

**FACTORES SOLUBLES PRODUCIDOS DURANTE LA INFECCIÓN POR DENV-
2 INDUCEN CAMBIOS FENOTÍPICOS EN CÉLULAS ENDOTELIALES**

MANUELA ESCUDERO FLÓREZ, Inst.

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Magíster
en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Bioquímica**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
CORPORACIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
MEDELLÍN-COLOMBIA
2022**

**FACTORES SOLUBLES PRODUCIDOS DURANTE LA INFECCIÓN POR DENV-
2 INDUCEN CAMBIOS FENOTÍPICOS EN CÉLULAS ENDOTELIALES**

MANUELA ESCUDERO FLÓREZ, Inst.

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Magíster
en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Bioquímica**

Tutor:

Juan Carlos Gallego Gómez, B.Sc, Ph.D.

Comité Tutorial:

Nelson Fernández, M.Sc, Ph.D.

Jhon Carlos Castaño, MD, M.Sc, Ph.D.

Mauricio Arcos Burgos, MD, M.Sc, Ph.D.

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
CORPORACIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
MEDELLÍN-COLOMBIA**

2022

AGRADECIMIENTOS

Gracias mamá y papá por ser mi hogar, mi sostén incondicional, por brindarme todas las herramientas para triunfar y salir adelante. Gracias a mi familia por ser un espacio de amor y mi primera escuela.

Gracias la Universidad de Antioquia por brindarme todos los recursos para hacer posible mi proceso de formación educativo. Gracias a la Doctora Eliana Restrepo y a la profesora Liliana Carvajal por darme el empujón necesario para ascender. Gracias a mi tutor Juan Carlos Gallego Gómez por no haber tenido ninguna razón para confiar en mí y, aun así, haberme aceptado para ser su estudiante, demostrando así su capacidad para ser un verdadero maestro. Gracias a mis compañeras del GMMT, Vicky y Yaneth por ser mis mentoras, a Janeth y Jenny por siempre estar dispuestas a ofrecer una mano ayuda y especialmente gracias a David Torres por ser mi mayor apoyo en el laboratorio y convertirse en un amigo.

A todos los que de una u otra manera estuvieron presentes en mi proceso, ¡Gracias totales!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Epidemiología del Virus Dengue	12
2.2 Ciclo Replicativo del Virus Dengue: Generalidades.....	13
2.3 Teoría de la fisiopatología del dengue	14
2.4 Disfunción endotelial inducida por la proteína NS1 en DENV	17
2.5 Importancia de las uniones adherentes en la barrera endotelial: el papel de c-ABL.....	18
2.6 Participación de la quinasa c-ABL en la Transición Endotelio-Mesénquima (EndMT)...	20
2.7 Factores solubles durante la infección por DENV	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	26
4.1 Planteamiento del problema	26
4.2 Hipótesis nula y alternativa	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Inhibidor y reactivos.....	27
5.2 Virus y líneas celulares	27
5.3 Amplificación y cuantificación stocks virales.....	28
5.4 Plásmidos, transfección y RNAi	28
5.5 Ensayos estandarización de la Multiplicidad de Infección.....	28
5.5.1 Ensayos de Formación de Unidades de Placas.....	29
5.5.2 Expresión proteína de envoltura viral	29
5.6 Ensayos de inhibición farmacológica.....	29
5.6.1 Ensayos de citotoxicidad con Imatinib.....	29
5.6.2 Ensayos de inhibición en etapas iniciales y etapas post-infectivas	30
5.7 Silenciamiento génico de Abl1 mediante el uso de miRNAs artificiales.....	30

5.7.1	Eficiencia de transfección y nivel de expresión de c-ABL	30
5.7.2	Efecto del silenciamiento en la expresión de fosfo CRK II y en la reorganización del citoesqueleto de actina	31
5.8	Evaluación del efecto de factores solubles liberados tras la infección.....	32
5.8.1	Expresión y activación de c-ABL	32
5.8.2	Expresión y redistribución de marcadores endoteliales-mesenquimales	32
5.8.3	Ensayos de migración celular.....	33
5.9	Análisis estadísticos	33
6.	RESULTADOS	34
6.1	Estandarización de la Multiplicidad de Infección	34
6.1.1	Infección de células HMEC-1 por DENV-2 a MOI 5 y MOI 10 no muestra diferencias estadísticamente significativas.	34
6.2	Ensayos de inhibición farmacológica.....	34
6.2.1	Tratamiento de células HMEC-1 con el inhibidor Imatinib sugiere un efecto antiviral para DENV-2 en etapas iniciales y post-infectivas.	35
6.3	Silenciamiento génico de Abl1 mediante el uso de miRNAs artificiales.....	36
6.3.1	Disminución en la expresión de la quinasa c-ABL y la fosforilación de CRK II en las células HMEC-1.....	36
6.3.2	Reorganización del citoesqueleto de Actina bajo el silenciamiento génico de c-ABL. 38	
6.4	Evaluación del efecto de factores solubles liberados tras la infección por DENV-2	39
6.4.1	Factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 en células HMEC-1 incrementan la expresión de la quinasa c-ABL y su blanco celular fosforilado CRK II, sugiriendo su activación.....	39
6.4.2	Disminución en la expresión de VE-Cadherina y ZO-1 y aumento de marcadores mesenquimales durante la exposición a factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 en las células HMEC-1.....	41
6.4.3	El incremento en la migración celular bajo el tratamiento con factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 es inhibido durante el silenciamiento de c-ABL.....	45
7.	DISCUSIÓN	49
8.	CONCLUSIONES	54
9.	PERSPECTIVAS	55
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo Replicativo de DENV.
- Figura 2.** Esquema de la clasificación clínica de dengue dictaminada por OMS (2009).
- Figura 3.** Regulación de las uniones adherentes por las quinasas ABL.
- Figura 4.** Esquema general de la Transición endotelio-mesénquima (EndMT).
- Figura 5.** Rutas canónicas y no canónicas implicadas en la EndMT.
- Figura 6.** Infección de células HMEC-1 con DENV-2 a MOI 5 y 10.
- Figura 7.** Viabilidad celular de las células HMEC-1 tratadas con el inhibidor Imatinib.
- Figura 8.** Actividad antiviral del inhibidor farmacológico Imatinib en células HMEC-1 durante la infección con DENV-2.
- Figura 9.** Disminución de c-ABL y fosfo CRK II por la acción del silenciamiento mediado por amiRNAs.
- Figura 10.** Reorganización del citoesqueleto de Actina bajo el silenciamiento génico de c-ABL.
- Figura 11.** Infección por DENV-2 en células HMEC-1 induce la liberación de factores solubles que promueven la actividad de c-ABL.
- Figura 12.** Disminución en la expresión de VE-Cadherina y ZO-1 e incremento de marcadores mesenquimales en las células HMEC-1 por factores solubles liberados tras la infección por DENV-2.
- Figura 13.** Factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 inducen la migración de células endoteliales mediante c-ABL.
- Figura 14.** Esquema ilustrativo general del mecanismo propuesto.

ABREVIATURAS

ADE: Antibody-dependent enhancement
DAA: Direct acting antivirals
DENV: Virus Dengue
dsRNA: double stranded RNA, intermediarios replicativos
ECM: Matriz Extracelular
EGF: Factor de Crecimiento Epidermal
EMT: Transición Epitelio-Mesénquima
EndMT: Transición Endotelio-Mesénquima
ER: Retículo Endoplasmático
FDA: Food and Drug Administration U.S
FBS: Suero Fetal Bovino
HBV: Virus de la Hepatitis B
HCV: Virus de la Hepatitis C
HIV: Virus de Inmunodeficiencia Humana
HPV: Virus del Papiloma Humano
HTA: Host-targeted antivirals
IV: Virus de la Influenza
JEV: Virus de la Encefalitis Japonesa
MV: Virus del Sarampión
RC: Complejos Replicativos
RLUC: Renilla luciferase
SLEV: virus de la encefalitis de St. Louis
TBEV: Virus de la Encefalitis Transmitida por Garrapatas
VP: Paquetes Vesiculares
VEEV: Virus de la Encefalitis Equina Venezolana
WB: Western Blot
WNV: Virus del Nilo Occidental
YFV: Virus de la Fiebre Amarilla
ZIKV: Virus Zika

RESUMEN

La infección por el Virus Dengue (DENV) es la arbovirosis más prevalente en el mundo. La disfunción endotelial es un sello distintivo de la patogénesis durante el estadio más severo de la enfermedad conocido como dengue grave, presentando fuga vascular, shock hipovolémico y falla multiorgánica. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se produce la disfunción endotelial aún no han sido bien dilucidados y el enfoque inmunopatogénico no ha proporcionado una terapia efectiva para la prevención de las muertes. Una perspectiva diferente para entender la enfermedad es la disrupción de la barrera endotelial mediante la liberación de factores solubles por parte de las células endoteliales infectadas, generando el aumento en la permeabilidad vascular. Para identificar los posibles mecanismos celulares implicados durante la infección por dengue, se expusieron células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) a medios condicionados colectados tras la infección por DENV-2 y se evaluó la participación de la quinasa c-ABL, proteína involucrada en la regulación del citoesqueleto y las uniones interendoteliales. Utilizando inhibición farmacológica de c-ABL con Imatinib y la estrategia de silenciamiento génico de la proteína por medio de la transfección con miRNAs artificiales, se encontró que participaba en la entrada y liberación viral, además, el silenciamiento de c-ABL indujo remodelación del citoesqueleto de actina en células HMEC-1. El tratamiento con factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 en células endoteliales, provocó el aumento en los niveles de expresión de c-ABL y p-CRK II, blanco celular directo de la quinasa c-ABL, sugiriendo su activación. Este incremento fue significativo con los medios condicionados colectados 48 horas post-infección. Asimismo, se encontró un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales como Vimentina y N-cadherina y, una disminución concomitante de proteínas específicas endoteliales VE-cadherina y ZO-1, bajo el tratamiento con los factores solubles derivados de la infección. Finalmente, se comprobó que las células endoteliales adquirieron un carácter migratorio al ser expuestas a los factores solubles producidos por DENV-2 en células endoteliales que fue revertido por el tratamiento con Imatinib y con el silenciamiento de c-ABL. Este estudio establece por primera vez a DENV-2 como un potencial inductor de EndMT, sugiriendo que los cambios fenotípicos de las células endoteliales son inducidos por los factores solubles secretados tras la infección produciendo pérdida de las uniones intercelulares y, por ende, desestabilización vascular durante los casos de dengue grave. Más aún, a pesar de que este estudio fue realizado bajo la modalidad *In Vitro*, c-ABL aparece como un prometedor blanco terapéutico basado en la estrategia antivirales basados en el hospedero.

ABSTRACT

Dengue virus infection is the most prevalent arbovirosis in the world. Endothelial dysfunction is a hallmark of pathogenesis during the most severe stage of the disease, known as severe dengue, exhibiting vascular leakage, hypovolemic shock, and multisystemic failure. However, the mechanisms by which endothelial dysfunction occurs have not yet been well elucidated, and the immunopathogenic approach has not provided effective therapy for preventing deaths. A different perspective to understand the disease is the endothelial barrier disruption through the release of soluble factors by infected endothelial cells, which increases vascular permeability. In this context, we propose identifying possible cellular mechanisms involved in dengue infection. In this regard, human microvasculature endothelial cells (HMEC-1) were exposed to conditioned media collected after DENV-2 infection, and the participation of c-ABL kinase, a protein involved in the regulation of the cytoskeleton and interendothelial junctions, was evaluated. Using the pharmacological inhibition of c-ABL with Imatinib and gene silencing strategy of the protein by transfection with artificial miRNAs, it was found to be involved in viral entry and release. Furthermore, c-ABL silencing induced actin cytoskeleton remodeling in HMEC-1 cells. Treatment with soluble factors released after DENV-2 infection in endothelial cells resulted in increased expression levels of c-ABL and p-CRK II, a direct cellular target of c-ABL kinase, suggesting its activation. This increased expression was significant with conditioned media collected 48 hours post-infection. Likewise, we found an increase in the expression of mesenchymal markers such as Vimentin and N-cadherin and a concomitant decrease in endothelial-specific proteins VE-cadherin and ZO-1 under treatment with soluble factors derived from the infection. Finally, we observed that endothelial cells acquired a migratory character upon exposure to soluble factors produced by DENV-2 in endothelial cells that were reversed by treatment with Imatinib and c-ABL silencing. This study establishes for the first time DENV-2 as a potential inducer of EndMT, suggesting that phenotypic changes in endothelial cells are induced by soluble factors secreted after infection and respond to the loss of intercellular junctions and thus vascular destabilization during severe dengue cases. Moreover, although this study was performed *in vitro*, c-ABL appears as a promising therapeutic target based on the host-based antiviral strategy.

1. INTRODUCCIÓN

El Virus Dengue (DENV) causa la mayor carga de enfermedad humana de todos los arbovirus, provocando hasta 100 millones de infecciones sintomáticas por año en el mundo(1). Durante la patogénesis, en el estadio más severo de la enfermedad conocido como el dengue grave, se presenta aumento de la permeabilidad vascular y extravasación del plasma que, de no detectarse a tiempo, puede conllevar a la muerte(2). Clásicamente, se ha explicado este fenómeno desde una perspectiva inmunopatogénica en donde existe una respuesta inmune exacerbada que desencadena la liberación de citoquinas y mediadores proinflamatorios, alterando así la integridad endotelial(3). No obstante, aún no se cuenta con un tratamiento específico antiviral para la enfermedad y las inmunoterapias no han resultado efectivas para los pacientes que presentan dengue grave(4).

La biología de la infección viral se desarrolla en íntima asociación con diversas alteraciones en el funcionamiento celular y el endotelio desempeña un papel central en la regulación de la permeabilidad vascular(5). La barrera endotelial depende de la arquitectura molecular de las uniones intercelulares, el citoesqueleto y la señalización celular(6). Previamente se ha reportado que la infección de las células endoteliales por DENV induce la liberación de factores solubles, tales como, FGF-2, TGF- α , GM-CSF e IL-8, que aumentan la migración de células endoteliales no infectadas, contribuyendo a la desestabilización del endotelio por el debilitamiento de las uniones adherentes y estrechas(7). A su vez, estos factores han sido asociados con la fuga vascular en el dengue grave(8).

Entre las múltiples vías de señalización que se pueden estar activando bajo el estímulo de las citoquinas y factores de crecimiento secretados tras la infección por DENV, un mecanismo en común es a través de la activación o inhibición de la actividad quinasa. Esencialmente, estas proteínas gobiernan eventos de señalización e interacción proteína-proteína fundamentales para la estabilidad en las redes del citoesqueleto y del soporte de las uniones intercelulares(9–11). La quinasa celular ABL ha sido documentada por tener un rol fundamental en la regulación de las uniones interendoteliales(12), la reorganización del citoesqueleto de actina(13,14) y en procesos de transdiferenciación celular como es la Transición Endotelio-Mesénquima (EndMT)(15). La estimulación de las células endoteliales por VEGF desencadena la activación de c-ABL que favorece la contractilidad de los filamentos de actomiosina impulsando la internalización de VE-cadherina desde las uniones adherentes hacia el citosol(12). Además, la estimulación por TGF- β conduce a la activación de c-ABL en células endoteliales, favoreciendo la expresión de factores de transcripción como SNAIL y TWIST y generando la represión de proteínas específicas endoteliales y la sobreexpresión de marcadores mesenquimales(15). Esta transición de un fenotipo endotelial a mesenquimal al presentar un incremento en la motilidad celular y disrupción de las uniones intercelulares, contribuye a la desestabilización del endotelio(16).

Previamente, se ha reportado potenciales efectos antivirales para inhibidores de la quinasa c-ABL. El pretratamiento con GNF-2 (un inhibidor específico de c-ABL) redujo significativamente la entrada viral vía endocitosis mediada por clatrina(17), además, interfiere en la replicación viral en células epiteliales(18). No obstante, los posibles efectos

antivirales de la inhibición de c-ABL no han sido estudiados en células endoteliales, las cuales, son protagónicas en los eventos de fuga vascular presentados en los pacientes con dengue grave(19). A pesar de que sigue siendo controversial la infección de las células endoteliales por DENV *In Vivo*, su contribución como fuente de liberación de mediadores solubles que participan en la disrupción endotelial es cada vez más relevante y va en concordancia con el fenómeno fisiopatológico(7,20). Dicho efecto se debe principalmente a que el mecanismo por el cual DENV induce disfunción endotelial probablemente compromete un ataque indirecto al endotelio compatible con la pérdida de un fenotipo endotelial y la adquisición de un fenotipo de características mesenquimales.

En este estudio, se encontró que factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 en células endoteliales inducían la sobreexpresión de la quinasa celular ABL y de su blanco celular fosforilado CRK II, sugiriendo su activación. Además, la inhibición farmacológica con Imatinib y el silenciamiento génico de la proteína c-ABL por la estrategia de miRNAs artificiales disminuyó el incremento en la migración celular potenciada por los factores solubles secretados tras la infección en células endoteliales. Finalmente, hubo una disminución en la expresión de VE-cadherina y ZO-1, y un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina y Vimentina en células endoteliales tratadas con medios condicionados colectados tras la infección. Este efecto fue revertido bajo el tratamiento con el inhibidor farmacológico de c-ABL Imatinib. Conjuntamente, estos datos no solo postulan a c-ABL como un posible blanco terapéutico para la fuga vascular, sino que también nos acerca a dilucidar un posible evento de plasticidad celular subyacente durante la infección por DENV.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Epidemiología del Virus Dengue

El Virus Dengue (DENV) es el arbovirus que más rápido se disemina en el mundo, es transmitido por la picadura de mosquitos infectados principalmente de la especie *Aedes aegypti* y en menor grado *Aedes albopictus*. La enfermedad se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales, su alta propagación está determinada por la creciente expansión geográfica de los vectores transmisores, la tendencia a la urbanización y/o migración y a cambios ambientales(21,22). A la fecha, se han identificado cinco serotipos virales (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 y DENV5), de los cuales, DENV1-DENV4 producen un espectro de manifestaciones clínicas muy similares en humanos(23) y DENV5 cumple mayoritariamente ciclo selvático(24).

Globalmente, la Organización Mundial de la Salud estima entre 50 y 100 millones de infecciones por dengue cada año, de las cuales 500.000 presentan dengue grave y un aproximado de 20.000 muertes han sido documentadas por año, dejando innumerables pérdidas socioeconómicas(25,26). Entre los informes más recientes, para el año 2020 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS reportaron un total de 2.326.115 casos de Dengue en las Américas, 6,156 se diagnosticaron como dengue grave con 1.027 defunciones(27). En 2021, de los 1.173.674 casos de dengue notificados en la Región de las Américas, 2.821 fueron clasificados como dengue grave. El número más alto de casos de dengue grave se observaron en los siguientes países: Colombia con 864 casos, Honduras con 851 casos y Brasil con 172 casos. En el mismo periodo se notificaron un total de 387 muertes en la Región(28). En 2022, hasta la semana epidemiológica 32 van 2.248.245 casos notificados de dengue, con 2.942 pacientes que presentaron dengue grave, Colombia se encuentra entre los países con mayor incidencia de dengue grave en la Región de las Américas(28).

El incremento en la incidencia del dengue (30 veces más durante las últimas cinco décadas), la susceptibilidad a contraer la enfermedad y el número de muertes que ocasiona por la severidad en las fases más graves, hacen de esta enfermedad un foco de atención urgente(25). Las medidas de control y prevención de la enfermedad se han enfocado en contrarrestar la propagación y/o erradicación del mosquito vector, en la implementación de una vacuna tetravalente y en la búsqueda de antivirales de acción directa contra el virus. Sin embargo, persiste el incremento en la incidencia de esta enfermedad debido a diversas falencias halladas en estos métodos. Se ha reportado que el control biológico de los mosquitos puede generar resistencia en los organismos por la presión adaptativa impuesta por los insecticidas además que, representa una solución transitoria en el tiempo dado que ocurren reinfestaciones(29,30). En cuanto al uso de la vacuna tetravalente, se han registrado irregularidades en su eficacia entre los diferentes grupos de edad, los serotipos virales y aún no se concibe suficiente información sobre su seguridad a largo plazo, por tanto, no constituye una solución eficaz(31–34). Por último, el desarrollo de medicamentos antivirales

basados en acción directa contra DENV no otorgarían un tratamiento efectivo dada la alta capacidad de mutación que poseen los virus RNA(35,36), entre los cuales se encuentra DENV, posibilitando el escape por selección de mutantes resistentes a estos medicamentos(37).

Al no existir un tratamiento específico para la enfermedad, se hace imprescindible la continua búsqueda de nuevas estrategias que superen las limitaciones actuales, a saber, la evolución viral propia del agente infeccioso, las condiciones adaptativas del vector transmisor, eficacia contra los diferentes serotipos virales y la accesibilidad a toda la comunidad susceptible y/o afectada por esta enfermedad.

2.2 Ciclo Replicativo del Virus Dengue: Generalidades

El virus dengue (DENV) es un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus*, al cual hacen parte diversos virus de alta importancia médica a nivel mundial, como lo son: Virus Zika (ZIKV), Virus del Nilo Occidental (WNV) y Virus de la Fiebre Amarilla (YFV)(38). Estos virus comparten genoma RNA monocatenario de polaridad positiva ((+) ssRNA) de aproximadamente 11kb, el cual, codifica a tres proteínas estructurales (C, PrM/M y E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Son pequeñas partículas esféricas envueltas de ~50 nm de diámetro. DENV, está conformado por una nucleocápside que contiene el RNA+ genómico rodeado por la cápside (C), que a su vez está rodeada por una bicapa lipídica donde se encuentra la proteína de membrana (prM) unida a la glicoproteína de envoltura más externamente (E)(39).

Su ciclo replicativo inicia con la unión de la proteína E a los receptores (CD14, el receptor de laminina de alta afinidad 37/67 kDa, el GRP78/BiP, DC-SIGN y al heparán sulfato) presentes en la superficie de la membrana celular(40). Tras la unión, la partícula viral se interioriza mediante el proceso de endocitosis seguido a la fusión de la proteína de envoltura con la membrana celular (dependiente de pH) en el endosoma, lo que permite el desacoplamiento de la nucleocápside y la liberación del RNA viral en el citoplasma que se traduce en el retículo endoplásmico rugoso (RER)(41). El proceso de traducción da lugar a una poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos, la cual, posteriormente es clivada tanto por proteasas celulares como por la proteína viral NS2B3. Una vez el genoma viral es traducido, se forma el complejo de replicación compuesto por la ARN-polimerasa dependiente del ARN NS5 (RdRp), proteínas NS accesorias, RNA (+) viral y factores de la célula huésped que se asocian con membranas intracelulares inducidas por el virus, constituyendo paquetes vesiculares derivados del retículo endoplasmático (ER)(42). El primer paso durante la replicación es la síntesis de la plantilla genómica RNA (-) para producir la cadena RNA (+) que servirá para seguir siendo traducida o para ensamblarse en nuevos viriones y dar lugar a la progenie viral inmadura (Fig 1).

