro de mayor gravedad en menor tiempo; este fenómeno se conoce como Antibody- Dependent Enhancement (ADE).<sup>6</sup> Por esto mismo es de suma importancia la generación de vacunas capaces de proteger contra los cuatro tipos de dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). Dado que aún no se ha aprobado en nuestro país el uso de la única vacuna que se ha desarrollado (Dengvaxia) y que no existe un tratamiento específico, es de crucial importancia el desarrollo de nuevas estrategias antivirales para el tratamiento del mismo.

En el presente proyecto nos propusimos evaluar la posibilidad de modular la actividad del AHR como posible blanco terapéutico frente a una infección por DENV.

### **Objetivos**

Evaluar la posibilidad de utilizar la vía de señalización del receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) como blanco terapéutico frente a una infección por el virus dengue (DENV).

## Materiales y Métodos

### Líneas celulares y medios de cultivo empleados

- C6/36 HT

Línea celular proveniente de larvas de *A.albopictus*; se encuentra adaptada a crecer a 33°C. El medio de cultivo de elección para estas células es medio L-15 (Leibovitz, GIBCO) suplementado con 0,3% de caldo triptosa fosfato, 0,02% de glutamina, 1% de solución de aminoácidos no esenciales MEM (GIBCO), 50µg/ml de gentamicina y suero fetal bovino inactivado (SFB, Sigma) 10% para lograr un óptimo crecimiento de las células o al 2% para la obtención de los stocks virales.

- A549

Línea celular proveniente de un adenocarcinoma de pulmón humano. El medio de cultivo de elección para estas células es medio mínimo esencial Eagle (MEM, GIBCO) suplementado con 5% de suero de ternera, 1mM de piruvato de sodio (Sigma), 2mM de L-glutamina (GIBCO), una mezcla buffer compuesta por HCl/NaHCO<sub>3</sub> y 50µg/ml de gentamicina.

- Vero

Línea celular proveniente de epitelio de riñón de mono verde africano. Esta línea presenta la particularidad de carecer de la capacidad de producir interferones de tipo I (IFN-I). El medio de cultivo de elección para estas células es medio mínimo

esencial Eagle (MEM, GIBCO) suplementado con 5% de suero de ternera y 50µg/ml de gentamicina. En los ensayos de titulación viral, como medio de plaqueo se utilizó MEM con metilcelulosa al 1% (Sigma).

### Obtención de stocks virales

La obtención de los stocks virales se realizó infectando la línea celular de mosquito C6/36 y cosechando el sobrenadante de los cultivos a diferentes tiempos post-infección. Para el desarrollo experimental se partió de un cultivo de C6/36 en el que la monocapa de células se encontraba en estado confluyente. El primer paso consistió en retirar el medio Leibovitz con SFB al 10% que contenían las células. Luego de la remoción del medio, se procedió a inocular 500µl de un stock de:

- DENV-1, cepa **HW** (Hawaii) DENV-2, cepa **NGC** (New Guinea C)
- DENV-2, cepa Thailand/**16681**/1984
- DENV-3, cepa Philippines/**H87**/1956
- DENV-4, cepa aislamiento **8124**

Luego, las células se incubaron durante 60 minutos a 33°C. Posteriormente se retiró el inóculo viral y se reemplazó por 6ml de medio Leibovitz fresco con SFB al 2%. Finalmente se incubó la botella durante una semana a 33°C.

La toma de muestra se realizó desde el tercer día post- infección (3dpi) al séptimo día post-infección (7dpi) y

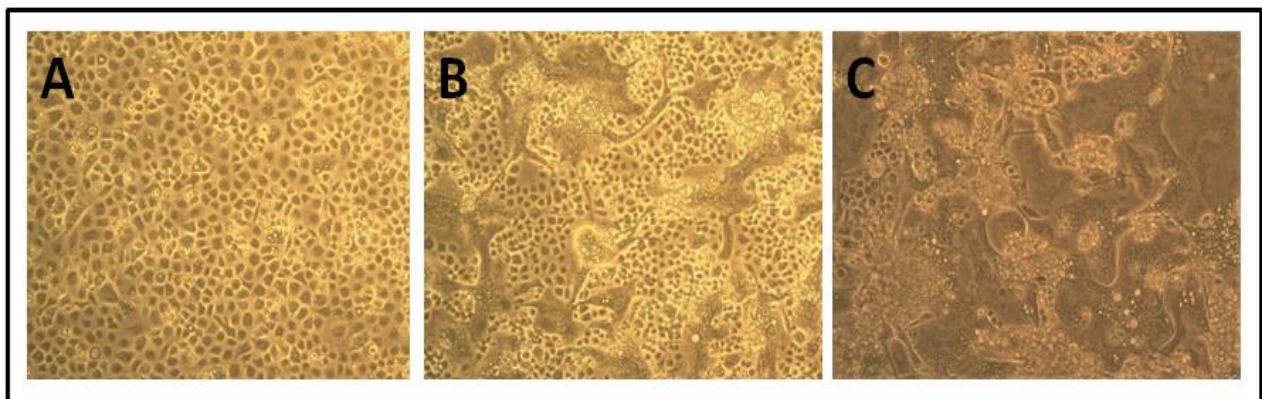


consistió en guardar el sobrenadante de cultivo a  $-80^{\circ}\text{C}$  (en todos los casos se alicuotó  $50\mu\text{l}$  de muestra para realizar la titulación viral) e incorporar  $6\text{ml}$  de medio fresco al cultivo luego de la cosecha.

Por último se procedió a realizar la titulación viral de las muestras colectadas durante diferentes días post- infección. Para ello se prepararon microplacas de 24 pocillos en las que en cada pocillo se tenía un cultivo de células Vero en el que la monocapa de células se encontraba en estado confluyente. El primer paso consistió preparar las diluciones de las muestras a evaluar. Para ello se descongeló en hielo las alícuotas de  $50\mu\text{l}$  de los stocks previamente mencionadas y se pasó a realizar diluciones seriadas de los mismos al décimo en medio mínimo esencial Eagle (MEM, GIBCO) suplementado con  $50\mu\text{l}/\text{ml}$  de gentamicina, suero de ternero al 1,5% y una mezcla buffer de  $\text{HCl}$  y  $\text{NaHCO}_3$ .

Las diluciones se mantuvieron en

frío hasta ser inoculadas. Luego, se retiró el medio de cultivo que contenían las células, se procedió a inocular  $200\mu\text{l}/\text{pocillo}$  de cada dilución realizada y se incubó las células durante 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, procurando agitar la microplaca cada 15 minutos para evitar la sequedad de los pocillos y distribuir el inóculo viral en forma homogénea en toda la superficie del pocillo. Posteriormente se retiró la suspensión viral de cada pocillo y se reemplazó por  $1\text{ml}$  de medio MEM con metilcelulosa al 1%. Finalmente se incubó la microplaca durante una semana a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Por último, se fijaron las células con formol al 10%, se tiñeron con cristal violeta y se procedió a realizar el recuento de las placas de lisis en cada pocillo. El resultado del título del stock se definió de acuerdo al recuento de unidades formadoras de placa de lisis por mililitro (UFP/ml). Ver *Figura 1*.



**Figura 1.** Línea celular C6/36 HT en las condiciones no infectada(A), quinto día post-infección (B) y sexto día post-infección (C) con DENV2-NGC. En las figuras 1B y 1C, se observa la formación de los sincicios característicos de este tipo de infección. Aumento de 10X.

### Citotoxicidad de drogas

La elección del rango de concentración de las drogas a utilizar se realizó evaluando la viabilidad de los cultivos celulares por microscopía óptica frente a diferentes concentraciones de los compuestos que se deseaban ensayar.

Las drogas de elección fueron compuestos capaces de modular la actividad del AHR : indoxilo sulfato de potasio o I3S (Sigma) que tiene capacidad de actuar como un agonista del receptor en cuestión y por otro lado, se utilizó CH223191(Tocris Bioscience) que es un antagonista específico del AHR. La preparación de los stocks se realizó por resuspensión de la droga sólida en dimetilsulfóxido (DMSO). En el caso de I3S, las alícuotas fueron guardadas a -20°C, mientras que en el caso del antagonista, las mismas se conservaron a -80°C y se tomó especial recaudo en protegerlas de la luz debido a que dicho compuesto es fotosensible. Los rangos de concentraciones elegidos para cada droga fueron: 50-600µM en el caso de I3S y de 2-33µM para CH223191.