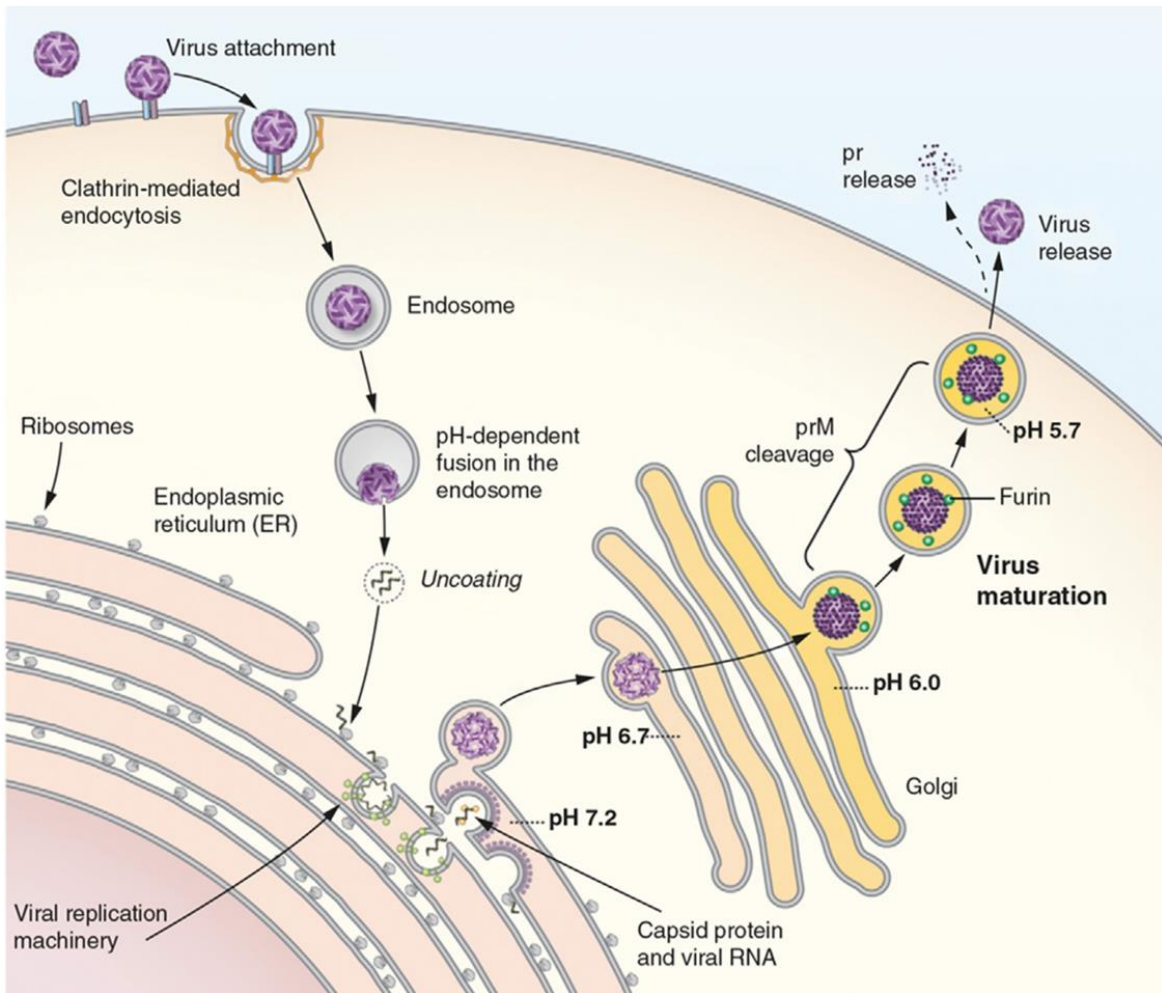


Figura 1. Ciclo Replicativo de DENV. Tomado de: Murugesan, A., & Manoharan, M. (2020). Dengue Virus. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*, 281–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819400-3.00016-8>

Seguido de esto, las nuevas partículas virales sufren un proceso de maduración pasando del RE a la Red Trans-Golgi derivando a la glicosilación de las proteínas de membrana virales, así como el corte mediado por la proteasa Furina de la proteína Precursora de Membrana PrM. Esto es necesario para la liberación de los viriones, puesto que, la PrM evita que la proteína de envoltura presente una forma fusogénica, al ser escindida, la proteína de envoltura forma complejos homodiméricos que facilitan finalmente la exocitosis de la progenie viral madura(43).

2.3 Teoría de la Fisiopatología del Dengue

El dengue provoca un amplio espectro de manifestaciones clínicas que puede cursar como dengue sin signos de alarma, con signos de alarma o dengue grave(2). Esta clasificación clínica fue anunciada por la OMS en el año 2009 con el propósito de identificar oportunamente a aquellos pacientes en los que la enfermedad puede progresar a dengue grave

y requieren asistencia médica (Fig 2).

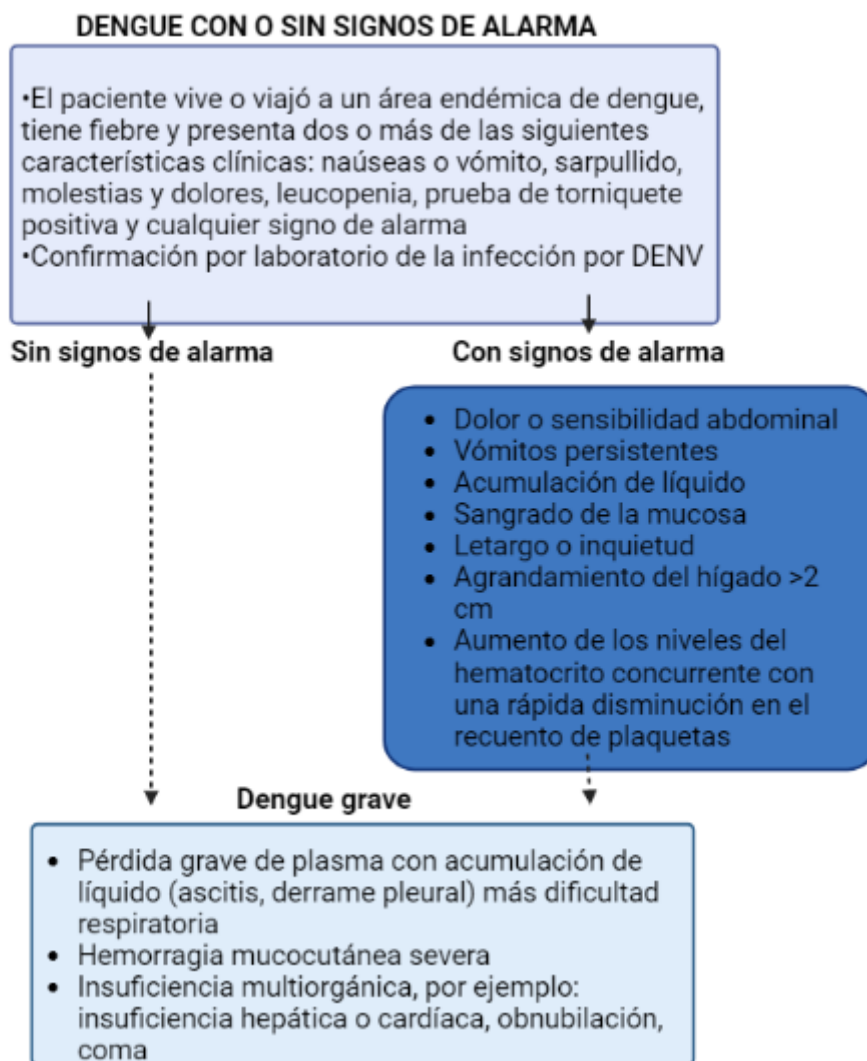


Figura 2. Esquema de la clasificación clínica de dengue dictaminada por OMS (2009). Modificado de: Guzman, M., Gubler, D., Izquierdo, A. et al. Dengue infection. Nat Rev Dis Primers 2, 16055 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>

Inicialmente, el virus es inoculado por los mosquitos al alimentarse de la sangre del individuo en la piel, donde *in situ* se da la infección de macrófagos y células de Langerhans(44). Mediante la migración de estas células, DENV puede diseminarse por todo el sistema linfático infectando monocitos derivados de la sangre, células dendríticas mieloides y macrófagos esplénicos y hepáticos(45). Esto da como resultado una infección aguda, sistémica y dinámica.

Tras el período de incubación, los síntomas suelen comenzar abruptamente primero en una fase febril aguda que puede durar de 2-7 días, con náuseas, vómito, cefalea, dolor corporal generalizado y erupción maculopapular. En esta fase, al cursar la enfermedad con signos de

alarma presenta dolor o sensibilidad abdominal, petequias, sangrado en las mucosas, acumulación de líquidos y leucopenia progresiva. El comienzo de la fase crítica es detectado por el incremento en la fuga vascular que se refleja en el pulso reducido, taquicardia, hipotensión, acumulación de líquido en la cavidad pleural o peritoneal y choque con afectación grave de órganos como el hígado, corazón y SNC. En paralelo, la permeabilidad vascular aumenta con una concomitante trombocitopenia e incremento en el hematocrito, evidenciando la pérdida del volumen intravascular. Esta fase alarmante suele durar de 24-48 horas. Si el paciente logra sobrevivir, entra en el periodo de recuperación estabilizándose el sistema hemodinámico y el organismo gradualmente inicia la reabsorción de los líquidos en los compartimentos extravasculares(2).

Cuando el paciente cursa la fase crítica, el manejo hospitalario consiste en un diagnóstico temprano oportuno y en terapia de reposición de fluidos, sin embargo, los pacientes pueden deteriorarse hasta el punto de presentar dengue grave con una o varias de las siguientes características: i) fuga de plasma que puede conllevar a choque, ii) hemorragia grave, iii) falla multiorgánica (Figura 2). En este punto, no existe un tratamiento específico debido a la incompreensión de los mecanismos subyacentes que conllevan al incremento de la permeabilidad vascular en las etapas más severas de la infección.

Tradicionalmente, la fuga vascular ha sido explicada desde una aproximación inmunológica, donde la infección por DENV de las células inmunes media el aumento en la secreción de citoquinas y factores proinflamatorios, tales como, IFN-1, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 que conducen a la activación del endotelio, la alteración de la integridad endotelial y la coagulopatía, presentándose incremento en la permeabilidad vascular(46,47). Sin embargo, las inmunoterapias no han resultado efectivas para el tratamiento del dengue grave, más específicamente en estudios comparativos concluyeron que el uso de corticoides tanto en etapas tempranas como en el choque no presenta efectos terapéuticos importantes(4,48).

Por otra parte, el riesgo de padecer dengue grave se ha relacionado con la amplificación de la infección dependiente de anticuerpos (Antibody-Dependent Enhancement, ADE), la cual sostiene que el virus causante de una infección secundaria es reconocido, pero no neutralizado por anticuerpos IgG generados en la infección primaria, de esta manera facilitan el ingreso a las células susceptibles en tanto que aumentan la replicación viral(49,50). No obstante, esta asociación descuida el hecho de que la potenciación mediada por anticuerpos en las etapas más severas ocurra en un estrecho rango de títulos de anticuerpos anti-DENV preexistentes y en infecciones heterotípicas secundarias, mientras que, a niveles más elevados hay protección contra la enfermedad sintomática(51).

Tomando estas aproximaciones en conjunto, y teniendo en cuenta la ausencia de un tratamiento efectivo para el dengue grave, se hace imprescindible un cambio en el entendimiento de la enfermedad, así como en la búsqueda de nuevas alternativas que permitan hallar blancos terapéuticos en la infección por dengue y prevenir las muertes dadas en su estado más severo.

2.4 Disfunción endotelial inducida por la proteína NS1 en DENV

La superficie interna de los vasos sanguíneos está recubierta en su totalidad por una monocapa celular endotelial que actúa como la primera línea de contacto entre los componentes sanguíneos y los tejidos subyacentes, funcionando así como una barrera altamente selectiva y semipermeable(52). La alteración en la integridad endotelial puede conllevar a fugas vasculares y extravasación del plasma, tal como ocurre en el dengue grave(53). Dos estructuras fundamentales que determinan la función e integridad de la barrera endotelial son el glicocálix y las uniones intercelulares, tales como las uniones estrechas y adherentes(54,55).

La proteína no estructural 1 (NS1) se ha identificado por tener un rol importante en la disfunción endotelial ocasionada por DENV, específicamente, NS1 participa en la replicación viral(56), en la evasión de la respuesta inmune(57) y en la fuga vascular incrementando la permeabilidad endotelial(58). El potencial mecanismo por el cual NS1 induce disfunción endotelial es mediante la disrupción de la capa de carbohidratos y proteínas que recubren la superficie luminal de las células endoteliales(59); el glicocálix les confiere protección frente a fuerzas de cizallamiento y contribuye a la señalización e interacción del endotelio con las células que viajan por el torrente sanguíneo(60). Por lo tanto, la alteración en su integridad conduce a disfunción endotelial.

Las investigaciones enfocadas en dilucidar este mecanismo encontraron que la proteína NS1 de DENV promovía la degradación de componentes del glicocálix como el ácido siálico y el desprendimiento de proteoglicanos como el heparán sulfato, a través del incremento en la expresión de sialidasas y heparanasas, respectivamente(59,61,62). Asimismo, se descubrió que este efecto de hiperpermeabilidad vascular inducido por NS1 es independiente de la respuesta inflamatoria desencadenada por citoquinas como la IL-6 y TNF- α tanto *In Vitro* como *In Vivo*(61).

En esta misma línea investigativa, y de manera más exhaustiva, se evaluó el efecto de la NS1 de diversos Flavivirus: DENV, Virus Zika (ZIKV), Nilo Occidental (WNV), Encefalitis Japonesa (JEV) y Fiebre Amarilla (YFV) en diferentes líneas celulares endoteliales. Los resultados indican que, de manera selectiva, la NS1 de los Flavivirus induce disfunción endotelial e incremento en la permeabilidad vascular de las líneas celulares evaluadas, reflejando el tropismo de la enfermedad en cada caso. Más aún, DENV NS1 promovió hiperpermeabilidad endotelial en todas las líneas celulares analizadas *In Vitro* y se detectó mayor fuga vascular en los pulmones e hígado cuando se inoculó la proteína NS1 de DENV en un modelo de ratón, denotando la fisiopatología de la enfermedad grave, es decir, derrame pleural y disfunción hepática(62).

Los hallazgos proporcionados por estos estudios son sólidos y proveen una base para el entendimiento del papel de los factores virales en la disfunción endotelial, sin embargo, además del glicocálix, la homeostasis del endotelio se mantiene mediante la presencia de uniones intercelulares que ayudan a preservar los contactos célula a célula y a regular el

transporte paracelular, por donde puede ocurrir la fuga vascular(63). Por tanto, es importante estudiar otros mecanismos más intrincados que potencialmente estén actuando en la disfunción endotelial inducida por DENV alterando las uniones celulares.

2.5 Importancia de las uniones adherentes en la barrera endotelial: el papel de c-ABL

La función de barrera endotelial que regula finamente el paso de moléculas y solutos entre el torrente sanguíneo y los tejidos subyacentes, está mediada por la arquitectura de las uniones intercelulares, el citoesqueleto y la señalización celular, manteniendo el dinamismo y la versatilidad endotelial(64,65). La interrupción de los contactos intercelulares altera la función adecuada de barrera semipermeable endotelial, conllevando a un incremento en la permeabilidad vascular, edema y daño tisular(66).

Existen dos mecanismos controlados por los cuales ocurre ese intercambio de fluidos, moléculas y proteínas entre los tejidos, el endotelio y la vía sanguínea(67). El transporte transcelular permite el paso de proteínas como la albúmina a través de las células endoteliales, mediante la formación de vesículas que se internalizan y posteriormente son secretadas en su cara basal(67). En contraste, el transporte paracelular constituye la interrupción de la comunicación interendotelial y se da la articulación de las uniones adherentes y estrechas entre células vecinas, uniéndose y disociándose para permitir el paso de moléculas e incluso la migración de células como los leucocitos(68,69).

El complejo de uniones adherentes en las células endoteliales está compuesto principalmente por proteínas de adhesión transmembrana específicas pertenecientes a la familia de las cadherinas, la cadherina vascular endotelial (VE-cadherina)(70). Estas proteínas a través de su dominio citoplasmático se unen a proteínas intermediarias como β -catenin, p120 y placoglobina, las cuales, a su vez se unen con α -catenin que interactúa con varias proteínas de unión a actina(69). La formación de dímeros entre las VE-cadherinas en los sitios de unión, permite su interacción con los dominios extracelulares de las respectivas proteínas en las células adyacentes en un proceso dependiente de Ca^{2+} , de esta forma, se establece una red de adhesión entre células vecinas, soportada por el citoesqueleto y la señalización celular que controla íntimamente la permeabilidad vascular(71).

Entre los diversos actores moleculares que podrían estar implicados en la modulación de las uniones adherentes se ha postulado que, la estimulación de las células endoteliales con el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), histamina y trombina induce el incremento en la permeabilidad vascular por disrupción entre estas uniones, internalización de VE-cadherina y desestabilización del complejo proteico con el citoesqueleto de actina(72–75). Además, entre los efectos ejercidos por estos inductores de la permeabilidad vascular, se ha detectado la participación de las quinasas ABL, donde su activación por VEGF media la fosforilación del residuo Y1175 en el dominio citoplasmático del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), desencadenando la activación de la fosfolipasa C ($\text{PLC}\gamma$), generación de inositol 3-fosfato (IP_3) y movilización de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico al citosol. De esta manera, se promueve la fosforilación de la cadena ligera

reguladora de miosina (MLC2) por MLCK, favoreciendo la contractilidad de los filamentos de actomiosina e impulsando la internalización de VE-cadherina, desestabilización en los contactos célula-célula y, finalmente, incremento en la permeabilidad vascular (Fig 3) (12).

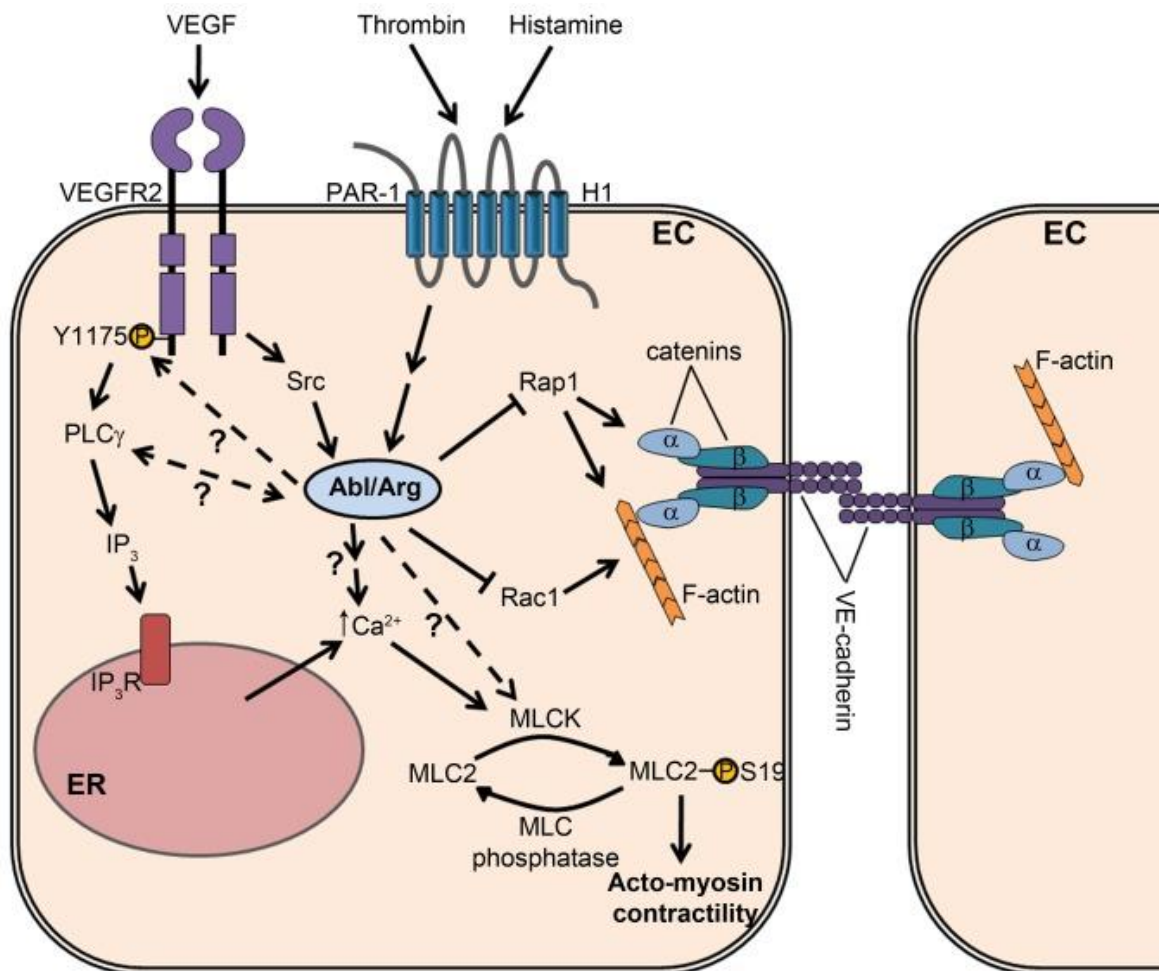


Figura 3. Regulación de las uniones adherentes por las quinasas ABL. Tomado de: Chislock, E. M., & Pendergast, A. M. (2013). Abl family kinases regulate endothelial barrier function in vitro and in mice. *PloS one*, 8(12), e85231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085231>

Por otra parte, las quinasas ABL regulan negativamente la actividad basal de las Rho GTPasas Rac1 y Rap1(12), las cuales, contribuyen a la estabilización de las uniones adherentes mediante la deposición de filamentos de actina manteniendo la función de barrera endotelial(76,77).