### Ensayos antivirales

El ensayo consistió en realizar una infección de un cultivo celular previamente tratado con diferentes concentraciones de

las drogas a ensayar y al cabo de 24h de infección realizar la recolección de las muestras a evaluar.

A partir de los sobrenadantes del cultivo celular se evaluó el rendimiento viral mediante una titulación en la que se realizó el recuento de unidades formadoras de placa de lisis por mililitro (UFP/ml). Por otro lado, partir de cubreobjetos que contenían monocapas de células pre-tratadas e infectadas, se practicaron inmunofluorescencia indirecta (IFI) y finalmente, a partir de las monocapas celulares levantadas con Trizol, se realizará una RT-PCR en tiempo real.

Para el desarrollo experimental, se prepararon microplacas de 24 pocillos en las que en cada pocillo se tenía un cultivo de células Vero o A549, en el que la monocapa de células se encontraba en estado confluyente. El primer paso consistió preparar las diluciones de las muestras a evaluar. Para ello se descongeló en hielo una alícuota del stock de I3S y se realizaron diluciones de la droga en medio mínimo esencial Eagle (MEM, GIBCO) suplementado con 50µl/ml de gentamicina, suero de ternero al 1,5% y una mezcla buffer de HCl y NaHCO<sub>3</sub>. Las diluciones se mantuvieron en frío hasta ser inoculadas. Luego, se retiró el

medio de cultivo que contenían las células y se procedió a inocular 350µl de cada dilución realizada en los pocillos que se fueran a pre-tratar con agonista; en los demás pocillos se colocaron 350µl del medio con el que realizaron las diluciones. Se incubó las células durante 24h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurridas las 22h de tratamiento con agonista, se descongeló en hielo una alícuota del stock de CH223191 y se realizaron diluciones de la droga en medio MEM suplementado con 50µl/ml de gentamicina, suero de ternero al 1,5% y una mezcla buffer de HCl y NaHCO<sub>3</sub>. En todo momento se mantuvo las diluciones en frío y en oscuridad. Posteriormente se retiró el medio de cultivo que contenían las células y se procedió a dispensar 350µl de cada dilución realizada en los pocillos que se fueran a pre-tratar con antagonista. Se incubó las células durante 90 minutos a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Durante el pre-tratamiento con el antagonista, se descongeló en frío una alícuota de stock viral y se resuspendió en medio MEM suplementado con 50µl/ml de gentamicina, suero de ternero al 1,5% y una mezcla buffer de HCl y NaHCO<sub>3</sub>. La misma se preparó de modo que al dispensar 200µl por pocillo la multiplicidad de infección (MI) fuera de 0,5. Una vez

que ha transcurrido el tiempo de pre-tratamiento con el antagonista, se removieron y reservaron los sobrenadantes que contenían las diluciones de las drogas, se colocó en cada pocillo 200µl de la suspensión viral y se incubó las células durante 60 minutos a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, procurando agitar la microplaca cada 15 minutos para evitar la sequedad de los pocillos y distribuir el inóculo viral en forma homogénea en toda la superficie del pocillo. Finalmente, se removió la suspensión viral de cada pocillo y se reincorporaron los sobrenadantes que contenían los tratamientos con agonista y antagonista previamente reservados. Se incubó la microplaca durante 24h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

La toma de muestra implicó la recolección de los sobrenadantes de los cultivos, que fueron guardados a -80°C hasta la realización de la titulación viral. Por otro lado, a partir de cubreobjetos que contenían monocapas de células pre-tratadas e infectadas, se practicaron inmunofluorescencia indirecta (IFI) y finalmente, a partir de las monocapas celulares levantadas con Trizol, se realizará una RT-PCR en tiempo real.