De manera complementaria, se ha demostrado en numerosos estudios los efectos protectores de la inhibición farmacológica de c-ABL, así como de otras tirosinas quinasas, con Imatinib (STI571) sobre las uniones intercelulares y la integridad endotelial(12,78–81). El tratamiento con Imatinib no sólo eliminó la aparición de brechas o gaps entre las uniones intercelulares, sino que también se ha posicionado como un medicamento promisorio para la disfunción endotelial tanto *In vitro* como *In Vivo*, a saber, la evaluación de fuga vascular empleando el

colorante Evans Blue bajo el tratamiento con VEGF, mostró una disminución significativa en la extravasación del plasma en los ratones tratados con Imatinib(12). Asimismo, en un modelo de ratas sometidas a bypass cardiopulmonar, Imatinib previno la reducción en la perfusión microvascular, la saturación se vio menos afectada en comparación al control, disminuyó la fuga vascular y la reposición de líquidos(78). En un modelo *ex vivo* de lesión por isquemia y reperfusión, el tratamiento con Imatinib demostró un mejor rendimiento fisiológico de los pulmones reperfundidos, además, se observó menos inflamación, estrés oxidativo y disfunción de la barrera vascular(79). De hecho, en otro estudio llevado a cabo por Aman J y colaboradores, se evaluó extensamente el efecto protector de Imatinib sobre la disfunción endotelial exhibiendo su amplia aplicabilidad, los resultados concluyeron que en monocapas endoteliales Imatinib atenuó la disrupción de la barrera bajo la estimulación con Trombina e Histamina, previene eficazmente el edema pulmonar *In Vivo* inducido por VEGF y, finalmente, en un modelo murino de sepsis limitó la fuga vascular en riñones y pulmones 24 horas después de la inducción de la sepsis(80).

No obstante, a pesar de que Imatinib es un potente inhibidor competitivo de la quinasa c-ABL(82,83), sus efectos terapéuticos en la disfunción endotelial por diversas patologías podrían resultar de su mecanismo inhibitorio registrado para otras tirosinas quinasa, como el Receptor del Factor de Crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), c-Kit, entre otras(84). Por tanto, es de singular importancia trabajar con aproximaciones más específicas para validar la implicación de la quinasa c-ABL en estos procesos regulatorios y multifactoriales.

Para terminar, una interesante investigación reveló que en células endoteliales pulmonares c-ABL tiene un rol determinante en la biomecánica celular en respuesta a agonistas como la trombina. Más específicamente, por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y cuantificaciones del módulo elástico, la trombina induce a la formación de fibras de tensión y contracción de las células endoteliales, provocando interrupción de los contactos célula-célula y brechas intercelulares. Estos cambios se atenúan significativamente al inhibirse la expresión endógena de c-ABL por transfección con pequeños RNAs interferentes (siRNAs), de hecho, imágenes tomadas por Microscopía de Fluorescencia indican una redistribución de VE-cadherina y disociaciones entre las uniones intercelulares bajo el tratamiento con trombina, las cuales, se recuperan significativamente al silenciar las células para c-ABL(85). Conjuntamente, estos resultados sugieren que la proteína c-ABL tiene un rol crítico en la organización y regulación de las uniones adherentes entre las células endoteliales.

2.6 Participación de la quinasa c-ABL en la Transición Endotelio-Mesénquima (EndMT)

Entre los factores que contribuyen a la desestabilización de la barrera endotelial se encuentra el fenómeno de Transición Endotelio-Mesénquima (EndMT), el cual, consiste en un tipo de transdiferenciación celular donde las células endoteliales adquieren progresivamente un fenotipo mesenquimal(16). Este proceso de plasticidad celular involucra notables cambios morfológicos, funcionales y moleculares, además, se ha reconocido en el desarrollo embrionario y en diversas patologías como el cáncer, trastornos vasculares, fibróticos e

inflamatorios(86–90).

Las células endoteliales en estado de quiescencia presentan un fenotipo bastante definido, caracterizándose por la expresión de proteínas específicas incluidas VE-cadherina, CD31 (PECAM-1) y Factor de von Willebrand (vWF), entre otras. Asimismo, las células presentan una morfología poligonal, polaridad apico-basal, fuertes adhesiones célula-célula y una actividad migratoria limitada. Durante la EndMT, se dispara un programa de expresión génica que denota la conversión de células endoteliales a un fenotipo mesenquimal, se resalta la expresión de proteínas como N-cadherina, α -actina de músculo liso (α -SMA) y vimentina, mostrando una concomitante morfología celular alargada en forma de huso, polaridad antero-posterior, pérdida de contactos célula-célula con incremento en el potencial migratorio de las células y propiedades contráctiles, conduciendo a una alteración en su función como barrera semipermeable (Fig 4) (16).

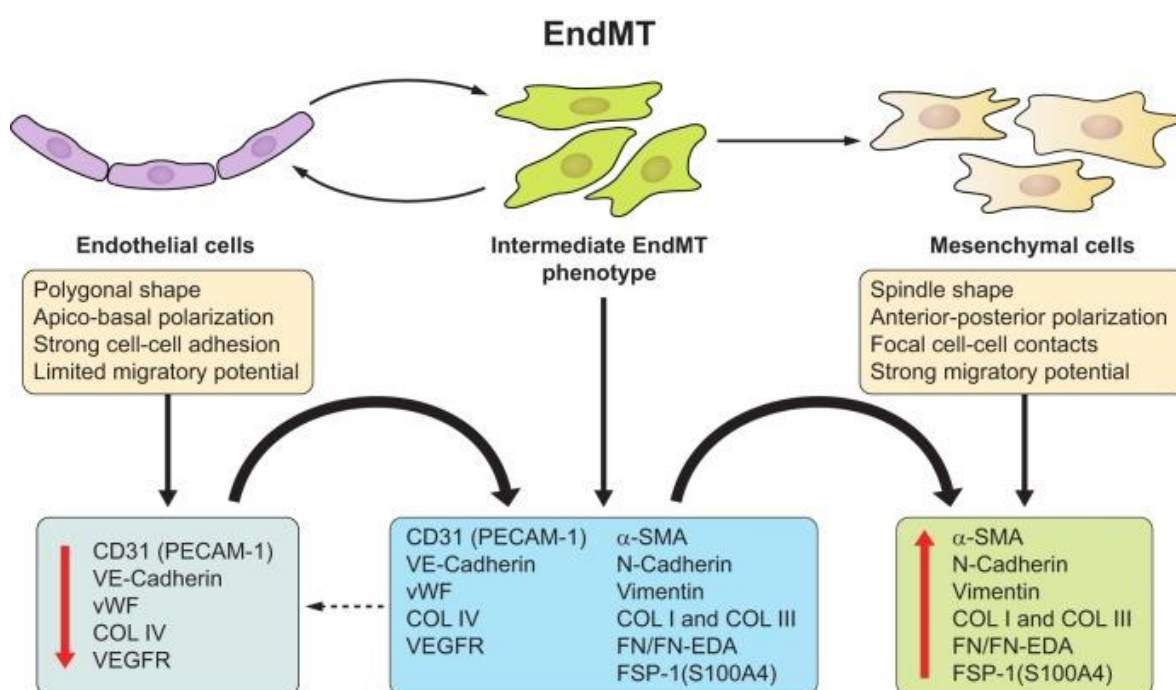


Figura 4. Esquema general de la Transición endotelio-mesénquima (EndMT). Tomado de: Píera-Velázquez, S., & Jiménez, S. A. (2019). Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. *Physiological reviews*, 99(2), 1281–1324. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2018>

Existen diversas vías de señalización que participan en la EndMT, si bien aún no se han dilucidado por completo todos los mecanismos debido a la complejidad de los eventos moleculares, el inductor más importante y reconocido hasta ahora es el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) (16), siendo el TGF- β 2 más potente en comparación a las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 3(91). Subsecuentemente, las investigaciones han revelado que en respuesta a la estimulación por TGF β se puede inducir EndMT tanto por la vía dependiente de Smad o canónica, como por las rutas de señalización MEK/ERK, PI3K, JAK/p38MAPK y c-ABL/PKC δ , consideradas vías no canónicas(15,16,92).

La unión de homodímeros TGFβ al complejo heterodimérico TGF-βRI/II conduce a su autofosforilación activando a proteínas efectoras corriente abajo como las tres vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK): ERK, p38MAPK y JNK, así como PI3K, c-ABL y PKCδ. Esto da como resultado el aumento en la expresión de factores de transcripción como Snail1/2 y Twist1 que favorecen la represión de proteínas específicas endoteliales como VE-cadherina y la inducción de un fenotipo mesenquimal mediante el incremento en los niveles de expresión de marcadores y genes mesenquimales(16,92)(Fig 5).

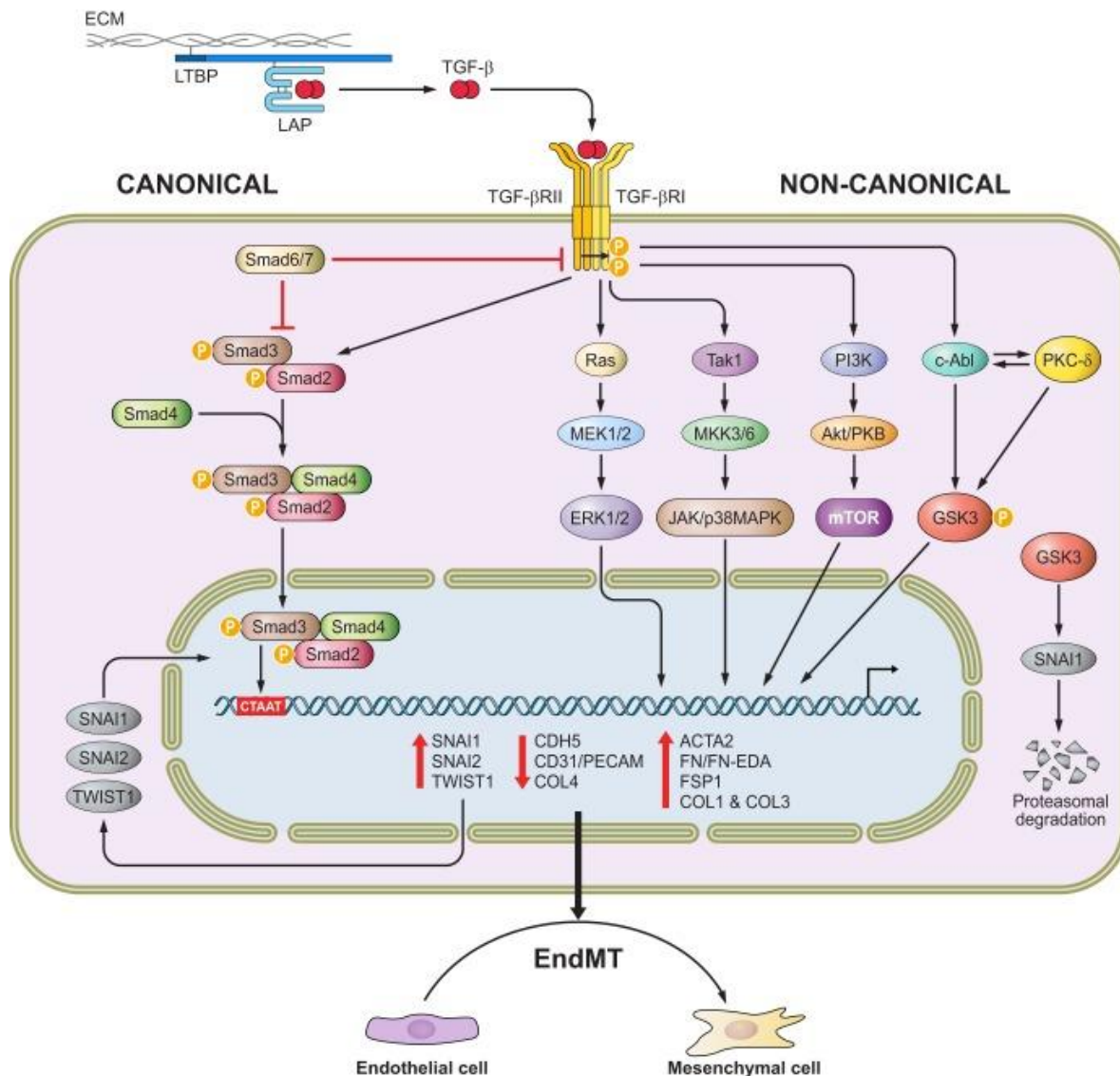


Figura 5. Rutas canónicas y no canónicas implicadas en la EndMT. Tomado de: Piera-Velazquez, S., & Jimenez, S. A. (2019). Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. *Physiological reviews*, 99(2), 1281–1324. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2018>

Particularmente, la activación de c-ABL y PKCδ por la estimulación de TGFβ en células endoteliales pulmonares conlleva a una marcada disminución en la expresión de VE-

cadherina y a un incremento en los niveles de expresión de α -SMA, colágeno I y del factor de transcripción Snail1. Resultados posteriores indicaron que este incremento en la expresión de Snail1, fue anulado por la inhibición farmacológica de c-ABL con Imatinib y de la PKC δ con Rottlerin, lo cual, se confirmó por silenciamiento específico empleando siRNAs. Interesantemente, la inhibición con Imatinib y Rottlerin impidió la fosforilación de la Serina9 en la Glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β) observada bajo el tratamiento con TGF β (15), en consecuencia, se inactiva la GSK-3 β encargada de la degradación proteosomal de Snail1 dando lugar a su acumulación nuclear, incremento marcadores mesenquimales e inducción EndMT(16,92).

Por otra parte, una de las características distintivas de la EndMT es la mejorada actividad migratoria que adquieren las células endoteliales. La quinasa celular ABL lidera procesos de motilidad celular mediante la polimerización de la actina en el borde avanzante, esto genera la fuerza de protrusión que impulsa la membrana hacia adelante. Seguidamente, se establecen adhesiones focales con la matriz extracelular y, finalmente, la contractilidad por la actomiosina es lo que propulsa el cuerpo celular hacia adelante(93). Proteínas adaptadoras como CRKII tienen un rol esencial dado que participan en la polimerización de actina y en la formación de protrusiones de membranas interactuando con los motivos ricos en prolina (PxxP) de c-ABL(94). La activación de otras proteínas efectoras corriente abajo como cortactina, WASp y WAVE por la quinasa c-ABL fomentan la polimerización de actina y la migración celular(14,93,95).

En conjunto, estos datos respaldan la posibilidad de una inducción de la EndMT por medio de la activación de c-ABL en respuesta a diferentes estímulos extracelulares.

2.7 Factores solubles durante la infección por DENV

Las células endoteliales están sujetas a la comunicación intercelular a través de estímulos extracelulares constantes que activan o interrumpen diversos procesos celulares como la regulación del tono y la permeabilidad vascular. Durante la infección por DENV en las células endoteliales, se ha identificado *In Vitro* una mayor secreción de múltiples factores celulares que contribuyen a la fuga capilar como la IL-6, IL-8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, VEGF, TNF α y Angiopoyetina 2(Ang-2)(8,20,96,97). Consistentemente, el tratamiento de células endoteliales con el suero de pacientes positivos para dengue que presentaron fuga vascular incrementó la permeabilidad vascular *In Vitro* en comparación al suero de pacientes que no presentaron fuga vascular(8).

Coincidiendo con estos hallazgos, Talavera y colaboradores encontraron que medios condicionados colectados a las 48 horas post-infección provocaban un incremento en la permeabilidad de las células endoteliales no infectadas y un engrosamiento en las estructuras de actina, estos efectos fueron parcialmente revertidos bajo el tratamiento con anticuerpos neutralizantes para IL-8(98). Adicionalmente, observaciones morfológicas de células endoteliales expuestas a suero de pacientes con dengue grave mostraron perturbaciones en la conformación de las uniones estrechas y adherentes, una morfología irregular y disrupción de la monocapa endotelial(97). Estos resultados son consistentes con los reportados por Kanlaya y colaboradores durante la infección por DENV-2 en células endoteliales humanas,

donde se observó una disminución en la expresión de VE-cadherina, ZO-1, PECAM-1 y redistribución del citoesqueleto de actina(99).

Finalmente, en un estudio más reciente se analizó el potencial efecto de factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 en células endoteliales, encontrando perfiles de expresión de citoquinas y factores de crecimiento diferenciales en los medios condicionados colectados tras la infección, así como en los perfiles de distintos miRNAs promoviendo la migración celular. Además, *In Silico* se realizó un análisis de redes sugiriendo posibles procesos biológicos que se están optimizando dada la disregulación de los miRNAs, tales como migración celular, regulación positiva de la locomoción, adhesión celular y angiogénesis(100).

Los mecanismos inducidos por las citoquinas y factores de crecimiento encontrados en niveles relativamente altos bajo la infección por DENV podrían tener un papel central en el desequilibrio de la función de barrera endotelial, como lo demuestran algunas de las investigaciones citadas previamente. No obstante, el efecto de estos factores solubles liberados tras la infección por DENV en la disfunción endotelial mediante la activación de c-ABL y la inducción de un posible cambio fenotípico, aún no ha sido descrita.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar la participación de la quinasa c-ABL en los cambios fenotípicos celulares endoteliales inducidos por factores solubles liberados durante la infección por DENV.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar que la liberación de factores solubles producidos durante la infección por DENV promueven la activación de c-ABL en células endoteliales.
- Evaluar cambios morfológicos en las células endoteliales durante la infección por DENV.
- Explorar el efecto de la inhibición de la proteína c-ABL en la migración de células endoteliales inducida por factores solubles liberados tras la infección por DENV.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

4.1 Planteamiento del problema

Durante la patogénesis del Virus Dengue (DENV) en su estadio más severo como es el dengue grave, se presenta aumento de permeabilidad vascular y extravasación del plasma(101). Tradicionalmente, esta ha sido atribuida a una respuesta inmune amplificada, que provoca la liberación de citoquinas y mediadores proinflamatorios que alteran la integridad endotelial(46,102). Sin embargo, basándose en los escasos reportes con éxito, las inmunoterapias no han resultado efectivas para los pacientes que presentan dengue grave(48), además, actualmente no se cuenta con una vacuna totalmente efectiva ni con un tratamiento específico para la infección por dengue y sus complicaciones más severas. Una perspectiva diferente que permitiría entender la enfermedad es la disfunción de las células endoteliales provocada por la liberación de factores solubles tras la infección, desencadenando un aumento en la permeabilidad vascular.

La función de barrera endotelial está sostenida por la arquitectura molecular de las uniones intercelulares, el citoesqueleto y la señalización celular, en lo cual se ha visto implicada la quinasa c-ABL(12). Previamente se ha demostrado que la infección de las células endoteliales por DENV induce la liberación de factores solubles que aumentan la migración de células endoteliales no infectadas(100) y, además, la participación de c-ABL mediante la reorganización del citoesqueleto de actina durante la infección en células epiteliales (Datos aún no publicados). Teniendo en cuenta lo anterior, se busca estudiar si factores solubles liberados tras la infección por DENV inducen cambios fenotípicos celulares mediante la activación de c-ABL en células endoteliales. Esto permitiría postular que la disfunción endotelial es un actor etiopatogénico(103,104) y, adicionalmente, un blanco terapéutico promisorio para el tratamiento del dengue grave.

4.2 Hipótesis nula

El Virus Dengue no induce cambios fenotípicos en las células endoteliales mediante la liberación de factores solubles que promueven la activación de c-ABL.

4.3 Hipótesis alternativa

El Virus Dengue induce cambios fenotípicos en las células endoteliales mediante la liberación de factores solubles que promueven la activación de c-ABL.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Inhibidor y reactivos

El inhibidor Imatinib Mesylate (STI571) se adquirió de Selleckchem (Selleck Chemicals, USA). Las soluciones stock fueron preparadas en agua Mili-Q estéril y almacenadas a -20°C hasta su uso. El Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) y el reactivo XtremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA). El suero bovino fetal (FBS) y el antibiótico Penicilina Estreptomina (PS), fueron provistos por Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, USA). El FluorSave se obtuvo de Calbiochem (La Jolla, USA).

Los anticuerpos anti-c-ABL (Rabbit Polyclonal IgG) y anti-occludina (Mouse Monoclonal IgG) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). El anticuerpo anti-CRK (Rabbit Polyclonal phospho-Tyr221) fue provisto por LSBio (Seattle, USA). Los anticuerpos anti-envoltura (Mouse Monoclonal flavivirus E-glycoprotein) y anti-vimentina (Mouse Monoclonal) fueron suministrados por la empresa ABCAM (Cambridge, UK). El anticuerpo anti-VE-cadherina (Mouse Monoclonal CD144) se adquirió de Merck Millipore (Burlington, USA). Los anticuerpos anti ZO-1 (Rabbit Polyclonal), anti N-cadherina (Mouse Monoclonal), anti- α/β -tubulina (Mouse Monoclonal), secundarios (Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594), la micotoxina faloidina conjugada con Alexa Fluor 594 y la sonda Hoechst fueron suministrados por Molecular Probes Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, USA). Los anticuerpos IRDye 680LT (Goat anti-Rabbit) e IRDye 800CW (Goat anti-Mouse) fueron provistos por LI-COR Biosciences (Lincoln, USA).

5.2 Virus y líneas celulares

El virus dengue tipo 2 (DENV-2, cepa de Nueva Guinea) donado por María Elena Peñaranda y Eva Harris (Universidad de California, Berkeley) se amplificó en células C6/36 HT (*Aedes albopictus*-ATCC® CRL-1660™) y fueron titulados en células BHK-21 (riñón de hámster -ATCC® CCL-10™) de acuerdo con nuestras condiciones de laboratorio(105). Para el desarrollo de todos los ensayos biológicos, se emplearon células HMEC-1 (endotelial microvascular dérmica humana-ATCC® CRL-3243) mantenidas en medio basal de crecimiento (RPMI al 10% FBS suplementado con 10mM de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina/100 mg/mL estreptomina(P/S), 10ng/mL factor de crecimiento epidermal (hEGF), 1 μ g/mL Hidrocortisona), incubadas a 37°C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5%.

Las células BHK-21 fueron mantenidas en DMEM al 10% FBS suplementado con 100U/mL de penicilina, 100ug/mL de estreptomina y 10 mM de L-Glutamina incubadas a 37°C y 5% de CO₂ y las células C6/36 HT con medio L-15 al 10% FBS y 1X P/S a 34°C y 5% de CO₂.