### Titulación viral

La titulación viral se realizó a partir de los sobrenadantes recolectados 24h post-infección de las líneas celulares Vero o A549 pre-tratadas con drogas agonistas y antagonistas del AHR.

Para ello se prepararon microplacas de 24 pocillos en las que en cada pocillo se tenía un cultivo de células Vero en el que la monocapa de células se encontraba en estado confluyente. El primer paso consistió preparar las diluciones de las muestras a evaluar. Para ello se descongeló en hielo las muestras a evaluar y se pasó a realizar diluciones seriadas de las mismas al décimo en medio mínimo esencial Eagle (MEM, GIBCO) suplementado con 50µl/ml de gentamicina, suero de ternero al 1,5% y una mezcla buffer de HCl y NaHCO<sub>3</sub>. Las diluciones se mantuvieron en frío hasta ser inoculadas. Luego, se retiró el medio de cultivo que contenían las células, se procedió a inocular 200µl/pocillo de cada dilución realizada y se incubó las células durante 60 minutos a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, procurando agitar la microplaca cada 15 minutos para evitar la sequedad de los pocillos y distribuir el inóculo viral en forma homogénea en toda la superficie del pocillo. Posteriormente se retiró la suspensión viral de cada pocillo y se reemplazó por 1ml de medio MEM con

metilcelulosa al 1%. Finalmente se incubó la microplaca durante una semana a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Por último, se fijaron las células con formol al 10%, se tiñeron con cristal violeta y se procedió a realizar el recuento de las placas de lisis en cada pocillo. El resultado del rendimiento viral se determinó de acuerdo al recuento de unidades formadoras de placa de lisis por mililitro (UFP/ml).

### Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

El procedimiento experimental fue realizado a partir de las muestras previamente fijadas con metanol por lapso de 10 minutos a -20°C a las cuales se les había removido el metanol utilizado y se las había lavado con solución buffer-fosfato (PBS) y guardado en PBS a 4°C hasta su procesamiento.

Para comenzar, se lavaron los cubreobjetos en que estaban fijadas las muestras con PBS fresco durante 5 minutos a 120-130rpm a temperatura ambiente, se descartó el PBS utilizado para el lavado y se puso a las células en contacto con el anticuerpo primario; un anticuerpo monoclonal de ratón (modelo 9202 Abcam) que es capaz de reconocer el antígeno E viral (anti-E). Se hizo uso de 20µl de una dilución en PBS 1/300 del anticuerpo anti-E. Se incubó los vidrios por lapso de 60 minutos a temperatura