5.3 Amplificación y cuantificación stocks virales

Para la replicación y amplificación viral, se sembraron células C6/36 HT en medio L-15 suplementado con FBS al 10% y 1X P/S en frascos de 75cm² a una confluencia del 70%, fueron infectadas con DENV-2 a una Multiplicidad de Infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0,01 PFU/mL en un volumen final de 1 mL y se incubaron a 34°C en atmósfera de CO₂ al 5% por dos horas. Posteriormente, cumplido el tiempo de incubación se agregaron 6mL de L-15 al 2% de FBS sin retirar el inóculo viral. Transcurridos 6 días de infección y tras observar sincitios en un 50% de la monocapa celular realizando monitoreo en campo claro (microscopio Olympus IX-81), los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a -70°C hasta su posterior cuantificación.

Para la cuantificación viral se realizó el Ensayo de Formación de Unidades de Placas (PFU)(106). Para ello, se sembraron 7,5x10⁴ células BHK-21 en platos de 24 pozos en DMEM suplementado al 2% FBS. Al día siguiente, a partir del virus que sería titulado, se realizaron 7 diluciones seriadas 1:10, adicionando cada dilución a tres réplicas celulares. Se incubó a 37°C en CO₂ al 5% por 2 horas y posteriormente se descartó el inóculo viral de todos los pozos infectados adicionando Carboximetilcelulosa (CMC) de mediana viscosidad 1,5%. Al sexto día se realizó la fijación y coloración con una solución de 3,5% de formaldehído-cristal violeta al 0,2% y se cuantificaron las Unidades Formadoras de Placa para determinar los títulos virales expresados en PFU/mL.

5.4 Plásmidos, transfección y RNAi

El silenciamiento del gen ABL1, se realizó usando la estrategia de microRNA artificial (amiRNA). Para ello, el cassette de expresión del miRNA, dirigido por el promotor murino U6, fue insertado en el plásmido pFBAAV corriente arriba del cassette de expresión CMV-eGFP-SV40 polyA, generando el plásmido de expresión pFBAAVmU6mcs-CMVeGFP SV40pA. Asimismo, se tuvo el plásmido control que contenía la versión Scramble (pFBAAVmU6miScramble-CMVeGFPSV40pA). Estos plásmidos fueron amablemente donados por Dr. Ryan Boudreau Gene Transfer Vector Core del Carver College of Medicine (University of Iowa, USA). La amplificación de los plásmidos se logró mediante la transformación de bacterias *E.colli* ultracompetentes (DH5), se extrajo el DNA empleando un Kit Qiafilter Miniprep y se cuantificó la pureza y concentración del mismo usando un espectrofotómetro (NanoDrop). Las transfecciones se realizaron con XtremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent y se estandarizaron las condiciones óptimas para nuestros ensayos utilizando una relación 2:1 XtremeGENE™-DNA.

5.5 Ensayos estandarización de la Multiplicidad de Infección

5.5.1 Ensayos de Formación de Unidades de Placas

Con el fin de garantizar que los medios condicionados contengan factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 en células HMEC-1, se estandarizó la MOI a la cual las células HMEC-1 serían infectadas. Para ello, se accedió en un primer momento mediante el ensayo de unidades formadoras de placa, se sembraron 18×10^4 células HMEC-1 en platos de 24 pozos en RPMI suplementado al 10% de FBS. Se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 horas para permitir su adherencia, se lavaron con PBS 1X y se infectaron con DENV-2 a MOI 5 y MOI 10 (PFU/cell) durante dos horas por triplicado. Transcurrido este tiempo, se retiró el inóculo, se lavaron las células con PBS 1X y se adicionó RPMI al 2% de FBS dejándose en incubación por 24, 48, 72, 96 y 120 horas. En cada punto temporal, se colectaron los sobrenadantes almacenándose a -80°C para su posterior titulación.

Para la cuantificación del título viral, se sembraron $7,5 \times 10^4$ células BHK-21 en platos de 24 pozos en DMEM suplementado al 2% FBS. Al día siguiente, a partir de los sobrenadantes colectados a los diferentes tiempos post-infección, se realizaron diluciones seriadas 1:10, adicionando cada dilución por duplicado. Se incubó a 37°C en CO_2 al 5% por 2 horas y posteriormente se descartó el inóculo viral y se adicionó Carboximetilcelulosa (CMC) al 1,5%. Al sexto día se realizó la fijación y coloración con una solución de 3,5% de formaldehído-cristal violeta al 0,2% y se cuantificaron el número de PFU/mL.

5.5.2 Expresión proteína de envoltura viral

Para determinar la expresión de la proteína de envoltura viral y hallar posibles diferencias entre las células infectadas a MOI 5 y 10, se sembraron 18×10^4 células HMEC-1 sobre láminas cubreobjetos en RPMI suplementado al 10% de FBS. Al día siguiente, se lavaron con PBS 1X y se infectaron con DENV-2 a MOI 5 y MOI 10 (PFU/cell) durante dos horas por triplicado. Transcurrido este tiempo, se retiró el inóculo, se lavaron las células con PBS 1X y se adicionó RPMI al 2% de FBS dejándose en incubación por 24, 48, 72, 96 y 120 horas. En cada punto temporal, las células fueron lavadas con PBS 1X precalentado a 37°C tres veces por 5 minutos, fijadas con 3,8% PFA en PBS por 20 minutos, tratadas con NH_4Cl (50 mM), permeabilizadas con 0,2% de Tritón X-100 en PBS 1X, bloqueadas durante 1 hora (5% Suero Fetal Bovino en PBS 1X) e incubadas con el anticuerpo primario de envoltura viral (anti-ENV; 1:500) por 1 hora. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS 1X y se adicionaron los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 (1:1000) y Hoescht 33258 (marcaje de núcleos; 1:10.000) por 45 minutos. Por último, las células se lavaron tres veces con PBS 1X y se añadió la solución de montaje en los portaobjetos para montar los cristales, se dejaron secar en oscuridad por 24 horas para ser observadas en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX83P2ZF) y analizar la Intensidad Media de Fluorescencia empleando el software ImageJ.

5.6 Ensayos de inhibición farmacológica

5.6.1 Ensayos de citotoxicidad con Imatinib

Para determinar las concentraciones no citotóxicas del inhibidor Imatinib en las células HMEC-1, se llevó a cabo el ensayo del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio

(MTT). Brevemente, células HMEC-1 (6.0×10^4 células/pozo) se sembraron en platos de cultivo de 96 pozos hasta la formación de la monocapa celular. Luego, las células fueron expuestas a diluciones seriadas 1:2 del inhibidor durante 24, 48 y 72 horas, empezando en $500 \mu\text{M}$ hasta $1,96 \mu\text{M}$. Transcurrido los tiempos respectivos, el inhibidor se retiró y se añadió una solución MTT (4 mg/mL), la cual se incubó por 2 horas a 37°C . Después, se adicionó DMSO para disolver los cristales de formazán y se realizó la lectura de absorbancias en un lector de Elisa (Microplate reader, BioRad). La lectura espectrofotométrica se llevó cabo a 570 nm para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), definida como concentración del inhibidor que inhibe el 50% del crecimiento celular. Los valores de IC se obtuvieron mediante análisis de regresión lineal de curvas de concentración generadas a partir de los datos de absorbancia, con el software estadístico GraphPad Prism.

5.6.2 Ensayos de inhibición en etapas iniciales y etapas post-infectivas

Para determinar un posible efecto antiviral de Imatinib sobre la infección por DENV-2 en células HMEC-1, se evaluó el efecto de Imatinib en etapas pre (entrada viral) y post-infectivas, usando concentraciones inferiores a las IC₅₀ determinadas previamente, $3,105 \mu\text{M}$ y $6,25 \mu\text{M}$. Para el ensayo de entrada viral, se le adicionó la respectiva solución de Imatinib a la monocapa celular con un 80% de confluencia y se incubó por 1 hora a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurrido este período, se lavaron las células con PBS 1X y fueron inoculadas con una MOI:5 (PFU/cell) por 2 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Posteriormente, se retiró el medio infeccioso, se realizó un lavado con PBS 1X y se adicionó RPMI al 2% de FBS dejándose en incubación por 72 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Los sobrenadantes fueron colectados al cumplir el tiempo indicado y almacenados a -80°C hasta su titulación.

Para el ensayo de etapas post-infectivas, la monocapa celular con un 80% de confluencia fue infectada a una MOI:5 (PFU/cell) por 2 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Después, se retiró el inóculo y se lavó la monocapa con PBS 1X pre-calentado. Seguidamente, se adicionaron las distintas concentraciones de Imatinib preparadas en RPMI al 2% de FBS y se incubó nuevamente a 37°C y CO₂ al 5% por 3 días. Los sobrenadantes de ambos experimentos fueron colectados al cumplir el tiempo indicado y almacenados a -80°C hasta su titulación.

5.7 Silenciamiento génico de Abl1 mediante el uso de miRNAs artificiales

5.7.1 Eficiencia de transfección y nivel de expresión de c-ABL

Para el desarrollo de los correspondientes ensayos, células HMEC-1 fueron transfectadas por cuatriplicado usando una relación 2:1 XtremeGENE™ HP Transfection Reagent-DNA, con los plásmidos: i) pFBAAVmU6miABL1 CMVeGFP SV40pA (contiene el ami-ABL) y ii) pFBAAVmU6miScramble CMVeGFPSV40pA (control amiScramble), siguiendo las recomendaciones del fabricante(107). Una vez terminado el proceso de transfección, las células fueron incubadas a 37°C y CO₂ al 5% durante 24, 48 y 72 horas.

Para la medición de la eficiencia de transfección, se sembraron 18×10^4 células HMEC-1 sobre láminas cubreobjetos en RPMI suplementado al 10% de FBS. Al día siguiente, se observó que las células tuviesen una confluencia del 80% y se realizaron las respectivas transfecciones. Las células fueron fijadas a las 24, 48 y 72 horas post-transfección con 3,8% PFA en CBS por 20 minutos, tratadas con NH_4Cl (50 mM) y bloqueadas durante 1 hora con 5% Suero Fetal Bovino en PBS 1X, posteriormente, se incubaron con Hoescht 33258 (marcaje de núcleos; 1:10.000) por 45 minutos, se lavaron tres veces con PBS 1X y se montaron en las láminas portaobjetos. Se detectó el reportero GFP usando microscopía de fluorescencia (microscopio Olympus IX-81) y se realizó la captura (DS Camera DS-5M, Nikon) de las imágenes a 20X. Posteriormente, para cuantificar el porcentaje de células positivas para GFP se empleó el software ImageJ.

La determinación del nivel de expresión relativo de c-ABL se realizó a las 24, 48 y 72 horas post-transfección en platos de 96 pozos por In Cell Western (ICW). Para ello, la monocapa celular fue fijada (PFA 3,8%), permeabilizada (triton X-100), bloqueada (albúmina sérica bovina al 5%), marcada para c-ABL (anti c-ABL rabbit polyclonal IgG; 1:500) y revelada con el anticuerpo en la longitud del infra-rojo IRDye 800LT (1:1000). En paralelo, se realizó el marcaje de tubulina (mouse anti- α/β -tubulina; 1:500) e IRDye 800CW (1:1000), usada como proteína normalizadora. La detección se realizó con un Odyssey (LI-COR Biosciences). Los resultados fueron normalizados y provienen de tres ensayos independientes, cada uno con cuatro réplicas.

5.7.2 Efecto del silenciamiento en la expresión de fosfo CRK II y en la reorganización del citoesqueleto de actina

Con el objetivo de validar el silenciamiento de la proteína c-ABL bajo la acción de los miRNAs artificiales empleados, se midió el nivel de expresión de un blanco celular directo de la quinasa, CRK fosforilado a las 48 horas post-transfección por ICW. La monocapa celular fue fijada (PFA 3,8% en CBS), permeabilizada (triton X-100), bloqueada (Albúmina sérica bovina al 2%), marcada para fosfo CRK (Rabbit Polyclonal phospho-Tyr221; 1:500), para tubulina (mouse anti- α/β -tubulina; 1:500) y se revelaron mediante un anticuerpo en la longitud del infra-rojo IRDye 800LT (1:1000). La detección se realizó con un Odyssey (LI-COR Biosciences). Los resultados fueron normalizados y provienen de tres ensayos independientes con cuatro réplicas cada uno.

La reorganización del citoesqueleto de actina se observó mediante microscopía de fluorescencia (microscopio Olympus IX-81) en el contexto de silenciamiento. Para ello, se sembraron 18×10^4 células HMEC-1 sobre láminas cubreobjetos en RPMI suplementado al 10% de FBS. Al día siguiente, se observó que las células tuviesen una confluencia del 80% y se realizaron las respectivas transfecciones. Las células fueron fijadas a las 48 horas post-transfección con 3,8% PFA en CBS por 20 minutos, tratadas con NH_4Cl (50 mM), permeabilizadas (triton X-100) y bloqueadas durante 1 hora (5% Suero Fetal Bovino en PBS 1X). Posteriormente, las células se marcaron para actina (faloidina conjugada con Alexa Fluor 594; 1:1000) y núcleos (Hoescht 33258; 1:10.000) por 45 minutos, se lavaron tres veces con PBS 1X y se montaron en las láminas portaobjetos. Se realizó la captura (DS Camera DS-5M, Nikon) de las imágenes a 60X.

5.8 Evaluación del efecto de factores solubles liberados tras la infección

5.8.1 Expresión y activación de c-ABL

La determinación del nivel de expresión relativo de c-ABL y fosfo CRK en las células HMEC-1 bajo el tratamiento con medios condicionados provenientes de la infección por DENV-2 se realizó por ICW. Para estos fines, se sembraron 18×10^4 células HMEC-1 en platos de 24 pozos en RPMI suplementado al 10% de FBS durante 24 horas permitiendo su adherencia. Transcurrido este tiempo, las células fueron infectadas por DENV-2 a MOI:5 y los sobrenadantes fueron colectados a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-infección (h.p.i) e inactivados con luz UV por 30 min. En paralelo, se colectaron los sobrenadantes del control (MOCK) en los tiempos preestablecidos. Posteriormente, se sembraron 6.0×10^4 células HMEC-1 en platos de 96 pozos para ser tratadas con los medios condicionados colectados a los diferentes tiempos post-infección y control. Las células fueron fijadas a las 24 horas post-tratamiento (PFA 3,8% en CBS), tratadas con NH_4Cl (50mM), permeabilizadas (triton X-100), bloqueadas (albúmina sérica bovina al 5%) y marcadas para c-ABL (anti c-ABL rabbit polyclonal IgG; 1:500) y fosfo CRK (Rabbit Polyclonal phospho-Tyr221; 1:500) revelados con el anticuerpo en la longitud del infra-rojo IRDye 680LT (1:1000). Así mismo, se realizó el marcaje de tubulina (mouse anti- α/β -tubulina; 1:500) y CRK basal (mouse monoclonal IgG; 1:500) que se reveló con el anticuerpo IRDye 800CW (1:1000). La detección se realizó con un Odyssey (LI-COR Biosciences). Los resultados fueron normalizados y provienen de tres ensayos independientes, cada uno con cuatro réplicas.

5.8.2 Expresión y redistribución de marcadores endoteliales-mesenquimales

Para evidenciar los patrones subcelulares de las proteínas específicas endoteliales y de los marcadores mesenquimales en las células HMEC-1 durante la exposición a factores solubles liberados tras la infección por DENV-2, se sembraron 18×10^4 células HMEC-1 en láminas cubreobjetos y se dejaron durante 24 horas permitiendo su adherencia. Transcurrido este tiempo, se trataron las células en cada condición y se fijaron a las 48 horas post-tratamiento. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X tres veces por cinco minutos, se trataron con NH_4Cl (50 mM), se permeabilizaron con tritón X-100 al 0,2% y se bloquearon los posibles sitios no específicos de unión durante 1 hora con 5% Suero Fetal Bovino en PBS 1X. Seguidamente, las células se incubaron con los anticuerpos primarios anti-VE-cadherina (Mouse Monoclonal CD144;1:500), anti-N-cadherina (Mouse Monoclonal;1:500), anti-occludina (Mouse Monoclonal IgG;1:500) y anti-vimentina (Mouse Monoclonal;1:500) por 1 hora. Luego, se lavaron tres veces las células con PBS 1X y se adicionaron los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 488 y 594; 1:1000) junto con Hoescht 33258 (1:10.000) y faloidina conjugada con Alexa Fluor 594 (1:1000) por 45 minutos, para el marcaje de núcleos y actina. Por último, se lavaron tres veces con PBS 1X y se montaron en las láminas portaobjetos. Se realizó la captura en un Microscopio Confocal de disco giratorio Olympus®IX-81 DSU (objetivo de 40X) acoplado a una cámara Nikon DS-L1.

5.8.3 Ensayos de migración celular

Para determinar la dinámica celular en la eficiencia de migración de las células HMEC-1 en cada condición de tratamiento, se sembraron 20×10^4 células en cajas petri (35mm) que tienen incorporado en el fondo un cristal, lo cual, garantiza la correcta visualización y registro de las células en el microscopio. Las células son incubadas por 2 días hasta la formación de la monocapa celular y minutos antes del registro, se realiza la herida usando una jeringa de insulina. Seguidamente, las células son tratadas con los medios condicionados provenientes de la infección (DENV2-CM) o del control (MOCK-CM) combinado con medio de registro, en una proporción 80/20 respectivamente. Además, un control del experimento (MOCK), células tratadas con DENV2-CM e Imatinib $6,25 \mu\text{M}$ y células silenciadas para c-ABL tratadas con DENV-CM.

Los fotogramas de las células vivas se obtuvieron, a un aumento de 40X, con un microscopio confocal de disco giratorio (Olympus®IX-81 DSU), acoplado a sistemas de incubación y mezcla de gases Tokai-Hit Co® que regulan el microambiente del cultivo celular. Éste cuenta con un sistema de escaneado (PriorScientific) y de autoenfoco (Laser Autofocus System) automatizados, los cuales permiten el monitoreo de múltiples puntos de registro simultáneamente. Los fotogramas son capturados usando una cámara ultrarefrigerada OrcaR2CCD (Hamamatsu®) con multiplicador eléctrico, acoplada a los sistemas de iluminación con quemadores de arco de 150W constituidos por lámparas de mercurio-xenón o xenón (Olympus®-MT10 Sistema de Iluminación). Las señales fotónicas emitidas por el espécimen biológico son transducidas a ondas electromagnéticas y enviadas al dispositivo de acoplamiento de carga (CCD), transmitido por una fibra ligera de 2m de cuarzo único al Software Xcellence-Pro (Olympus®), el cual, permite descargar los datos resultantes en formato de video (.AVI).

La depuración y análisis a partir de los videos, consistió en extraer fotogramas usando el programa de video de Windows media VLC, y posteriormente las imágenes fueron segmentadas de manera semi-asistida usando el software BioEdIP, el cual, arroja el dato de área sin células tanto en porcentaje como en número de píxeles. Los datos fueron expresados como Porcentaje de área de la herida (%AH) en función del tiempo de registro, y como Porcentaje de efectividad de reducción de la herida (%Efectividad RH) en función de cada condición, se evaluaron 12 fotogramas por video representativos de cada hora de registro.

5.9 Análisis estadísticos

Los valores de IC50 se calcularon usando el modelo de regresión lineal en el programa GraphPad Prism. Para comparar los títulos virales (PFU/mL) y la IMF de los componentes virales y endoteliales se empleó la prueba T Student de datos no apareados. Los datos de nivel de expresión de proteína obtenidos por In Cell Western se analizaron mediante la prueba T de Student múltiple. Por último, para evaluar si existían diferencias significativas en el porcentaje de efectividad de reducción de la herida (%EfectividadRH) y el porcentaje de área de la herida (%AH) entre las condiciones, se aplicó la prueba ANOVA de una vía y el test no paramétrico Kruskal-Wallis, respectivamente. Las comparaciones múltiples entre los grupos se llevaron a cabo por el test de Dunnett en el Software R.

6. RESULTADOS

6.1 Estandarización de la Multiplicidad de Infección

6.1.1 Infección de células HMEC-1 por DENV-2 a MOI 5 y MOI 10 no muestra diferencias estadísticamente significativas.

La estandarización de la multiplicidad de infección (MOI) en las células HMEC-1 infectadas con DENV-2 dio como resultado que no había diferencias estadísticamente significativas en la producción de Unidades Formadoras de Placa (PFU/MI) cuando las células fueron infectadas a una MOI:5 y a una MOI:10 con DENV-2 (**Figura 6A**). De manera consistente con este resultado, la señal de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) para la envoltura viral de DENV-2 en células HMEC-1 a MOI:5 y MOI:10 no muestra diferencias significativas (**Figura 6B**). Por tanto, se concluye que las células HMEC-1 se infectan de manera similar a una MOI:5 como MOI:10.

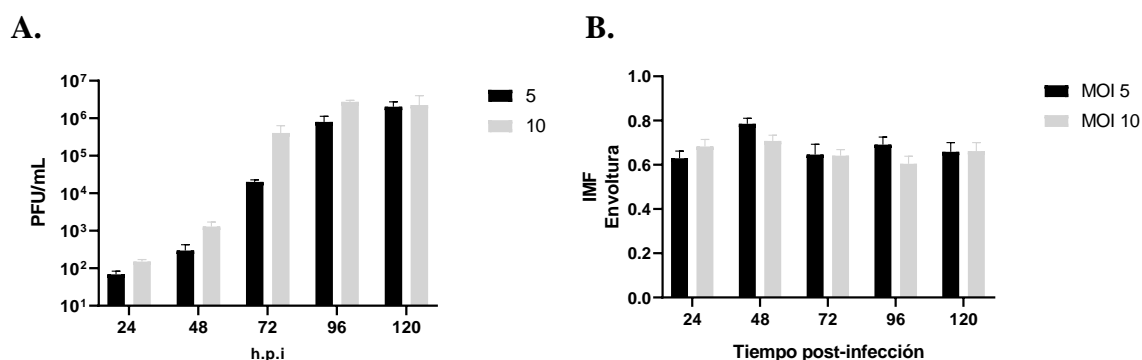


Figura 6. Infección de células HMEC-1 con DENV-2 a MOI 5 y 10. (A) Replicación viral de DENV-2 en células HMEC-1. Cuantificación de las Unidades Formadoras de Placas a partir de la titulación en células BHK21 de los sobrenadantes obtenidos a 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-infección en las células HMEC-1. (B) Intensidad Media de Fluorescencia de la proteína de la envoltura viral de DENV-2 en células HMEC-1. Se muestra la señal de intensidad media de fluorescencia en células HMEC-1 infectadas con DENV-2 a MOI 5 y 10. La IMF se cuantificó empleando el software ImageJ. Las barras representan la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El valor de p fue determinado por la prueba T Student de datos no apareados.

6.2 Ensayos de inhibición farmacológica

6.2.1 Tratamiento de células HMEC-1 con el inhibidor Imatinib sugiere un efecto antiviral para DENV-2 en etapas iniciales y post-infectivas.

Inicialmente se realizó el ensayo de viabilidad celular MTT con el fin de determinar la concentración inhibitoria (IC₅₀) de Imatinib en las células HMEC-1. Para ello, se incubaron las células con diluciones seriadas del inhibidor desde 500 μ M hasta 1.96 μ M por 24 y 48 horas (**Figura 7A y B**). Los ensayos de viabilidad celular muestran que se necesitan concentraciones superiores a 502 y 346 μ M para lograr un efecto citotóxico en el 50% de las células HMEC-1 a las 24 y 48 horas post-tratamiento, respectivamente (**Figura 7B**).

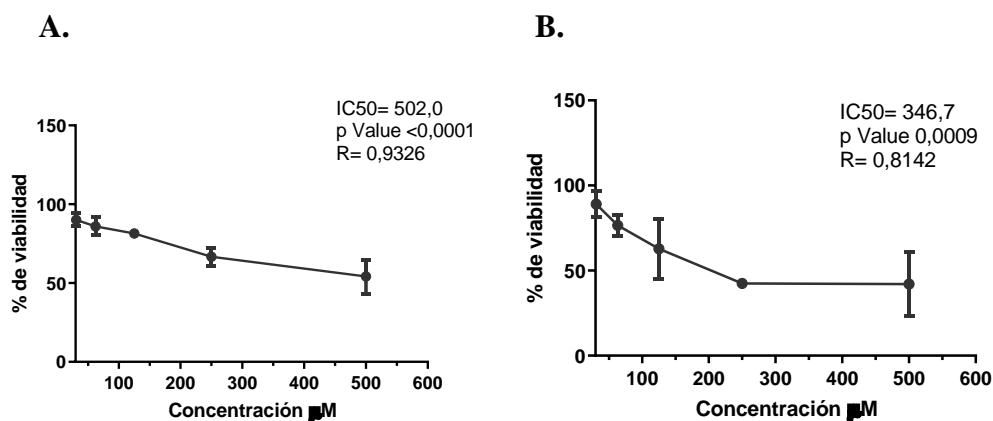


Figura 7. Viabilidad celular de las células HMEC-1 tratadas con el inhibidor Imatinib. (A) Tratamiento de células HMEC-1 con Imatinib por 24 horas y (B) 48 horas. Los ensayos de MTT se realizaron por duplicado con concentraciones de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81, 3,906 y 1,953 μ M. Los valores de IC₅₀, p value, y R se calcularon usando el modelo de regresión lineal en el Software GraphPad Prism.

Posteriormente, se procedió a evaluar la posible participación de la quinasa c-ABL en etapas iniciales de la infección (entrada viral) y en etapas post-infectivas (ensamblaje y/o salida viral), usando un rango de concentraciones de Imatinib por debajo de las IC₅₀ determinadas previamente. Esto con el fin de garantizar que el efecto de Imatinib se deba a la función inhibitoria de dicha molécula y no a un posible efecto citotóxico en la línea celular HMEC-1. Los resultados muestran que el pretratamiento con el inhibidor farmacológico Imatinib a 3,105 μ M y 6,25 μ M reduce significativamente el título viral (**Figura 8A**), de manera similar, cuando las células fueron tratadas con Imatinib después de la infección por DENV-2 se obtuvo una disminución consistente en el título viral (**Figura 8B**), siendo 6,25 μ M la concentración con mayor efecto antiviral tanto en pretratamiento como en post-tratamiento.

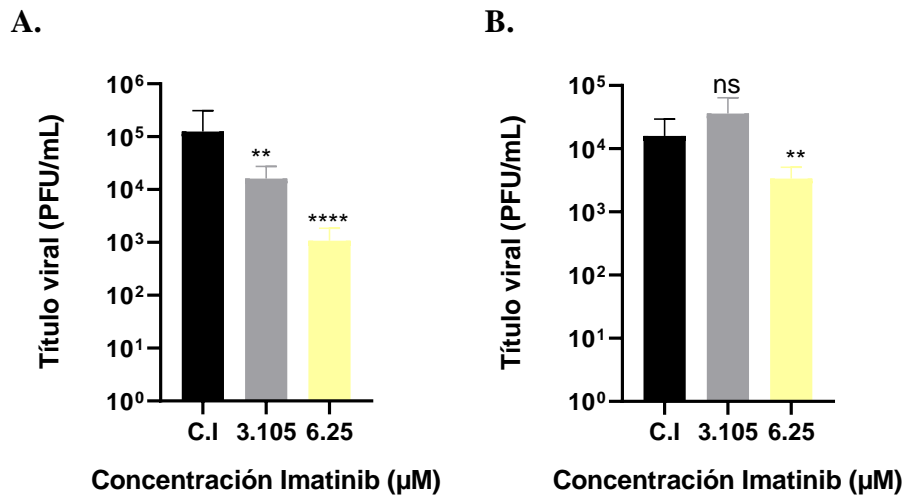


Figura 8. Actividad antiviral del inhibidor farmacológico Imatinib en células HMEC-1 durante la infección con DENV-2. (A) Pretratamiento por una hora de las células HMEC-1 con Imatinib, posteriormente fueron infectadas con DENV-2 y los sobrenadantes fueron recogidos a las 72 horas post-infección. (B) Post-tratamiento de las células HMEC-1 con Imatinib, previamente infectadas, el tratamiento duró hasta la recolección de los sobrenadantes a las 72 horas post-infección. El título viral se cuantificó por medio del ensayo de formación de placa en células BHK-21. Las barras representan la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El valor de p fue determinado por la prueba T Student de datos no apareados. (****): valor de $P < 0,0001$; (***): $P < 0,001$; (**): $P < 0,01$; (*): $P < 0,05$; ns: no significativo.

6.3 Silenciamiento génico de Abl1 mediante el uso de miRNAs artificiales

6.3.1 Disminución en la expresión de la quinasa c-ABL y la fosforilación de CRK II en las células HMEC-1.

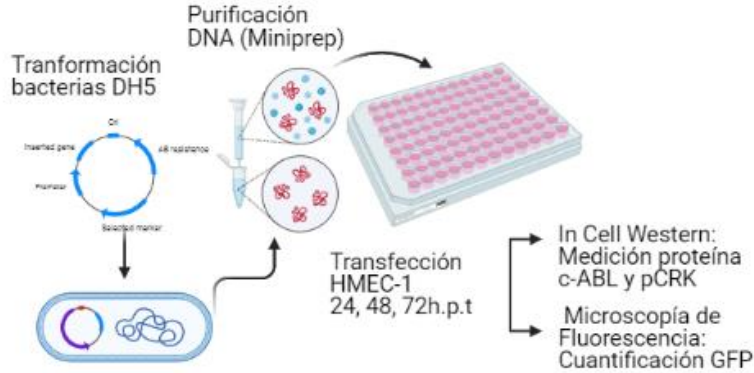
Para evaluar de manera específica la participación de la quinasa celular ABL en los cambios fenotípicos ocasionados por DENV-2 en la línea celular endotelial HMEC-1, se implementó la estrategia de microRNAs artificiales (amiRNAs). Para ello, se utilizó un plásmido que contenía el cassette de expresión tanto del amiRNA dirigido al gen ABL1 (gen que codifica para la proteína c-ABL) como del reportero GFP, bajo el promotor murino U6 (pFBAAVmU6miABL1-CMVeGFPSV40pA). Este amic-ABL fue seleccionado de un pool de oligos que cumplían con las características esenciales para llevar a cabo el silenciamiento. Asimismo, se usó la versión Scramble (pFBAAVmU6miScramble-CMVeGFPSV40pA)

como control.

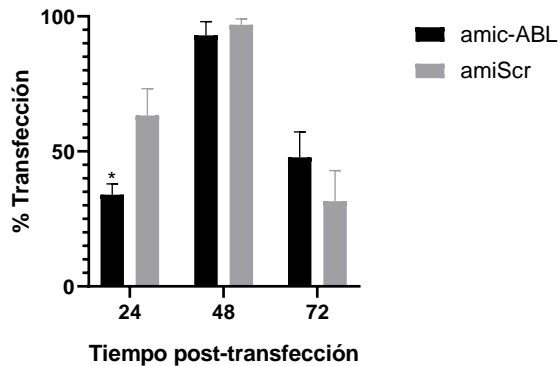
Inicialmente se observó la expresión del gen reportero GFP en las células HMEC-1 a las 24, 48 y 72 horas post-transfección. La mayor eficiencia de transfección se identificó a las 48 horas post-transfección para ambos plásmidos: amic-ABL y amiScr, con un porcentaje de transfección superior al 90% (**Figura 9B**). Estos resultados sugieren que casi toda la población celular llevo a cabo la transcripción de ambos plásmidos: amic-ABL y amiScr.

Seguido, se procedió a verificar la expresión relativa de la proteína c-ABL bajo la acción de los amiRNAs. Como se esperaba, hubo una disminución en la expresión relativa de la proteína cuando las células fueron transfectadas con amic-ABL en comparación con amiScr, además, esta reducción fue significativa a las 48 horas post-transfección (**Figura 9C**). Con base en lo anterior, se concluye que las células HMEC-1 se transfectan correctamente con los amiRNAs empleados y estos logran silenciar eficientemente la proteína c-ABL.

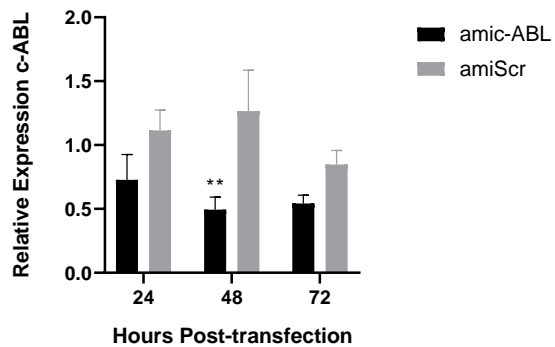
A.



B.



C.



D.

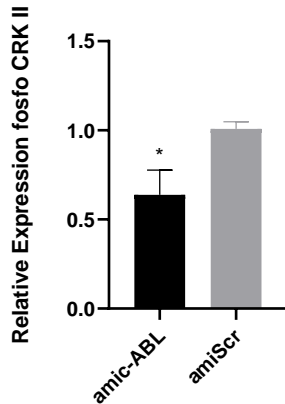


Figura 9. Disminución de c-ABL y fosfo CRK II por la acción del silenciamiento mediado por amiRNAs. (A) Flujograma metodología empleada. (B) Eficiencia de transfección detectada por expresión del gen reportero GFP. Células HMEC-1 fueron transfectadas con amic-ABL y amiScr, se observó la expresión de GFP a las 24, 48 y 72 horas post-transfección por microscopía de fluorescencia (20X). Las imágenes obtenidas fueron analizadas por medio del Software ImageJ, obteniendo el número de células positivas para GFP sobre el total de núcleos. (C) Expresión relativa de la quinasa c-ABL en células HMEC-1. Las células fueron transfectadas con amic-ABL y amiScr, fijadas a las 24, 48 y 72 horas post-transfección. La medición se realizó por In Cell Western (ICW). (D) Expresión relativa del blanco celular CRK II fosforilado de la quinasa c-ABL. Las células HMEC-1 fueron transfectadas con amic-ABL y amiScr, fijadas a las 48 horas post-transfección, tiempo donde se obtuvo mayor silenciamiento de c-ABL bajo la acción de amic-ABL. La medición de fosfo CRK II se realizó por ICW. Las barras representan la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuatuplicado. El valor de p fue determinado por la prueba T Student de datos no apareados. (*): $P < 0,05$.

El siguiente paso consistió en validar los hallazgos previamente descritos. Para esto, se midió la expresión del blanco celular directo fosfo CRK II de la quinasa c-ABL en el punto temporal donde hubo mayor silenciamiento, esto es, a las 48 horas post-transfección. Los resultados señalan que bajo la acción de amic-ABL, hay una reducción significativa en la expresión del blanco celular CRK II fosforilado (**Figura 9D**), reflejando la disminución en la actividad celular de la quinasa c-ABL cuando estuvo silenciada.

6.3.2 Reorganización del citoesqueleto de Actina bajo el silenciamiento génico de c-ABL.

De manera adicional a los resultados previos, el silenciamiento génico indujo una reorganización en el citoesqueleto de actina, observándose una disminución en la aparición de fibras de tensión en el citosol en las células endoteliales para amic-ABL, en comparación con el control no transfectado y amiScr (**Figura 10**).

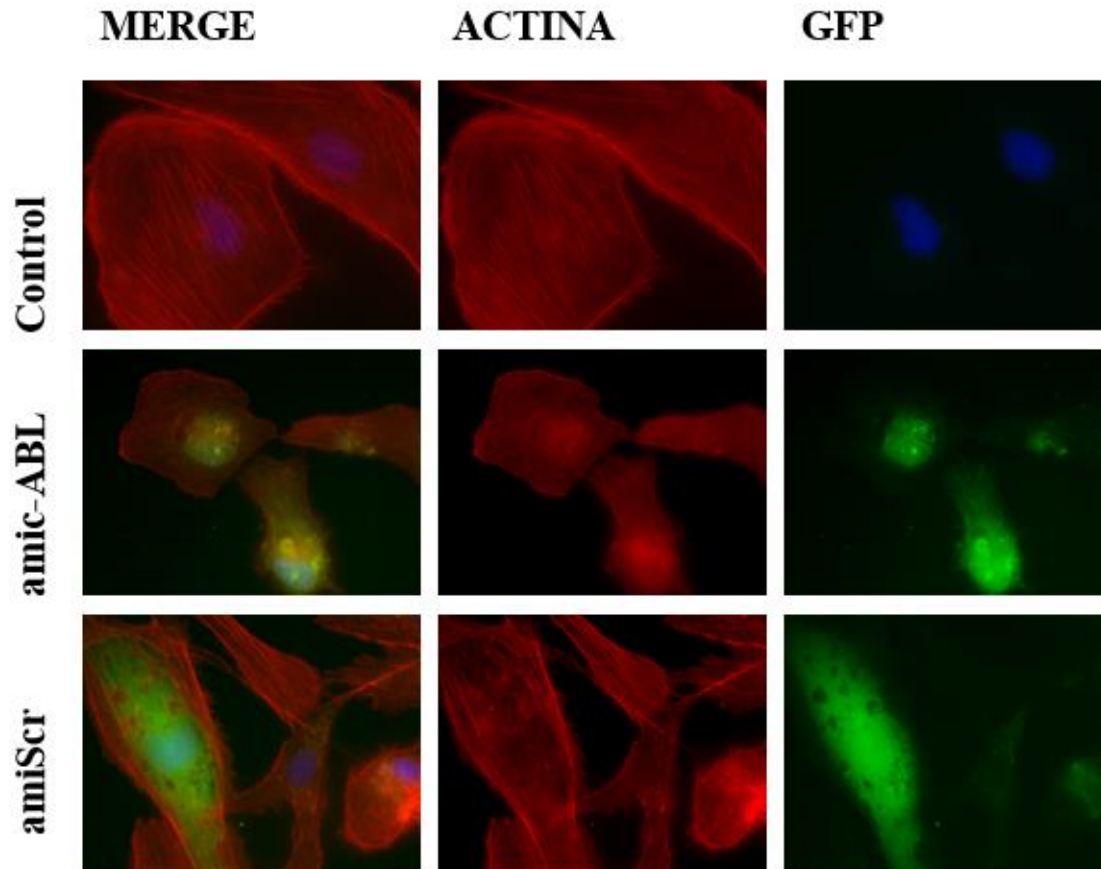


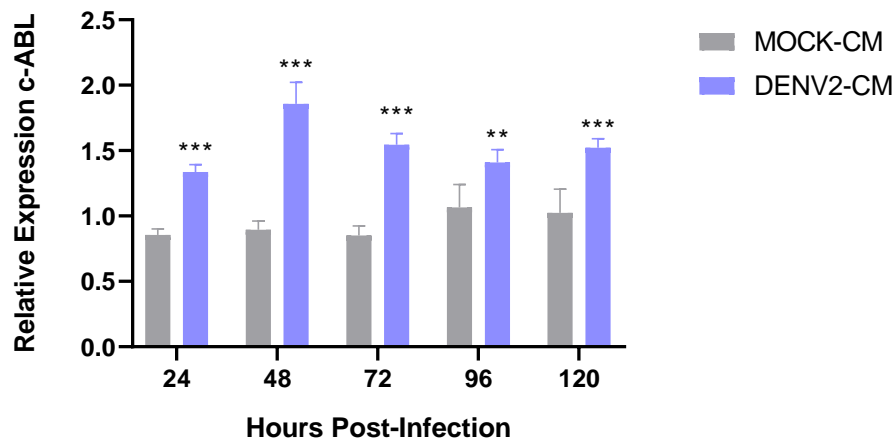
Figura 10. Reorganización del citoesqueleto de Actina bajo el silenciamiento génico de c-ABL. Se muestran células HMEC-1 control, transfectadas con amic-ABL y amiScr. Se observan las fibras de tensión del citoesqueleto de actina (en rojo) en el control y en amiScr, en contraste, células transfectadas con amic-ABL sufren redistribución del citoesqueleto de actina denotándose pérdida de las fibras de tensión y mayor presencia de actina cortical. Expresión del gen reportero GFP (en verde) para células transfectadas.

6.4 Evaluación del efecto de factores solubles liberados tras la infección por DENV-2

6.4.1 Factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 en células HMEC-1 incrementan la expresión de la quinasa c-ABL y su blanco celular CRK II fosforilado, sugiriendo su activación.

Teniendo en cuenta que la quinasa celular ABL participa en la regulación de las uniones adherentes en las células endoteliales, las cuales, se ven interrumpidas bajo las etapas más severas del dengue presentándose extravasación del plasma, se evaluó la posibilidad de que factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 promovieran su activación. Para ello, se midió la expresión relativa de la proteína c-ABL y CRK II fosforilado en células HMEC-1 tratadas con medios condicionados colectados a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-infección. Los medios condicionados provenientes de la infección por DENV-2 fueron expuestos a luz UV para inactivar los viriones allí presentes y de esta manera, atribuir el efecto a los factores solubles y no a posibles efectos citopáticos derivados de la infección. Los hallazgos revelan que, los medios condicionados liberados tras la infección por DENV-2 (DENV2-CM) a 24, 48, 72, 96 y 120 horas incrementan significativamente la expresión relativa de la quinasa c-ABL, en comparación con medios condicionados provenientes del control no infectado (MOCK-CM) (**Figura 11A**). A su vez, se encontró un aumento significativo en la expresión de CRK II fosforilado cuando las células fueron tratadas con factores solubles liberados por DENV-2 (**Figura 11B**), esto concuerda con la mayor expresión de la quinasa c-ABL previamente reportada en estos puntos temporales y sugieren que la secreción de factores solubles por las células endoteliales durante la infección con dengue promueve su activación.

A.



B.

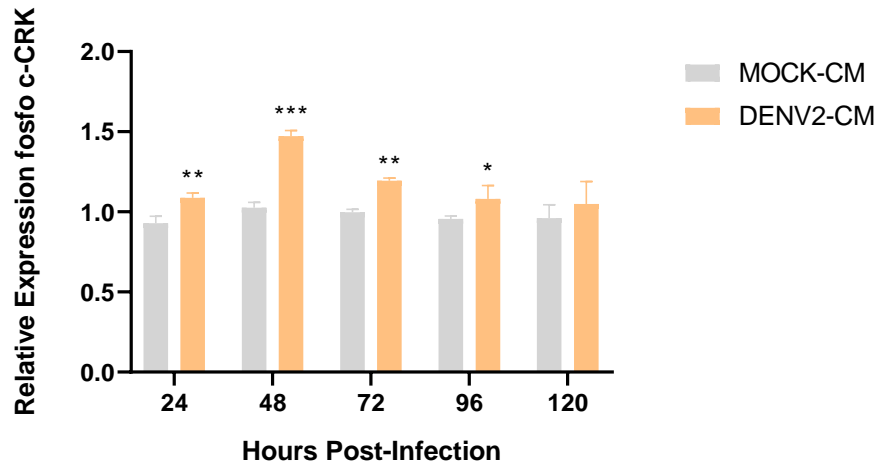


Figura 11. Infección por DENV-2 en células HMEC-1 induce la liberación de factores solubles que promueven la actividad de c-ABL. (A) Expresión relativa de la quinasa c-ABL y (B) fosfo CRK II en células HMEC-1 expuestas a medios condicionados provenientes de la infección por DENV-2. Se obtuvieron medios condicionados a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-infección (DENV2-CM) y del control no infectado (MOCK-CM). Las células HMEC-1 fueron tratadas durante 24 horas, al cabo de este tiempo se fijaron y se cuantificó la expresión mediante ICW. Las barras representan la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuatuplicado. El valor de p fue determinado por la prueba T Student Múltiple. (***) : $P < 0,001$; (**) : $P < 0,01$; (*) : $P < 0,05$.