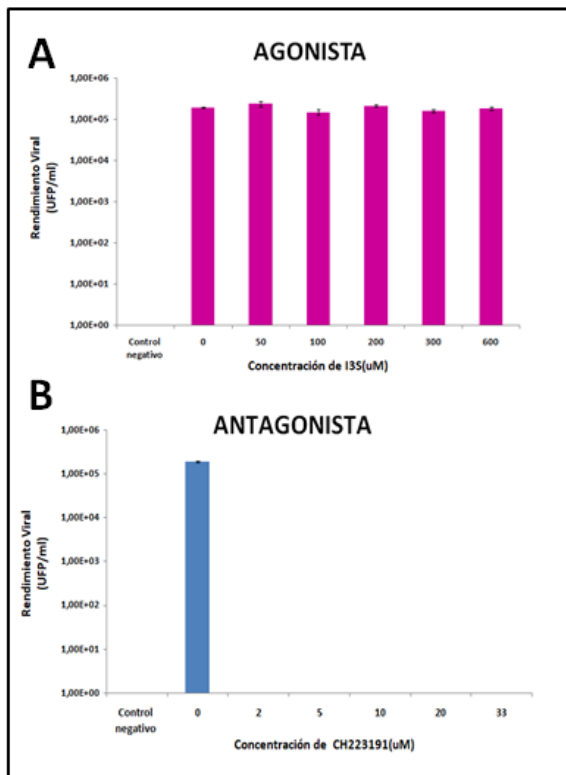


ambiente. Luego, se lavaron los con PBS fresco durante 5 minutos a 120-130rpm a temperatura ambiente; este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, se colocó el anticuerpo secundario: un anticuerpo capaz de reconocer IgG de ratón (anti-IgG-ratón) que se encuentra conjugado a un fluorocromo (Alexa 488; Invitrogen). Se hizo uso de 20µl de una dilución en PBS 1/300 del anticuerpo y éste, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Nuevamente se realizaron tres lavados con PBS fresco durante 5 minutos a 120-130rpm a temperatura ambiente y finalmente, se realizó el marcado de los núcleos celulares con 20µl de diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que fue utilizado en una dilución 1/1000 y que se dejó tiñendo durante 5 minutos a temperatura ambiente, a oscuras y luego se realizaron tres lavados con PBS fresco durante 5 minutos a 120-130rpm a temperatura ambiente. Por último, se realizó el montaje de los cubreobjetos en un portaobjetos con 3µl de 1,4-diazabicyclo octano (DABCO) al 2,5%. Las muestras fueron observadas haciendo uso del microscopio de fluorescencia Olympus BX61.

## Resultados y Discusión

En el presente proyecto nos propusimos evaluar la posibilidad de modular la actividad del AHR como posible blanco terapéutico frente a una infección por DENV.

Para ello decidimos llevar a cabo un ensayo antiviral (Ver Materiales y métodos) en el que se sometió a un cultivo de Vero con células con una confluencia de entre un 75-85%, a un pre-tratamiento con diferentes concentraciones de I3S por 24h (droga capaz de actuar como un agonista del AHR) o durante 90 minutos con CH223191 (compuesto con capacidad de inhibir el AHR en forma específica) y luego se lo infectó con una suspensión de DENV2-NGC que permitiera tener una multiplicidad de infección (MI) de 0,5. Los sobrenadantes del cultivo fueron cosechados transcurridas 24h de la infección. Los mismos, fueron utilizados para el desarrollo de un ensayo de titulación en el que se evaluó el rendimiento viral mediante el recuento de de placas de lisis. El resultado se expresó en Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/ml). Ver *figura 2*.



**Figura 2 .Ensayo antiviral en Vero.** Titulación por formación de placas de lisis en muestras recolectadas a las 24h post-infección con DENV2-NGC de células pre-tratadas con 50µM, 100µM, 200µM, 300µM y 600µM de I3S (A) o pre-tratadas con 2µM, 5µM, 10µM, 20µM y 33µM de CH223191 (B). En ambos casos se agregó un control negativo y un control viral que corresponden a células no pre-tratadas y no infectadas o células no pre-tratadas pero infectadas, respectivamente. En el caso del control viral, se simboliza como concentración 0µM de droga en ambos gráficos. La MI empleada fue de 0,5.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo, la droga agonista, no parecería afectar el rendimiento viral resultante, mientras que en el caso de CH223191 sí parecería afectar, ya que no se observó formación

de placas de lisis en ninguna de las diluciones ensayadas durante la titulación viral.

Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron consistentes en el sentido que no se observó un efecto dependiente de la dosis de compuesto ensayada. Esto podría deberse a la utilización de la línea celular Vero que carece de la capacidad de secretar interferon de tipo I (IFN) no es la más adecuada para establecer la relación de la vía en estudio en la infección con DENV; por lo tanto, se decidió repetir el ensayo en un modelo celular que tuviera la capacidad de secretar IFN, que es una citoquina clave de la respuesta inmune antiviral.

Por lo mencionado anteriormente, se decidió hacer uso de la línea celular A549 para realizar el ensayo antiviral. Nuevamente se sometió a un cultivo celular con una confluencia de entre un 75-85%, a un pre-tratamiento durante 24hs con diferentes concentraciones de I3S (200µM, 300µM y 600µM) o por 90 minutos con CH223191 (2µM, 5µM, 10µM, 20µM y 33µM) y luego se lo infectó con una suspensión de DENV2-NGC que permitiera tener una multiplicidad de infección (MI) de 0,5. Los sobrenadantes del cultivo fueron cosechados transcurridas 24h de la infección. Los