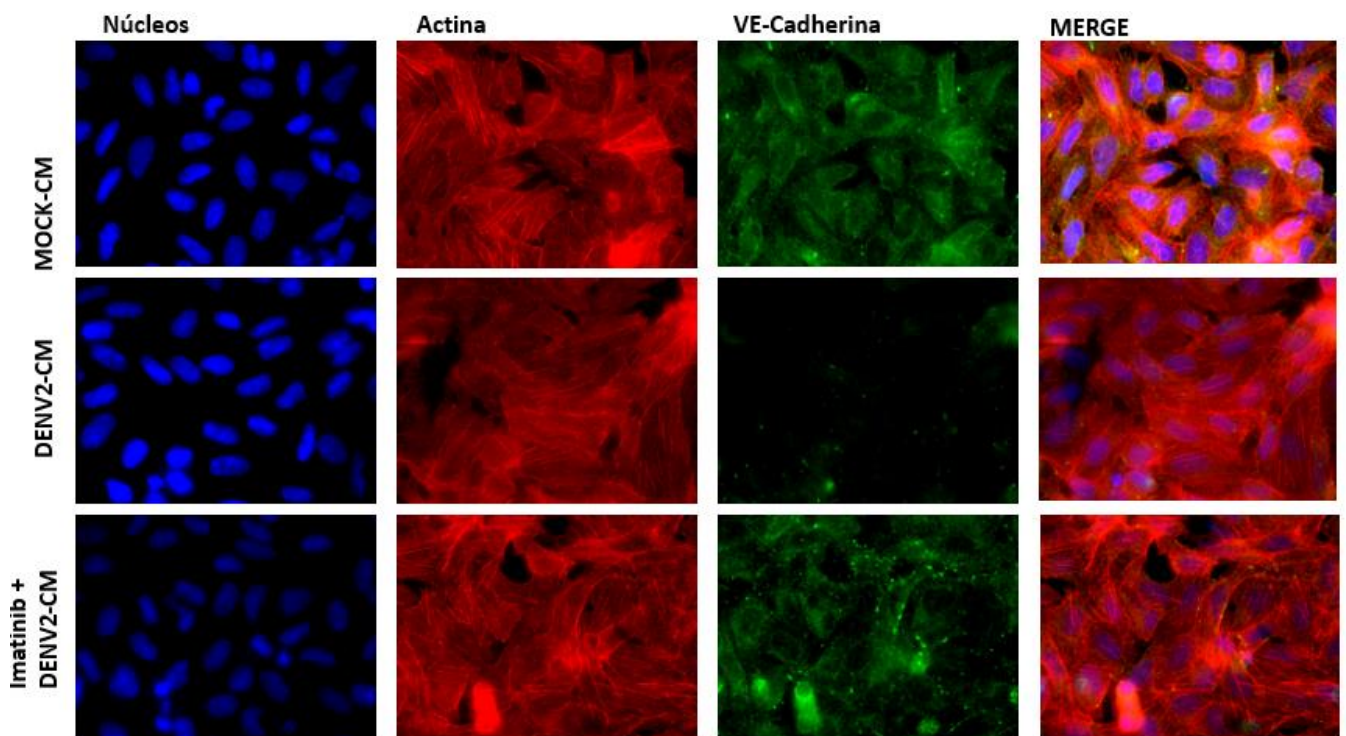
6.4.2 Disminución en la expresión de VE-Cadherina y ZO-1 y aumento de marcadores mesenquimales durante la exposición a factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 en las células HMEC-1.

Para determinar posibles variaciones fenotípicas inducidas por los factores celulares liberados tras la infección por DENV-2 en las células HMEC-1, se midió la expresión de proteínas específicas endoteliales VE-Cadherina y ZO-1 pertenecientes a la arquitectura de las uniones adherentes y estrechas, respectivamente, y de marcadores mesenquimales N-Cadherina y Vimentina por microscopía de fluorescencia cuantitativa. Las células HMEC-1 fueron tratadas con los medios condicionados provenientes del control no infectado (MOCK-CM), de la infección (DENV2-CM) y de la infección más Imatinib (Imatinib+DENV2-CM). Los hallazgos denotan una drástica reducción en la expresión de VE-Cadherina y ZO-1 bajo el tratamiento con DENV2-CM (**Figura 12E-F**). Asimismo, se observa disminución de VE-Cadherina y ZO-1 en el borde celular con aparición de brechas intercelulares en la monocapa (**Figura 12A y D**). Este efecto fue revertido bajo el tratamiento con el Inhibidor Imatinib, restaurándose la expresión de VE-Cadherina y ZO-1 (**Figura 12E-F**) y observándose el patrón de distribución normal en la periferia celular (**Figura 12A y D**). Estas proteínas son de sustancial importancia para la conformación de la barrera endotelial y las uniones célula-

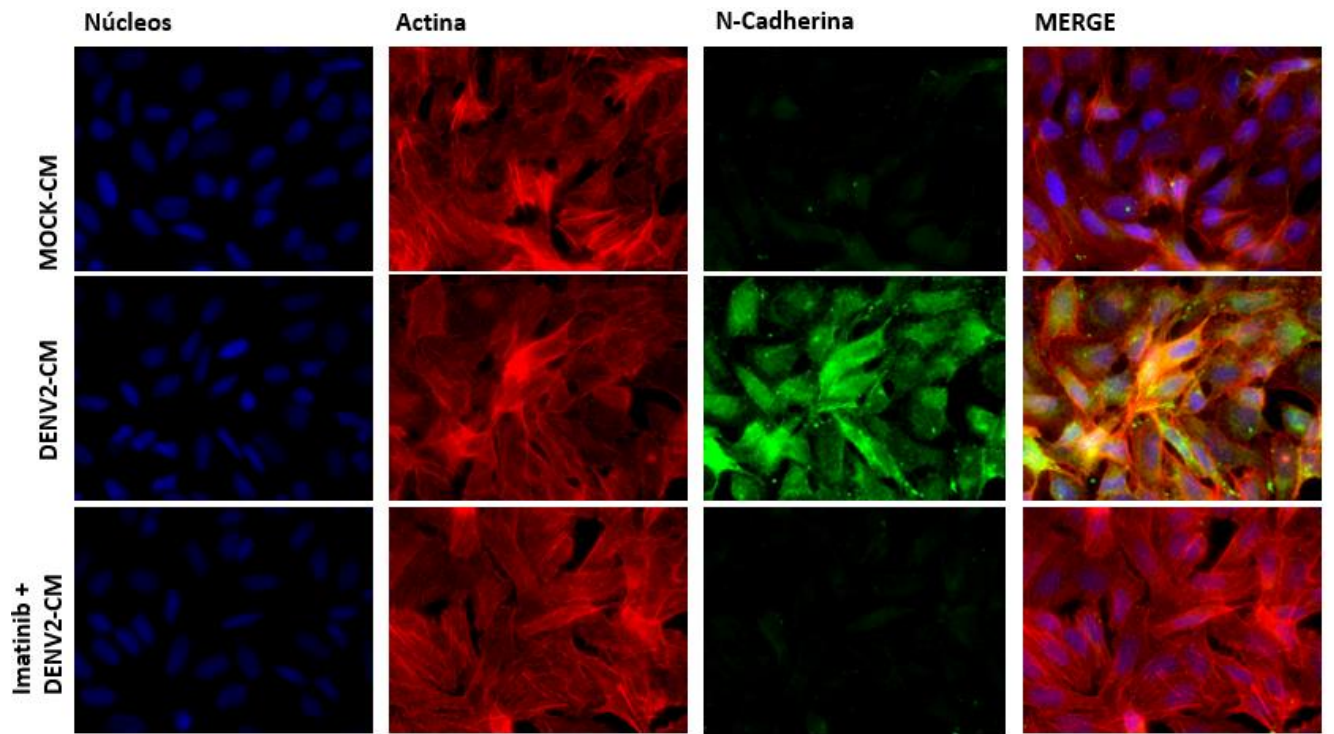
célula, proporcionando adhesión y estabilidad en los contactos intercelulares manteniendo la morfología característica endotelial.

Por otra parte, los factores solubles derivados de la infección incrementaron significativamente la expresión de reconocidos marcadores mesenquimales como lo son N-Cadherina y Vimentina (**Figura 12 B-C, G-H**). Además, el tratamiento con DENV2-CM+Imatinib redujo la expresión exacerbada de N-Cadherina y Vimentina inducida por los medios condicionados colectados tras la infección por DENV-2 (**Figura 12G-H**). No se encontraron cambios apreciables en la remodelación del citoesqueleto de actina bajo estas condiciones en comparación con el control (**Figura 12A-D**) Estos cambios fenotípicos demarcados por la alternancia en la expresión de proteínas específicas endoteliales y de marcadores mesenquimales en las células endoteliales reflejan una interrupción de las uniones intercelulares asociada al incremento de la permeabilidad vascular inducido por los componentes celulares y virales secretados tras la infección por DENV-2.

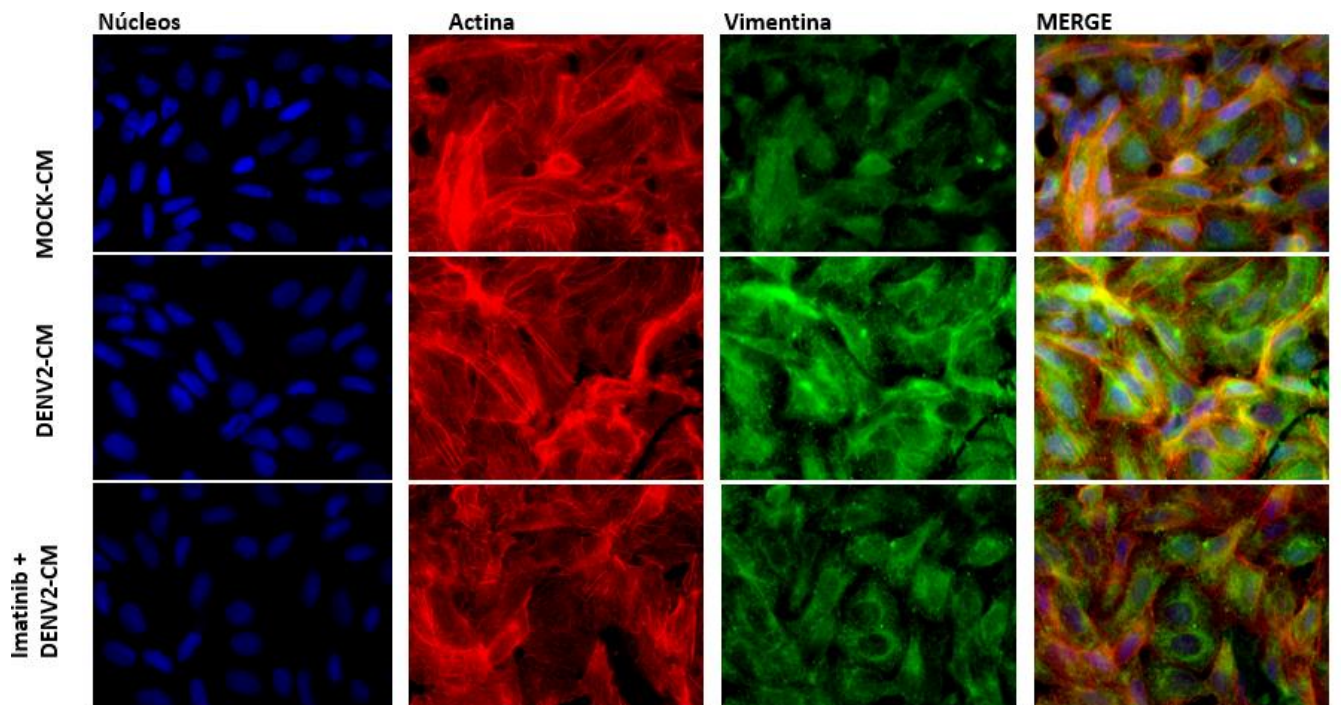
A.



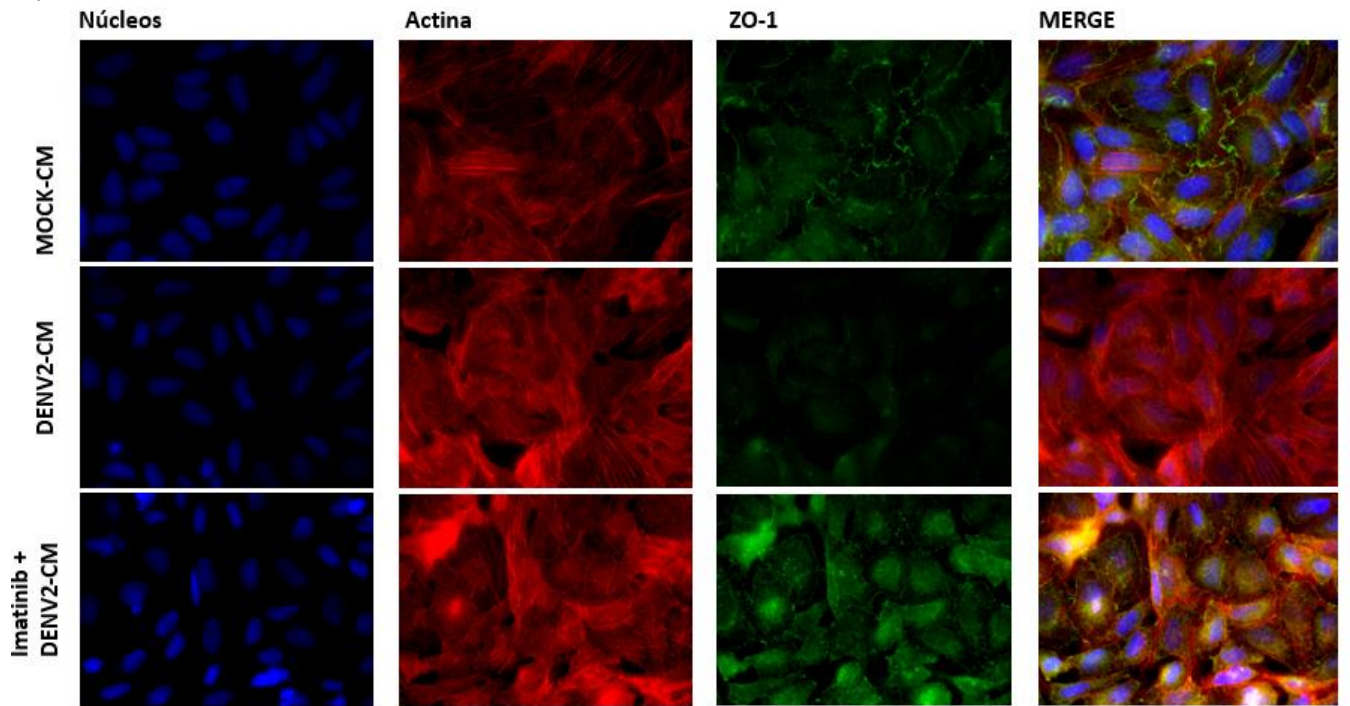
B.



C.

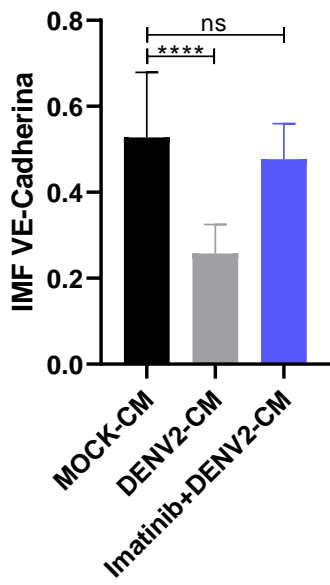


D.

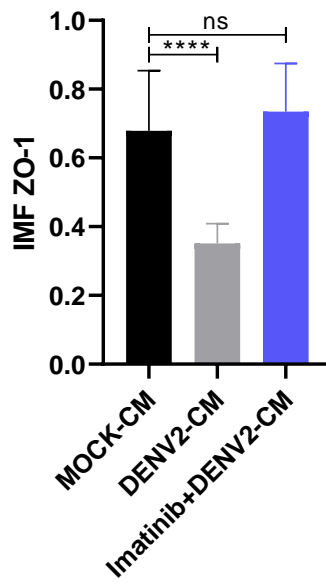


DENV2-CM M

E.



F.



G.

H.

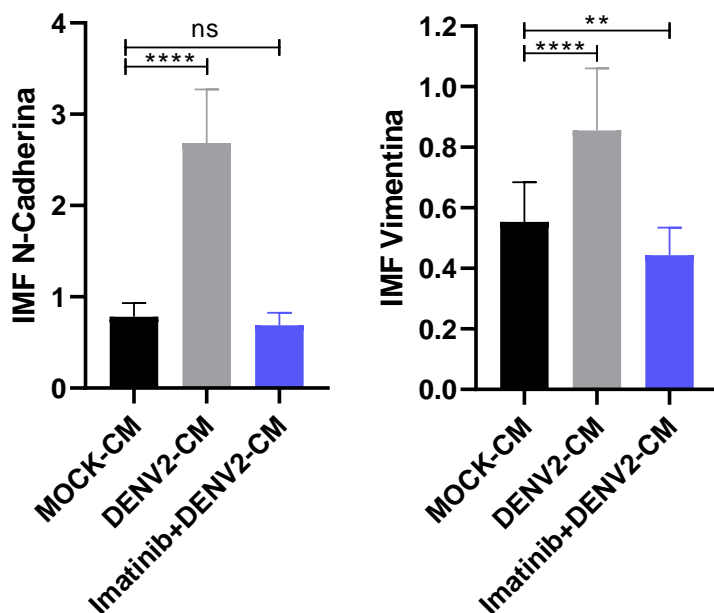


Figura 12. Disminución en la expresión de VE-Cadherina y ZO-1 e incremento de N-Cadherina y Vimentina en las células HMEC-1 por factores solubles liberados tras la infección por DENV-2. (A-D) Imágenes representativas por microscopía de fluorescencia cuantitativa en células HMEC-1 tratadas con medios condicionados colectados del control no infectado (MOCK-CM), de la infección por DENV-2 (DENV2-CM) y de la infección por DENV-2 más Imatinib (Imatinib+DENV2-CM). Las células se tiñeron para Actina con faloidina594 (en rojo), Núcleos con Hoescht (en azul), (A) anti VE-Cadherina, (B) anti N-Cadherina, (C) anti-vimentina y (D) ZO-1 (en verde). (E-H) Intensidad Media de Fluorescencia de los componentes celulares en células HMEC-1 bajo los diferentes tratamientos. La IMF se cuantificó empleando el software ImageJ. Las barras representan la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. El valor de p fue determinado por la prueba T Student de datos no apareados. (****): valor de $P < 0,0001$; (***): $P < 0,001$; (**): $P < 0,01$; (*): $P < 0,05$; ns: no significativo.

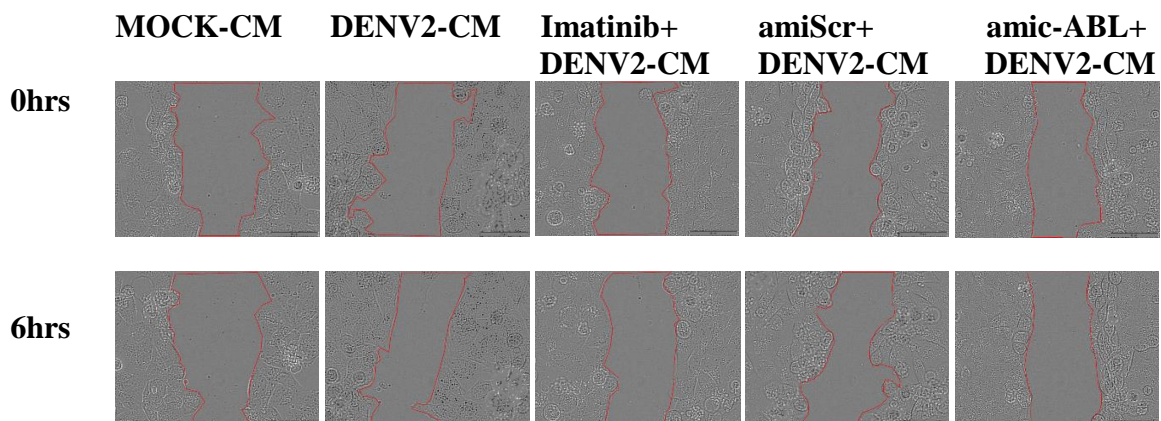
6.4.3 El incremento en la migración celular bajo el tratamiento con factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 es inhibido durante el silenciamiento de c-ABL.

Para evaluar el efecto de los factores solubles producidos en respuesta a la infección por DENV-2 en la actividad migratoria de las células endoteliales y posibles cambios fenotípicos asociados a la activación de la quinasa celular ABL, se empleó el ensayo de sellamiento de herida (Wound-healing). Para ello, las células HMEC-1 fueron tratadas con los medios condicionados provenientes del control no infectado (MOCK-CM), de la infección con DENV-2 (DENV2-CM), de la infección con DENV-2 más Imatinib como inhibidor farmacológico de la quinasa c-ABL (Imatinib+DENV2-CM), de la infección más el control

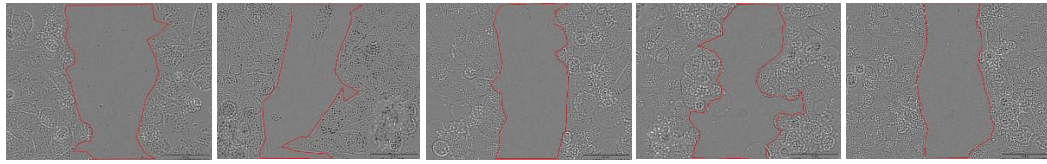
de transfección Scramble (amiScr+DENV2-CM) y de la infección por DENV-2 más el silenciamiento específico de c-ABL (amic-ABL+DENV2-CM), realizándose un registro durante 12 horas. Al observar el comportamiento celular en las diferentes condiciones de tratamiento, se encontró que hay una tendencia de sellamiento de la herida mayor en las células endoteliales expuestas a los medios condicionados colectados tras la infección por DENV-2 en células HMEC-1 en comparación con el control (**Figura 13A**). Además, este efecto de los factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 en la migración celular se revierte al tratar las células con el inhibidor Imatinib y al silenciar génicamente c-ABL, donde se observa que las células permanecen en el mismo punto al contrastarse 0 y 12 horas (**Figuras 13A**).

Estas observaciones son consistentes con los resultados obtenidos al cuantificar la efectividad de la reducción de la herida para las células tratadas con los medios condicionados provenientes de la infección por DENV-2, donde se evidencia un mayor porcentaje en la efectividad de la reducción la herida dado el incremento en la migración celular endotelial en comparación con el control (**Figura 13B**). A su vez, esta efectividad se reduce significativamente al silenciarse génicamente y/o inhibirse farmacológicamente la proteína c-ABL, anulando el efecto de los factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 (**Figura 13B**). Estos hallazgos sugieren que el potencial migratorio inducido por los factores solubles liberados tras la infección implica una cascada de señalización que involucra a la quinasa c-ABL. Además, el porcentaje de área de la herida en función del tiempo para cada condición contemplada en este experimento, muestra diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de área de herida a través del tiempo para las células tratadas con DENV2-CM e Imatinib+DENV2-CM y amic-ABL+DENV2-CM (**Figura 13C**), lo cual, refuerza la hipótesis de que los factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 favorecen la dinámica en el sellamiento de la herida celular mediante la activación de c-ABL. Éste incremento en la migración celular denotada por medio de esta técnica son compatibles con una posible Transición endotelio-mesénquima, donde se ha reportado que las células desestabilizan temporalmente las uniones intercelulares para migrar de manera direccional por estímulos extracelulares(108).