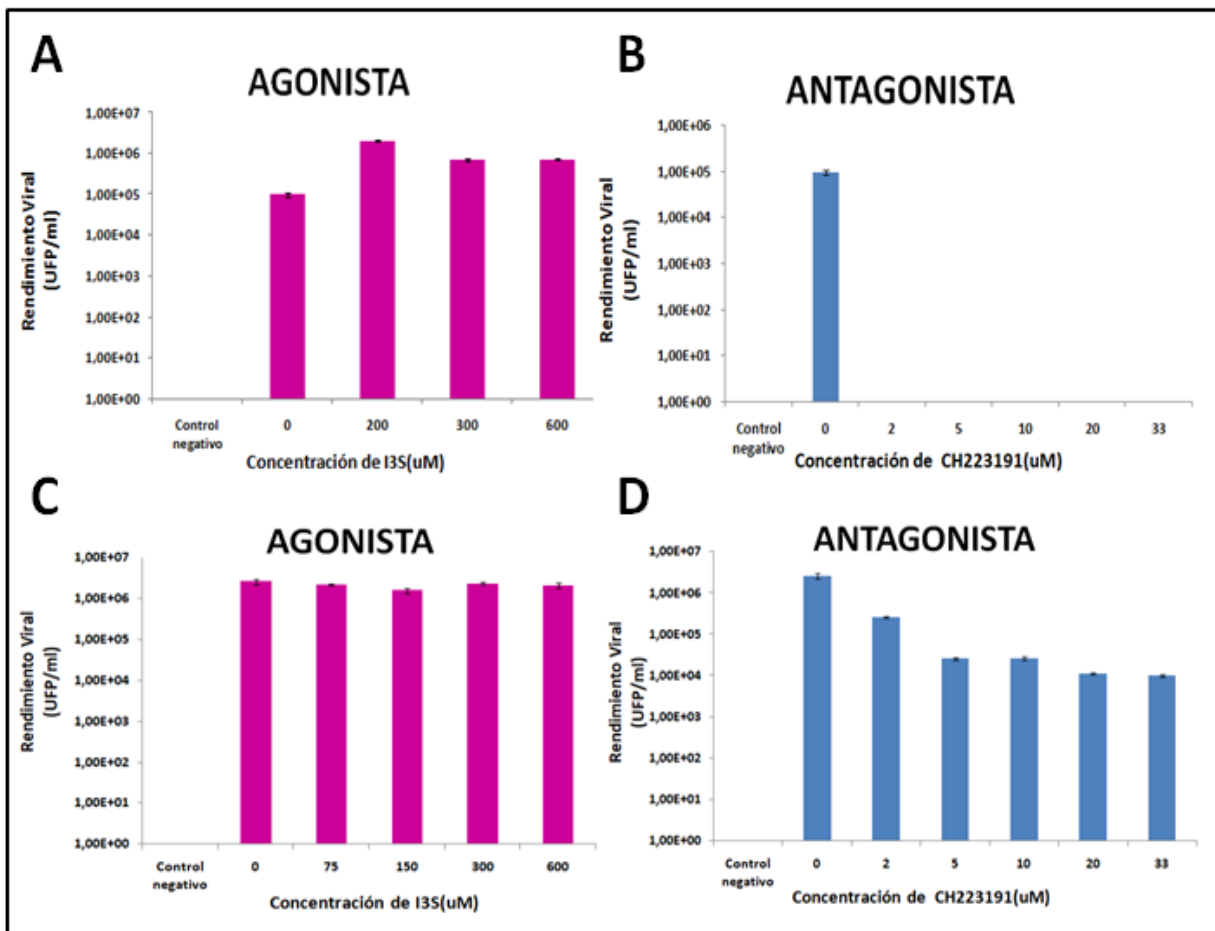
mismos, fueron utilizados para el desarrollo de un ensayo de titulación en el que se evaluó el rendimiento viral mediante el recuento de de placas de lisis. El resultado se expresó en Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/ml). Ver *figura 3 (A y B)*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo en A549, las diferentes concentraciones de agonista ensayadas, el rendimiento viral resultante en las células pre-tratadas con un agonista de AHR previo a la infección parecerían tener un aumento de UFP/ml de aproximadamente un logaritmo, respecto del control viral. Sin embargo, aparentemente no habría diferencias en el resultado entre las diferentes concentraciones de I3S utilizadas. Esto podría corresponder a que debido a que se está trabajando con un sistema biológico que tiene una capacidad finita de producción de estas partículas virales, el mismo podría verse saturado con una MI de 0,5 y no estar produciendo más partículas virales así se incremente la concentración del compuesto (*Figura 3.A*). Por otro lado, en lo que respecta a la titulación de los sobrenadantes provenientes de células pre-tratadas con antagonista, no se observó la formación de placas de lisis en ninguna de las diluciones ensayadas durante la titulación

para ninguna de las concentraciones que se emplearon de la droga (*Figura 3.B*). Este último resultado nos pareció interesante porque si bien, lo que esperábamos era que la droga antagonista tuviera la capacidad de modular negativamente el AHR y con ello, que disminuyera el rendimiento viral, no esperábamos que esa disminución fuera tan pronunciada. Por lo que decidimos repetir el ensayo en A549, empleando el mismo rango de concentraciones para CH223191 pero, en el caso de I3S ampliando el rango para evaluar si a menores concentraciones el comportamiento observado en términos del rendimiento viral se veía modificado. Nuevamente se sometió a un cultivo celular con una confluencia de entre un 75-85%, a un pre- tratamiento durante 24h con diferentes concentraciones de I3S (75 $\mu$ M, 150 $\mu$ M, 300 $\mu$ M y 600 $\mu$ M) o por 90 minutos con CH223191 (2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M y 33 $\mu$ M) y luego se lo infectó con una suspensión de DENV2-NGC que permitiera tener una multiplicidad de infección (MI) de 0,5. Los sobrenadantes del cultivo fueron cosechados transcurridas 24h de la infección. Los mismos, fueron utilizados para el desarrollo de un ensayo de titulación en el que se evaluó el rendimiento viral mediante el recuento de

de placas de lisis. El resultado se expresó en Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/ml). Ver *figura 3*(C y D). Los resultados obtenidos en este nuevo ensayo muestran que las diferentes concentraciones de I3S utilizadas no modificarían el rendimiento viral respecto del observado en el control viral, al menos, en término de las UFP/ml (Figura 3C), ahora bien, en el caso de las

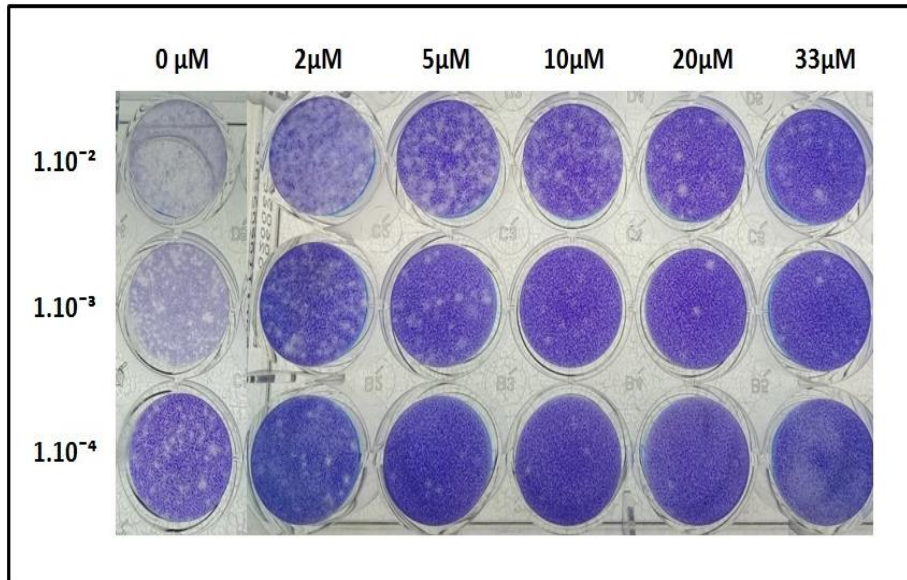
muestras correspondientes a los sobrenadantes de las células pre-tratadas con CH223191, se puede observar una clara tendencia a disminuir el rendimiento viral conforme aumenta la concentración del compuesto. Esto podría significar que el mismo, al modular en forma negativa la actividad del AHR, podría estar influyendo en la capacidad replicativa del DENV2. Ver *Figura 4*.