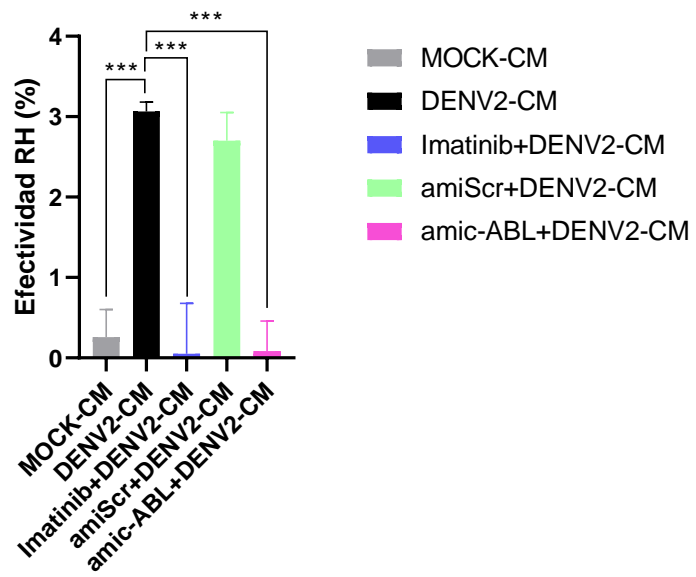
A.



12hrs



B.



C.

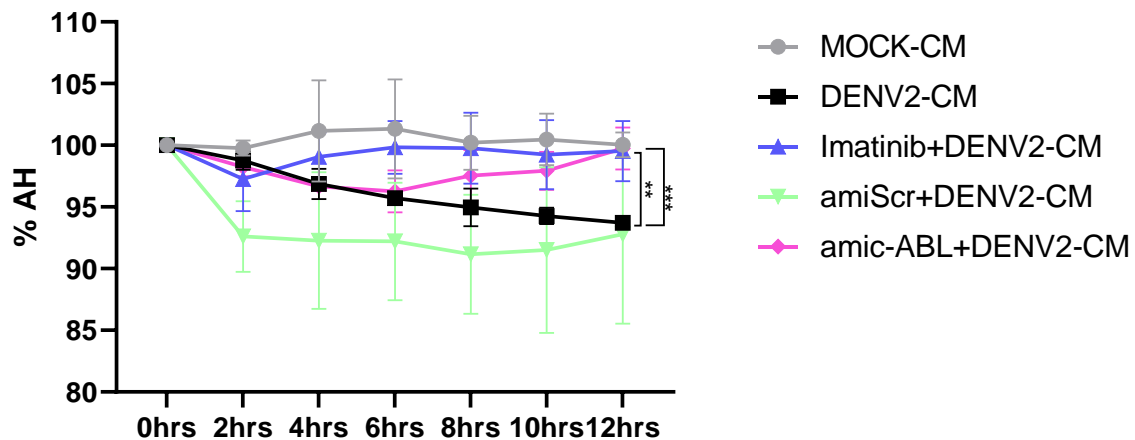


Figura 13. Factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 inducen la migración de células endoteliales mediante c-ABL. (A) Fotogramas representativos por condición experimental de las 0, 6 y 12 horas en las células HMEC-1. Los fotogramas fueron capturados por el programa Windows Media VLC y segmentadas las imágenes por el Software BioEdIP, el cual, delimita el área sin células (en rojo). (B) Efectividad en la reducción de la herida por condición. Se midió la diferencia entre el %AH inicial-%AH final para determinar la efectividad en la reducción de la herida por condición. (C) Porcentaje del área de la herida (%AH) en función del tiempo en las células HMEC-1 por tratamiento. Las barras representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. El valor de p fue determinado por la prueba ANOVA de una vía para la Efectividad RH (%) y Kruskal Wallis para %AH en el Software R. (***): $P < 0,001$; (**): $P < 0,01$; (*): $P < 0,05$.

7. DISCUSIÓN

La infección por DENV sigue siendo un foco de atención primario debido a su alta prevalencia, rápida expansión global, severas complicaciones y a la ausencia de un tratamiento eficaz contra la enfermedad. Los estudios concluyen una pobre eficacia y baja protección de la vacuna CYD-TDV (Dengvaxia®) para DENV, en especial para el serotipo 2(109). Uno de los principales retos para desarrollar un tratamiento antiviral contra DENV concierne a la posibilidad de selección de mutantes de escape resistentes al medicamento, dada la naturaleza de su material genético RNA con carencia de una RNA polimerasa con actividad correctora. Esto le permite al virus generar mutantes y evadir la presión ejercida por un medicamento antiviral basado en el virus (DAA, Direct-acting antiviral). No obstante, la estrategia antiviral basada en el hospedero (HTA, Host-targeted antivirals) supera en gran medida esta dificultad, ya que los factores celulares tienen mayor estabilidad genética y podrían proporcionar actividad antiviral de amplio espectro(110). En esta línea, buscar blancos terapéuticos celulares subvertidos por el virus sería una herramienta novedosa para contrarrestar la diversidad de síntomas provocados por la infección e incluso, el reposicionamiento de fármacos ya aprobados por la FDA que bloqueen las mismas moléculas o proteínas activas durante la infección presentaría ventajas económicas y menor cantidad de tiempo para su implementación.

En la fase crítica de la infección por DENV se presenta un incremento incontrolado de la permeabilidad vascular con hemorragias y falla multiorgánica que puede conllevar hasta la muerte. Esta fase suele cursar en el período de defervescencia o aclaramiento de la infección cuando la carga viral está en caída. Por tanto, diversos estudios han establecido que la infección no sería directamente responsable de la disfunción endotelial que se manifiesta clínicamente a pesar de una respuesta inmune innata robusta(111). En este sentido, se ha asociado la infección por DENV y la aparición del dengue grave en humanos con una secreción exacerbada de mediadores solubles como citoquinas/quimiocinas vasoactivas y proinflamatorias, factores de crecimiento y virales. Las células endoteliales se han descrito como fuentes importantes de factores celulares que contribuyen a la desestabilización de la barrera endotelial, por donde ocurre la fuga vascular(7,98,112).

En esta investigación, el enfoque se direccionó en dilucidar el papel de los factores solubles liberados tras la infección en la disfunción endotelial ocasionada por dengue en los casos más severos, por consiguiente, células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) fueron infectadas de manera sincronizada por DENV-2, obteniéndose una infección productiva de las mismas (**Figura 6**), lo que se traduce en producción de viriones titulables. La presencia de receptores que permitan la entrada viral como la proteína integrina $\alpha 5\beta 3$ en las células endoteliales y los resultados de PFU/mL insinúan permisividad en la infección por DENV-2 de las células HMEC-1(7,113). La infección fue similar a las dos MOI evaluadas MOI:5 y MOI:10, sugiriendo una capacidad máxima de producción de progenie viral y de infección en las células HMEC-1 lograda a una MOI de 5 (**Figura 6**). Permanece abierta la posibilidad de explorarse a profundidad empleando diferentes métodos

complementarios como RT-qPCR y microscopía de fluorescencia la cinética viral en las células endoteliales.

La quinasa celular ABL ha sido relacionada estrechamente en diferentes procesos infecciosos como en la entrada y unión a receptores de Poliomavirus(114), Coxsackievirus(115), HIV(116), liberación de viriones por el virus Vaccinia(117) y en etapas post-infecciosas de DENV-2(18). Aquí, se consideró el efecto de su inhibición farmacológica mediada por Imatinib en la infección por DENV-2 en células HMEC-1, hallándose una reducción significativa de las PFU/ml (**Figura 8**) en etapas iniciales de la infección (entrada viral) y en etapas post-infecciosas (liberación progenie viral). Esta inhibición en el proceso infeccioso por Imatinib puede deberse al bloqueo directo o indirecto de c-ABL, puesto que Imatinib no actúa de manera específica sobre c-ABL, existen otras quinasas que son inhibidas como Arg, c-KIT, PDGFR, entre otras(84). No obstante, se ha reportado que la línea celular HMEC-1 no expresa niveles relevantes de PDGF sin estímulos externos(118), por tanto, la inhibición del receptor no tendría efectos importantes a nivel celular *In Vitro*. Además, la infección por DENV *In Vivo* muestra una regulación negativa de esta proteína(119). Asimismo, aunque c-KIT puede expresarse en células endoteliales, su función podría estar asociada a vías de proliferación (JAK2/STATS), de supervivencia celular (PI3K/AKT/mTOR) y a la activación de quinasas Src que, corriente abajo activan c-ABL evidenciado por aumento en la fosforilación de CRK(120). Esto puede estar sugiriendo que la actividad inhibitoria de Imatinib sobre la infección por DENV, puede estar asociada directamente a la inhibición de c-ABL o de manera indirecta vía inhibición c-KIT.

De manera adicional, para la entrada del genoma viral y la liberación de viriones es clave la remodelación del citoesqueleto de actina(113). Previamente, se ha podido observar la polimerización y despolimerización de los filamentos de actina en tiempos tempranos de la infección con DENV-2 por microscopía de fluorescencia. A su vez, el tratamiento con inhibidores de la polimerización de actina como citocalasina D reduce la entrada viral e inhibe la liberación de nueva progenie viral(121). En estas etapas, la inhibición de proteínas involucradas en la regulación de la dinámica de actina como c-ABL podría ser el mecanismo por el cual se produce un efecto antiviral (**Figura 8**), bloqueando vías compartidas en la replicación viral como lo demuestra Clark y cols, donde la inhibición de c-ABL por acción de GNF-2 interfiere con la eficiencia de la replicación viral(18). En congruencia, se apunta a c-ABL como posible blanco celular para controlar la infección por DENV.

c-ABL tiene un rol central en diversos procesos celulares como la remodelación del citoesqueleto de actina(122), morfogénesis y migración celular por medio de la formación de filopodios, lamelipodios y otras proyecciones celulares(93). Esto se debe en parte a su capacidad para anclarse directamente a elementos del citoesqueleto(123). El silenciamiento génico de c-ABL en las células HMEC-1 mediante la transfección con miRNAs artificiales (amic-ABL) condujo a una redistribución del citoesqueleto de actina donde se aprecia una disminución en las fibras de tensión que aparecen notablemente en el control y en el control de transfección con la secuencia aleatoria Scramble (amiScr) (**Figura 10**). De igual manera, parece haber un incremento en la actina periférica en las células silenciadas para c-ABL, sin embargo, estas observaciones no son concluyentes para determinar que se trata de la actina cortical. Para ello, es necesario realizar un marcaje específico de esta estructura.

En paralelo, c-ABL está implicada en la regulación de las uniones adherentes en las células endoteliales que bajo un incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} conlleva a la desestabilización de VE-Cadherina en las uniones adherentes(12). Este fenómeno está impulsado por la estimulación de VEGF en células endoteliales y se ha reportado previamente que se encuentra incrementado en los pacientes con dengue grave(97). El tratamiento con los factores solubles provenientes de la infección por DENV-2 en las células HMEC-1 aumenta la expresión de c-ABL y promueve su activación (**Figura 11**). Dicha afirmación se sustenta al observar el incremento significativo en la expresión del blanco celular directo de la quinasa c-ABL, CRK II fosforilado. Este hallazgo abre la posibilidad a un número importante de vías de señalización y procesos celulares promovidos por los factores solubles derivados de la infección por DENV-2 en células endoteliales. La proteína adaptadora CRKII participa en procesos como la proliferación, adhesión y migración celular, donde se ha descrito su interacción con c-ABL para la formación de adhesiones focales y proyecciones membranales(124).

Los resultados hasta ahora obtenidos indican una posible interrupción de la homeostasis celular durante la estimulación con los factores celulares derivados de la infección por DENV-2 en las células endoteliales. Eso es comprobado con los ensayos de microscopía de fluorescencia cuantitativa donde proteínas específicas endoteliales pertenecientes a la arquitectura de las uniones intercelulares sufren una regulación negativa bajo la exposición a los medios condicionados colectados tras la infección, VE-Cadherina y ZO-1 (**Figura 12**). Esto es consistente con lo reportado previamente en la literatura, donde se describe que DENV induce permeabilidad vascular a través de la fosforilación e internalización de VE-Cadherina en células HMEC-1(63). Además, recientemente se detalló un mecanismo distinto por el cual DENV-2 induce fuga vascular, promoviendo la secreción de metaloproteinasa-9 de la matriz (MMP-9) vía activación del factor nuclear κB (NF- κB) y degradación de importantes proteínas de uniones estrechas mediante la interacción con ZO1/2(125). Sin embargo, una asociación entre los factores solubles liberados durante la infección y la expresión de proteínas de uniones estrechas en HMEC-1 no se había descrito antes.

Más aún, la tinción de marcadores indicativos de un fenotipo mesenquimal N-Cadherina y Vimentina incrementaron su expresión en las células HMEC-1 cuando fueron expuestas a los factores solubles provenientes de la infección por DENV-2 (**Figura 12**). Los filamentos intermedios como la Vimentina se observan en las células endoteliales en estados basales, sin embargo, su nivel de expresión y función difieren de una célula mesenquimal. Mientras que en una célula endotelial su presencia está vinculada al mantenimiento y soporte de la forma celular, en células mesenquimales móviles se expresa abundantemente y participa en la remodelación del citoesqueleto altamente dinámico. Se ha observado, por ejemplo, que su silenciamiento en miofibroblastos impide las propiedades de migración características de esta línea celular(126). Por otro lado, y en contraste con VE-cadherina, N-Cadherina promueve la angiogénesis y es expresada en los tejidos neuronales donde regula la proliferación y diferenciación de las células progenitoras neuronales, el “switch” o intercambio de E-cadherina por N-Cadherina está fuertemente asociado con incremento en patrones migratorios e invasivos, incluso detectados en cáncer y metástasis(16,127). Por tanto, la presencia de estos marcadores mesenquimales es sugestiva de un posible evento de Transición Endotelio-Mesenquima compatible con la disfunción endotelial presentada por DENV e inducida por los factores celulares secretados bajo la infección.

Aunque Imatinib inhibidor selectivo de c-ABL previno estos efectos potenciados por los medios condicionados derivados de la infección (**Figura 12**), aún no se puede asegurar la implicación de c-ABL en la pérdida de las uniones adherentes y estrechas y en la inducción de un fenotipo mesenquimal mediada específicamente por los factores celulares provenientes de la infección. Es necesario abordar la estrategia de inhibición específica con GNF-2, por ejemplo, o silenciamiento génico de la proteína para validar su participación.

Las células endoteliales sometidas a un evento de transdiferenciación celular como la EndMT involucran la pérdida de adhesión celular y reorganización del citoesqueleto, lo cual, se refleja en una morfología fusiforme sin polaridad apico-basal y un mayor potencial migratorio distintivo de células mesenquimales invasivas(16). Nuestros resultados de sellamiento de herida revelan un incremento significativo en la migración celular potenciada por los factores solubles producidos por las células HMEC-1 infectadas con DENV-2 (**Figura 13**). Esto es consistente con los análisis ejecutados por Álvarez y cols, donde en una ventana temporal de 6 horas obtuvieron resultados similares en el incremento de migración celular endotelial promovida por medios condicionados colectados de HMEC-1 infectadas por DENV-2(7). Esta actividad migratoria fue restituida cuando se inhibió con Imatinib y se silenció específicamente la quinasa c-ABL, denotando el requerimiento de esta proteína para generar el incremento en la motilidad celular ejercida por los factores celulares de la infección por DENV-2 (**Figura 13**). Previamente, ha sido documentado el papel determinante de la quinasa c-ABL para la migración celular e incluso para la formación de nuevas redes capilares en la angiogénesis tumoral, el tratamiento con Imatinib redujo la migración celular, la expresión ectópica de c-ABL mejoró la respuesta angiogénica y la generación de un mutante de la quinasa abolió la angiogénesis inducida por FGF(128). En concordancia con nuestros resultados, c-ABL aparece como un factor clave que media procesos de migración celular endotelial.

A pesar de que los experimentos fueron contemplados durante un lapso de 12 horas para los ensayos de sellamiento de herida y 48 horas de tratamiento para la fijación de las células y el marcaje de las proteínas respectivas por microscopía de fluorescencia, se obtuvieron hallazgos que sugieren un cambio fenotípico celular presentado por las células endoteliales y en el avance de la comprensión global del fenómeno patogénico inducido por DENV-2 (**Figura 14**) en contraste con el paradigma inmunopatogénico hasta ahora ampliamente aceptado y establecido. Finalmente, se postula para futuras investigaciones una posible relación entre la disfunción endotelial presentada por DENV en los casos más graves y una EndMT.

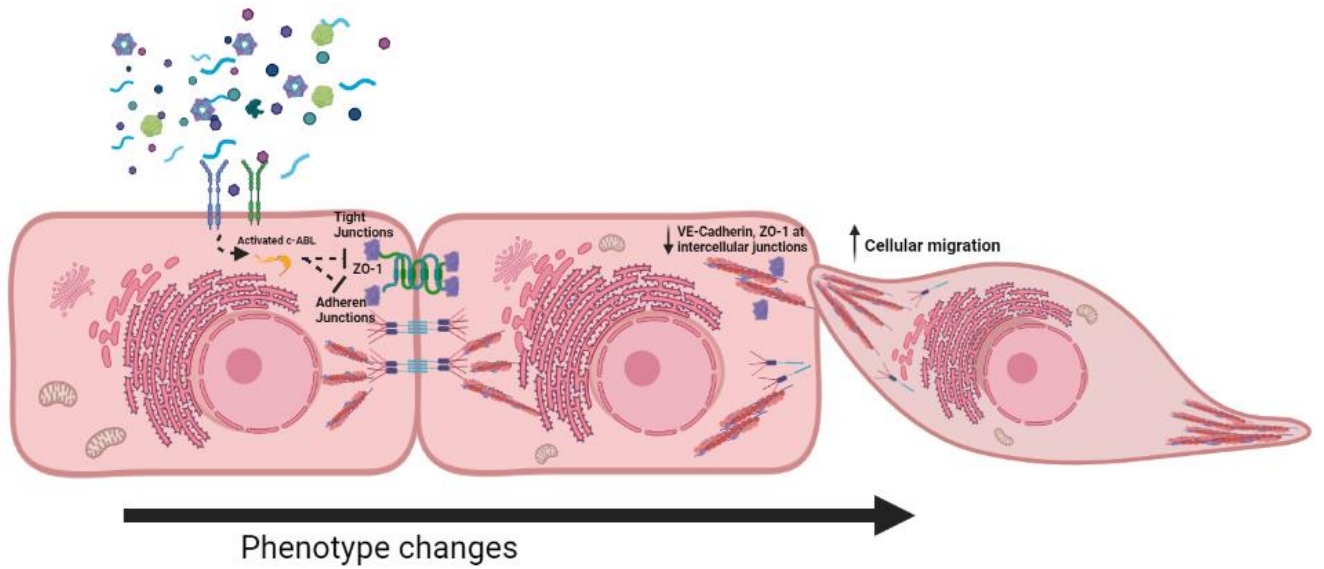


Figura 14. Esquema ilustrativo general del mecanismo propuesto. Factores solubles producidos durante la infección por DENV-2 inducen cambios fenotípicos en células endoteliales, asociados a la activación de la quinasa c-ABL. Esto se refleja por un aumento en la actividad migratoria de las células endoteliales y pérdida en la expresión de proteínas estructurales de las uniones intercelulares.

8. CONCLUSIONES

- Las células HMEC-1 se infectan de manera similar a una MOI de 5 como a una MOI de 10 con DENV-2.
- El tratamiento de las células HMEC-1 con el inhibidor Imatinib sugiere un efecto antiviral para DENV-2, inhibiendo procesos como la entrada y liberación viral.
- Las células HMEC-1 se transfectan correctamente con los microRNAs artificiales empleados y estos logran silenciar eficientemente la proteína c-ABL. Este silenciamiento se validó mediante la disminución en la expresión del blanco celular CRK II fosforilado de la quinasa c-ABL, además, se logra evidenciar reducción en la formación de las fibras de tensión en las células silenciadas para c-ABL.
- Los factores solubles producidos por las células HMEC-1 infectadas con DENV-2 incrementan la expresión de la quinasa c-ABL y su blanco celular fosforilado CRK II, sugiriendo su activación.
- Los datos obtenidos empleando la técnica de microscopía de fluorescencia cuantitativa indican una alteración en la expresión de proteínas presentes en las uniones intercelulares, VE-Cadherina, ZO-1 y N-Cadherina y un incremento concomitante de Vimentina, sugiriendo un posible cambio fenotípico celular.
- Las células HMEC-1 incrementan su actividad migratoria al ser expuestas a factores solubles liberados tras la infección por DENV-2 mediante c-ABL, demostrando cambios celulares de carácter migratorio.
- Se establece la posibilidad de que DENV-2 puede estar induciendo un fenómeno de plasticidad celular mediante la liberación de factores solubles que promueven cambios fenotípicos endoteliales asociados a la EndMT.