**Figura 3. Ensayo antiviral en A549.** Titulación  $n^{\circ}1$  por formación de placas de lisis en muestras recolectadas a las 24h post-infección con DENV2-NGC de células pre-tratadas con 200 $\mu$ M, 300 $\mu$ M y 600 $\mu$ M de I3S (A) o pre-tratadas con 2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M y 33 $\mu$ M de CH223191 (B). Titulación  $n^{\circ}2$  por formación de placas de lisis en muestras recolectadas a las 24h post-infección con DENV2-NGC de células pre-tratadas con 75 $\mu$ M, 150 $\mu$ M, 300 $\mu$ M y 600 $\mu$ M de I3S (C) o pre-tratadas con 2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M y 33 $\mu$ M de CH223191 (D). En todos los casos se agregó un control negativo y



un control viral que corresponden a células no pre-tratadas y no infectadas o células no pre-tratadas pero infectadas, respectivamente. En el caso del control viral, se simboliza como concentración 0 $\mu$ M de droga en ambos gráficos. La MI empleada fue de 0,5.



**Figura 4. Ensayo antiviral en A459.** Titulación por formación de placas de lisis en muestras recolectadas a las 24h post-infección con DENV2-NGC de células pre-tratadas con 2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M y 33 $\mu$ M de CH223191. La condición 0 $\mu$ M corresponde al control viral. En el eje vertical se especifica la dilución del sobrenadante realizada durante el ensayo

En conjunto, los resultados obtenidos de los ensayos antivirales realizados en A549, indicarían que CH223191 exhibe una clara tendencia a disminuir el rendimiento viral definido el término de las UFP/ml y esto podría relacionarse con su capacidad para modular en forma negativa la actividad del AHR mientras que con I3S ocurriría lo contrario, ya que se observa una clara tendencia a aumentar el rendimiento viral. Esto, podría corresponderse con el hecho de que al estimular el AHR, promovería la replicación viral.

Actualmente nos encontramos repitiendo estos ensayos para corroborar

estas observaciones y, a su vez, hemos decidimos llevar a cabo ensayos complementarios como lo son IFI y PCR, para confirmarlas.

### Conclusiones

Los datos preliminares obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo permiten demostrar que la vía de señalización del Receptor de Hidrocarburo de Arilo (AHR) está involucrada en el proceso de replicación del virus Dengue (DENV). Esto permitiría proponer al AHR como posible blanco terapéutico frente a una infección por DENV.



## Bibliografía

1. Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med*. 2009 Aug 31;206(9):2027-35. doi: 10.1084/jem.20090560. Epub 2009 Aug 24.
2. Rothhammer V, Mascanfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, Chao CC, Patel B, Yan R, Blain M, Alvarez JI, Kébir H, Anandasabapathy N, Izquierdo G, Jung S, Obholzer N, Pochet N, Clish CB, Prinz M, Prat A, Antel J, Quintana FJ. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med*. 2016 Jun;22(6):586-97. doi: 10.1038/nm.4106. Epub 2016 May 9
3. Lawrence BP, Roberts AD, Neumiller JJ, Cundiff JA, Woodland DL. Aryl hydrocarbon receptor activation impairs the priming but not the recall of influenza virus-specific CD8+ T cells in the lung. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):5819-28.
4. Yamada T, Horimoto H, Kameyama T, Hayakawa S, Yamato H, Dazai M, Takada A, Kida H, Bott D, Zhou AC, Hutin D, Watts TH, Asaka M, Matthews J, Takaoka A. Constitutive aryl hydrocarbon receptor signaling constrains type I interferon-mediated antiviral innate defense. *Nat Immunol*. 2016 Jun;17(6):687-94. doi: 10.1038/ni.3422. Epub 2016 Apr 18.
5. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet* 2015; 385: 453–65.
6. Chen RF, Yeh WT, Yang MY, Yang KD. A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001 Feb; 30(1):1-7.

## Financiamiento

UBA, CONICET, ANPCyT