9. PERSPECTIVAS

- Estudiar funcionalmente el comportamiento de las células endoteliales bajo la exposición a los medios condicionados colectados tras la infección mediante un ensayo de Resistencia Eléctrica Transendotelial (TEER). Esto permitiría corroborar la participación de la proteína c-ABL en la disfunción endotelial ocasionada por los factores celulares derivados de la infección por DENV.
- Evaluar los patrones de expresión y las redes moleculares implicadas en la EndMT mediante Transcriptómica en las células endoteliales tratadas con los factores solubles liberados tras la infección por DENV-2.
- Comprobar funcionalmente por medio de ensayos clínicos la viabilidad del tratamiento con Imatinib y/o Knockdown de c-ABL para la disfunción endotelial producida por DENV.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Messina JP, Brady OJ, Golding N, Kraemer MUG, Wint GRW, Ray SE, et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat Microbiol* [Internet]. 2019 Sep 10;4(9):1508–15. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41564-019-0476-8>
2. World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control : new edition. WHO [Internet]. 2009; Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44188/1/9789241547871_eng.pdf
3. Yong YK, Wong WF, Vignesh R, Chattopadhyay I, Velu V, Tan HY, et al. Dengue Infection - Recent Advances in Disease Pathogenesis in the Era of COVID-19. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Jul 6;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.889196/full>
4. Bandara SMR, Herath HMMTB. Effectiveness of corticosteroid in the treatment of dengue – A systemic review. *Heliyon* [Internet]. 2018 Sep;4(9):e00816. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844018328470>
5. Claesson-Welsh L, Dejana E, McDonald DM. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Mol Med* [Internet]. 2021 Apr;27(4):314–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491420302938>
6. Vandembroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008.
7. Álvarez-Díaz DA, Gutiérrez-Díaz AA, Orozco-García E, Puerta-González A, Bermúdez-Santana CI, Gallego-Gómez JC. Dengue virus potentially promotes migratory responses on endothelial cells by enhancing pro-migratory soluble factors and miRNAs. *Virus Res*. 2019;
8. Tramontini Gomes de Sousa Cardozo F, Baimukanova G, Lanteri MC, Keating SM, Moraes Ferreira F, Heitman J, et al. Serum from dengue virus-infected patients with and without plasma leakage differentially affects endothelial cells barrier function in vitro. Jin D-Y, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Jun 6;12(6):e0178820. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0178820>
9. Cruciani V, Mikalsen S-O. Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biol Cell* [Internet]. 2002 Nov;94(7–8):433–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0248-4900%2802%2900014-X>
10. McCole DF. Phosphatase regulation of intercellular junctions. *Tissue Barriers* [Internet]. 2013 Dec 22;1(5):e26713. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/tisb.26713>
11. Zandy NL, Playford M, Pendergast AM. Abl tyrosine kinases regulate cell cell adhesion through Rho GTPases. 2007;104(45).
12. Chislock EM, Pendergast AM. Abl family kinases regulate endothelial barrier function in vitro and in mice. *PLoS One*. 2013;8(12):1–17.
13. Huang Y, Comiskey EO, Dupree RS, Li S, Koleske AJ, Burkhardt JK. The c-Abl tyrosine kinase regulates actin remodeling at the immune synapse. *Blood*. 2008;112(1):111–9.
14. Sossey-Alaoui K, Li X, Cowell JK. c-Abl-mediated Phosphorylation of WAVE3 Is

- Required for Lamellipodia Formation and Cell Migration. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Sep;282(36):26257–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820745497>
15. Li Z, Jimenez SA. Protein kinase C δ and c-Abl kinase are required for transforming growth factor β induction of endothelial-mesenchymal transition in vitro. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2011 Aug;63(8):2473–83. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.30317>
 16. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. *Physiol Rev* [Internet]. 2019 Apr 1;99(2):1281–324. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00021.2018>
 17. Chu JJH, Yang PL. Pharmacological C-Abl Kinase Inhibitors as Potential Anti-Viral Molecules for Dengue Virus. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2008 Dec;12:e297. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971208009272>
 18. Clark MJ, Miduturu C, Schmidt AG, Zhu X, Pitts JD, Wang J, et al. GNF-2 Inhibits Dengue Virus by Targeting Abl Kinases and the Viral e Protein. *Cell Chem Biol*. 2016;
 19. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2008 Aug;53(3):287–99. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2008.00420.x>
 20. Dalrymple NA, Mackow ER. Endothelial Cells Elicit Immune-Enhancing Responses to Dengue Virus Infection. *J Virol* [Internet]. 2012 Jun 15;86(12):6408–15. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00213-12>
 21. Cucunawangsih, Lugito NPH. Trends of Dengue Disease Epidemiology. *Virol Res Treat*. 2017 Jan 1;8:1178122X1769583.
 22. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*. 2014 Mar;22(3):138–46.
 23. Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480–96.
 24. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India*. 2015 Jan;71(1):67–70.
 25. World Health Organization. Global strategy for dengue prevention and control, 2012-2020. World Health Organization; 2012. 35 p.
 26. Suaya JA, Shepard DS, Siqueira JB, Martelli CT, Lum LCS, Tan LH, et al. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 May;80(5):846–55.
 27. PAHO/WHO Data - PLISA [Internet]. [citado 16 de noviembre del 2021]. Disponible en: <https://www.paho.org/data/index.php/en/>.
 28. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud Actualización Epidemiológica [Internet]. Available from: <https://bit.ly/2Pes0li>
 29. Pang T, Mak TK, Gubler DJ. Prevention and control of dengue—the light at the end of the tunnel. *Lancet Infect Dis*. 2017 Mar;17(3):e79–87.
 30. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect*. 2015

- Jan 1;4(1):1–5.
31. Wilder-Smith A, Gubler DJ. Dengue vaccines at a crossroad. *Science* (80-). 2015 Nov 6;350(6261):626–7.
 32. Saadatian-Elahi M, Horstick O, Breiman RF, Gessner BD, Gubler DJ, Louis J, et al. Beyond efficacy: The full public health impact of vaccines. *Vaccine*. 2016 Feb;34(9):1139–47.
 33. Horstick O, Tozan Y, Wilder-Smith A. Reviewing Dengue: Still a Neglected Tropical Disease? *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Apr 30;9(4):e0003632.
 34. Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, et al. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med*. 2015 Sep 24;373(13):1195–206.
 35. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997 Oct;51(1):151–78.
 36. Novella IS, Domingo E, Holland JJ. Rapid viral quasispecies evolution: implications for vaccine and drug strategies. *Molecular Medicine Today*. 1995.
 37. Figlerowicz M, Alejska M, Kurzyńska-Kokorniak A, Figlerowicz M. Genetic variability: The key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev*. 2003;23(4):488–518.
 38. Mayer S V., Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop* [Internet]. 2017 Feb;166:155–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X16306246>
 39. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol* [Internet]. 2008 Apr;3(2):155–65. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17460913.3.2.155>
 40. Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Sep 26;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02180/full>
 41. Murugesan A, Manoharan M. Dengue Virus. In: *Emerging and Reemerging Viral Pathogens* [Internet]. Elsevier; 2020. p. 281–359. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128194003000168>
 42. Aktepe TE, Mackenzie JM. Shaping the flavivirus replication complex: It is curvaceous! *Cell Microbiol* [Internet]. 2018 Aug 29;20(8). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cmi.12884>
 43. Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2008 Sep 30;6(9):699–708. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1928>
 44. Marovitch M, Grouard-Vogel G, Eller M, Tassaneetrithep B, Birx D, Hayes C, et al. Human Dendritic Cells as Targets of Dengue Virus Infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* [Internet]. 2001 Dec;6(3):219–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15529096>
 45. Johnston LJ, King NJC, Halliday GM. Langerhans Cells Migrate to Local Lymph Nodes Following Cutaneous Infection with an Arbovirus. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2000 Mar;114(3):560–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15408103>
 46. Srikiatkachorn A, Mathew A, Rothman AL. Immune-mediated cytokine storm and

- its role in severe dengue. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2017 Jul 11;39(5):563–74. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00281-017-0625-1>
47. Hung NT, Lei H, Lan NT, Lin Y, Huang K, Lien LB, et al. Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: A Study of Clinical and Cytokine Profiles. *J Infect Dis* [Internet]. 2004 Jan 15;189(2):221–32. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/380762>
 48. Zhang F, Kramer C V. Corticosteroids for dengue infection. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2014 Jun 30; Available from: <https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003488.pub3>
 49. Shukla R, Ramasamy V, Shanmugam RK, Ahuja R, Khanna N. Antibody-Dependent Enhancement: A Challenge for Developing a Safe Dengue Vaccine. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020 Oct 22;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.572681/full>
 50. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirisakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, et al. Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. *Science* (80-) [Internet]. 2010 May 7;328(5979):745–8. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1185181>
 51. Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* (80-) [Internet]. 2017 Nov 17;358(6365):929–32. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aan6836>
 52. Yuan SY, Rigor RR. Regulation of Endothelial Barrier Function. *Regul Endothel Barrier Funct* [Internet]. 2010 [cited 2021 Dec 29]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54117/>
 53. Malavige GN, Ogg GS. Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology* [Internet]. 2017 Jul 24;151(3):261–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imm.12748>
 54. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* [Internet]. 2007 Jun 26;454(3):345–59. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00424-007-0212-8>
 55. Dejana E. Endothelial cell–cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2004 Apr;5(4):261–70. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrm1357>
 56. Scaturro P, Cortese M, Chatel-Chaix L, Fischl W, Bartenschlager R. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. Pierson TC, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2015 Nov 12;11(11):e1005277. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005277>
 57. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation. *J Immunol* [Internet]. 2011 Jul 1;187(1):424–33. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1100750>
 58. Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med* [Internet]. 2015 Sep 9;7(304):304ra141. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26355030>

59. Puerta-Guardo H, Glasner DR, Harris E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog*. 2016;
60. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The Structure and Function of the Endothelial Glycocalyx Layer. *Annu Rev Biomed Eng* [Internet]. 2007 Aug 15;9(1):121–67. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959>
61. Glasner DR, Ratnasiri K, Puerta-Guardo H, Espinosa DA, Beatty PR, Harris E. Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. Kuhn RJ, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2017 Nov 9;13(11):e1006673. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1006673>
62. Puerta-Guardo H, Glasner DR, Espinosa DA, Biering SB, Patana M, Ratnasiri K, et al. Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Rep* [Internet]. 2019 Feb;26(6):1598–1613.e8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124719300543>
63. Singh S, Anupriya MG, Modak A, Sreekumar E. Dengue virus or NS1 protein induces trans-endothelial cell permeability associated with VE-Cadherin and RhoA phosphorylation in HMEC-1 cells preventable by angiopoietin-1. *J Gen Virol*. 2018;
64. Mehta D, Malik AB. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiol Rev* [Internet]. 2006 Jan;86(1):279–367. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00012.2005>
65. Komarova Y, Malik AB. Regulation of Endothelial Permeability via Paracellular and Transcellular Transport Pathways. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2010 Mar 17;72(1):463–93. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-021909-135833>
66. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* [Internet]. 2005 Sep;437(7058):497–504. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature03987>
67. Minshall RD, Malik AB. Transport Across the Endothelium: Regulation of Endothelial Permeability. In: *The Vascular Endothelium I* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; p. 107–44. Available from: http://link.springer.com/10.1007/3-540-32967-6_4
68. Lampugnani MG, Dejana E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 1997 Oct;9(5):674–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067497801214>
69. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* [Internet]. 2008 Jul 1;121(13):2115–22. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/121/13/2115/30216/The-role-of-adherens-junctions-and-VE-cadherin-in>
70. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiol Rev* [Internet]. 2004 Jul;84(3):869–901. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00035.2003>
71. Leckband D, Sivasankar S. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2000 Oct;12(5):587–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067400001368>
72. Gavard J. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett* [Internet]. 2009 Jan

- 5;583(1):1–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2008.11.032>
73. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the β -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2006 Nov 22;8(11):1223–34. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncb1486>
74. Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. Histamine Induces Tyrosine Phosphorylation of Endothelial Cell-to-Cell Adherens Junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1999 Oct;19(10):2286–97. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.19.10.2286>
75. Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;
76. Waschke J, Baumgartner W, Adamson RH, Zeng M, Aktories K, Barth H, et al. Requirement of Rac activity for maintenance of capillary endothelial barrier properties. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2004 Jan;286(1):H394–401. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00221.2003>
77. Kooistra MRH, Dubé N, Bos JL. Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J Cell Sci* [Internet]. 2007 Jan 1;120(1):17–22. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/120/1/17/29562/Rap1-a-key-regulator-in-cell-cell-junction>
78. Koning NJ, de Lange F, van Meurs M, Jongman RM, Ahmed Y, Schwarte LA, et al. Reduction of vascular leakage by imatinib is associated with preserved microcirculatory perfusion and reduced renal injury markers in a rat model of cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth* [Internet]. 2018 Jun;120(6):1165–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007091217541781>
79. Magruder JT, Grimm JC, Crawford TC, Johnston L, Santhanam L, Stephens RS, et al. Imatinib Is Protective Against Ischemia-Reperfusion Injury in an Ex Vivo Rabbit Model of Lung Injury. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2018 Mar;105(3):950–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003497517313462>
80. Aman J, van Bezu J, Damanafshan A, Huveneers S, Eringa EC, Vogel SM, et al. Effective Treatment of Edema and Endothelial Barrier Dysfunction With Imatinib. *Circulation* [Internet]. 2012 Dec 4;126(23):2728–38. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.134304>
81. Rizzo AN, Aman J, van Nieuw Amerongen GP, Dudek SM. Targeting Abl Kinases to Regulate Vascular Leak During Sepsis and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2015 May;35(5):1071–9. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.115.305085>
82. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. *Science* (80-) [Internet]. 2000 Sep 15;289(5486):1938–42. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.289.5486.1938>
83. Lin Y-L, Meng Y, Jiang W, Roux B. Explaining why Gleevec is a specific and potent inhibitor of Abl kinase. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013 Jan 29;110(5):1664–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1214330110>
84. Manley PW, Cowan-Jacob SW, Buchdunger E, Fabbro D, Fendrich G, Furet P, et al. Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *Eur J Cancer* [Internet]. 2002 Sep;38:S19–27. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804902805998>
85. Wang X, Wang L, Garcia JGN, Dudek SM, Shekhawat GS, Dravid VP. The Significant Role of c-Abl Kinase in Barrier Altering Agonists-mediated Cytoskeletal Biomechanics. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 17;8(1):1002. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-19423-w>
 86. Lin F, Wang N, Zhang T-C. The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process. *IUBMB Life* [Internet]. 2012 Sep;64(9):717–23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.1059>
 87. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* [Internet]. 2008 Nov 16;99(9):1375–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/6604662>
 88. Mendoza FA, Piera-Velazquez S, Farber JL, Feghali-Bostwick C, Jiménez SA. Endothelial Cells Expressing Endothelial and Mesenchymal Cell Gene Products in Lung Tissue From Patients With Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2016 Jan;68(1):210–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.39421>
 89. Li A, Peng W, Xia X, Li R, Wang Y, Wei D. Endothelial-to-Mesenchymal Transition: A Potential Mechanism for Atherosclerosis Plaque Progression and Destabilization. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2017 Nov;36(11):883–91. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/dna.2017.3779>
 90. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* [Internet]. 2007 Aug 29;13(8):952–61. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1613>
 91. Sabbineni H, Verma A, Somanath PR. Isoform-specific effects of transforming growth factor β on endothelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Physiol* [Internet]. 2018 Nov;233(11):8418–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.26801>
 92. Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial–mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem J* [Internet]. 2011 Aug 1;437(3):515–20. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/437/3/515/45844/Transforming-growth-factor-2-promotes-Snail>
 93. Bradley WD, Koleske AJ. Regulation of cell migration and morphogenesis by Abl-family kinases: emerging mechanisms and physiological contexts. *J Cell Sci* [Internet]. 2009 Oct 1;122(19):3441–54. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/122/19/3441/30556/Regulation-of-cell-migration-and-morphogenesis-by>
 94. Antoku S, Saksela K, Rivera GM, Mayer BJ. A crucial role in cell spreading for the interaction of Abl PxxP motifs with Crk and Nck adaptors. *J Cell Sci* [Internet]. 2008 Sep 15;121(18):3071–82. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/121/18/3071/30205/A-crucial-role-in-cell-spreading-for-the>
 95. Cleary RA, Wang R, Waqar O, Singer HA, Tang DD. Role of c-Abl tyrosine kinase in smooth muscle cell migration. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2014 Apr 15;306(8):C753–61. Available from:

- <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00327.2013>
96. Singh S, Anupriya MG, Modak A, Sreekumar E. Dengue virus or NS1 protein induces trans-endothelial cell permeability associated with VE-Cadherin and RhoA phosphorylation in HMEC-1 cells preventable by Angiopoietin-1. *J Gen Virol* [Internet]. 2018 Dec 1;99(12):1658–70. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001163>
 97. Appanna R, Sekaran SD, Lum LCS, Ponnampalavanar SA, Wang SM. Cytokine Factors Present in Dengue Patient Sera Induces Alterations of Junctional Proteins in Human Endothelial Cells. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2012 Nov 7;87(5):936–42. Available from: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.2012.11-0606>
 98. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Escobar Gutierrez A, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol*. 2004;85(7):1801–13.
 99. Kanlaya R, Pattanakitsakul S, Sinchaikul S, Chen S-T, Thongboonkerd V. Alterations in Actin Cytoskeletal Assembly and Junctional Protein Complexes in Human Endothelial Cells Induced by Dengue Virus Infection and Mimicry of Leukocyte Transendothelial Migration. *J Proteome Res* [Internet]. 2009 May 1;8(5):2551–62. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr900060g>
 100. Álvarez-Díaz DA, Gutiérrez-Díaz AA, Orozco-García E, Puerta-González A, Bermúdez-Santana CI, Gallego-Gómez JC. Dengue virus potentially promotes migratory responses on endothelial cells by enhancing pro-migratory soluble factors and miRNAs. *Virus Res* [Internet]. 2019 Jan;259:68–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170218305161>
 101. Vervaeke P, Vermeire K, Liekens S. Endothelial dysfunction in dengue virus pathology. *Reviews in Medical Virology*. 2015.
 102. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: Implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;
 103. Mackow ER, Gorbunova EE, Gavrillovskaya IN. Endothelial cell dysfunction in viral hemorrhage and edema. *Front Microbiol*. 2015;
 104. Spiropoulou CF, Srikiatkachorn A. The role of endothelial activation in dengue hemorrhagic fever and hantavirus pulmonary syndrome. *Virulence*. 2013.
 105. Roa-Linares VC, Brand YM, Agudelo-Gomez LS, Tangarife-Castaño V, Betancur-Galvis LA, Gallego-Gomez JC, et al. Anti-herpetic and anti-dengue activity of abietane ferruginol analogues synthesized from (+)-dehydroabietylamine. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2016 Jan;108:79–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523415303469>
 106. Flint, Jane, Vincent R. Racaniello, Glenn F. Rall AMS. *Principles of Virology*. 4th Edition.
 107. Roche Diagnostics. X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent. 2013;(06):1–5.
 108. Islam S, Boström KI, Di Carlo D, Simmons CA, Tintut Y, Yao Y, et al. The Mechanobiology of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. *Front Physiol* [Internet]. 2021 Sep 9;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.734215/full>
 109. da Silveira LTC, Tura B, Santos M. Systematic review of dengue vaccine efficacy. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2019 Dec 28;19(1):750. Available from:

- <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-4369-5>
110. Debing Y, Neyts J, Delang L. The future of antivirals: Broad-spectrum inhibitors. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2015.
 111. Mishra R, Lata S, Ali A, Banerjea AC. Dengue haemorrhagic fever: a job done via exosomes? *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2019 Jan 1;8(1):1626–35. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2019.1685913>
 112. Calvert JK, Helbig KJ, Dimasi D, Cockshell M, Beard MR, Pitson SM, et al. Dengue Virus Infection of Primary Endothelial Cells Induces Innate Immune Responses, Changes in Endothelial Cells Function and Is Restricted by Interferon-Stimulated Responses. *J Interf Cytokine Res* [Internet]. 2015 Aug;35(8):654–65. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2014.0195>
 113. Zamudio-Meza H, Castillo-Alvarez A, González-Bonilla C, Meza I. Cross-talk between Rac1 and Cdc42 GTPases regulates formation of filopodia required for dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells. *J Gen Virol*. 2009;90(12):2902–11.
 114. Swimm AI, Bornmann W, Jiang M, Imperiale MJ, Lukacher AE, Kalman D. Abl Family Tyrosine Kinases Regulate Sialylated Ganglioside Receptors for Polyomavirus. *J Virol* [Internet]. 2010 May;84(9):4243–51. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00129-10>
 115. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-Induced Abl and Fyn Kinase Signals Permit Cocksackievirus Entry through Epithelial Tight Junctions. *Cell* [Internet]. 2006 Jan;124(1):119–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867405012730>
 116. Harmon B, Campbell N, Ratner L. Role of Abl Kinase and the Wave2 Signaling Complex in HIV-1 Entry at a Post-Hemifusion Step. Trkola A, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Jun 17;6(6):e1000956. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000956>
 117. Newsome TP, Weisswange I, Frischknecht F, Way M. Abl collaborates with Src family kinases to stimulate actin-based motility of vaccinia virus. *Cell Microbiol* [Internet]. 2006 Feb;8(2):233–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2005.00613.x>
 118. Moon HJ, Yurube T, Lozito TP, Pohl P, Hartman RA, Sowa GA, et al. Effects of secreted factors in culture medium of annulus fibrosus cells on microvascular endothelial cells: elucidating the possible pathomechanisms of matrix degradation and nerve in-growth in disc degeneration. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2014 Feb;22(2):344–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458413010418>
 119. Dhenni R, Yohan B, Alisjahbana B, Lucanus A, Riswari SF, Megawati D, et al. Comparative cytokine profiling identifies common and unique serum cytokine responses in acute chikungunya and dengue virus infection. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2021 Dec 2;21(1):639. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-021-06339-6>
 120. Voytyuk O, Lennartsson J, Mogi A, Caruana G, Courtneidge S, Ashman LK, et al. Src Family Kinases Are Involved in the Differential Signaling from Two Splice Forms of c-Kit. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Mar;278(11):9159–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819712861>
 121. Wang J-L, Zhang J-L, Chen W, Xu X-F, Gao N, Fan D-Y, et al. Roles of Small GTPase Rac1 in the Regulation of Actin Cytoskeleton during Dengue Virus

- Infection. Guzman MG, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2010 Aug 31;4(8):e809. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000809>
122. Woodring PJ, Hunter T, Wang JYJ. Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *J Cell Sci*. 2003;116(13):2613–26.
 123. Colicelli J. ABL Tyrosine Kinases: Evolution of Function, Regulation, and Specificity. *Sci Signal* [Internet]. 2010 Sep 14;3(139). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.3139re6>
 124. Antoku S, Mayer BJ. Distinct roles for Crk adaptor isoforms in actin reorganization induced by extracellular signals. *J Cell Sci* [Internet]. 2009 Nov 15;122(22):4228–38. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/122/22/4228/31026/Distinct-roles-for-Crk-adaptor-isoforms-in-actin>
 125. Pan P, Li G, Shen M, Yu Z, Ge W, Lao Z, et al. DENV NS1 and MMP-9 cooperate to induce vascular leakage by altering endothelial cell adhesion and tight junction. Suthar M, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2021 Jul 26;17(7):e1008603. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1008603>
 126. Ciszewski WM, Wawro ME, Sacewicz-Hofman I, Sobierajska K. Cytoskeleton Reorganization in EndMT—The Role in Cancer and Fibrotic Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Oct 27;22(21):11607. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11607>
 127. Loh C-Y, Chai J, Tang T, Wong W, Sethi G, Shanmugam M, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells* [Internet]. 2019 Sep 20;8(10):1118. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1118>
 128. Yan W, Bentley B, Shao R. Distinct Angiogenic Mediators Are Required for Basic Fibroblast Growth Factor– and Vascular Endothelial Growth Factor–induced Angiogenesis: The Role of Cytoplasmic Tyrosine Kinase c-Abl in Tumor Angiogenesis. Ginsberg M, editor. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2008 May;19(5):2278–88. Available from: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e07-10-1068>