



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

RESPUESTA INMUNE DE LINFOCITOS B INDUCIDA POR EL
VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO II EN UN MODELO MURIDO.

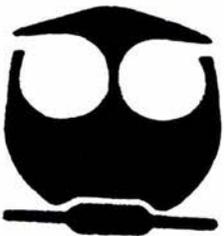
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ADRIANA BRIZUELA GARCIA



MEXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

JURADO

Presidente: Profr. María Dolores Lastra Azpilicueta.

Vocal: Profr. Rodolfo Pastelin Palacios.

Secretario: Profr. Constantino III Roberto López Macías.

1er. Suplente: Profr. Mónica Berenice Heras Chavarria.

2o. Suplente: Profr Armando Isibasi Araujo.

El presente trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el Laboratorio de la Dra. Leticia Cedillo Barrón del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) y en el Laboratorio del Dr. Leopoldo Flores Romo Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV.



Dr. Constantino III Roberto López Macías
ASESOR



Dr. Leopoldo Flores Romo
SUPERVISOR TÉCNICO



Adriana Brizuela García
SUSTENTANTE

NOMBRE: Adriana Brizuela
García
FECHA: 11/04/04
FIRMA: azg

DEDICATORIAS.

A mis papás, por haberme apoyado durante todo este tiempo, por toda su paciencia y cariño. Saben que los quiero y los admiro. MUCHAS GRACIAS.

A mis hermanos, creanme que sin ustedes no lo hubiera logrado, gracias por estar ahí cada vez que lo necesito, por todos sus consejos y todos los buenos ratos que hemos pasado juntos, por que me han enseñado que con trabajo se puede alcanzar cualquier meta, por ser mis mejores amigos. Los quiero mucho.

A todos mis tíos y primos, gracias por su apoyo y cariño.

A Jovanna, Laura, Rodrigo y Erick por todos los años que hemos compartido, gracias por haberme permitido crecer junto a ustedes, por que se que puedo contar con ustedes en cualquier momento.

A Elizabeth, Susi y Diana por que ustedes me enseñaron una definición diferente de la amistad y de la vida, saben que pueden contar conmigo siempre.

A Iara, Susi, Jorge, Milet, Charmi, Ale, Laura, Gisela, Toño, Angel y todos mis compañeros de la facultad, no saben como disfrute la carrera gracias a ustedes, hicieron que este periodo fuera uno de los más increíbles en mi vida. Por el apoyo, en todo los aspectos, que me ofrecieron cuando lo necesite. Gracias.

A todo el laboratorio del laboratorio del Dr. Leopoldo Flores Romo, principalmente a Jay por ofrecerme su amistad, cariño y por hacer que éste trabajo también fuera divertido.

A Andrés por enseñarme que las cosas no son siempre como yo creo, y enseñarme otro ángulo de la vida.

A Tavo por todo el apoyo que me has dado, por que siempre tienes las palabras justa para tranquilizarme en mi histeria, por aguantarme y a aceptarme como soy, por respetar cada una de mis decisiones. No sabes como te quiero y te admiro. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto fue financiado por el Fondo para el Fomento a la Investigación (FOFOI) del Instituto Mexicano del Seguro Social. Proyecto FP 2003/020. Y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Proyecto No. 33137-M.

Agradezco al Dr. Constantino López Macias por la confianza brindada, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, sus consejos y paciencia durante la realización de éste trabajo.

Agradezco al Dr. Leopoldo Flores Romo por confiar en mí, por la paciencia, consejos, apoyo, supervisión, corrección de mis errores y la constante transmisión de conocimientos a lo largo del desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. Isibasi y a todo su equipo de trabajo por permitirme ser parte de él.

Al Maestro en Ciencias Yairh A. Limón Flores por su constante supervisión, apoyo, por alentarme a seguir a pesar de los problemas, por sus ideas y sugerencias en el desarrollo de mi trabajo.

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón por todo el apoyo dado y por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al laboratorio de la Dra. Leticia Cedillo Barrón (Gaby, Julio Norma, Rosendo y Melina) y al laboratorio del Dr. Polo (Jay, Yairh, Miguel, Selene, Raquel, Mónica, Gina, Alex,

Jane, Oscar, Adriana y Luis) por ser parte fundamental en el desarrollo de mi trabajo, ayudando en la resolución de problemas, aportando sus punto de vista e ideas.

Al laboratorio de la Dra. Rosa María del Ángel por donarme las células C6/36.

Al Dr. Escobar del InDRE por donarme el DV.

Al maestro en Ciencias Héctor Vivanco Cid por su apoyo.

A la Maestra en Ciencias Gabriela Mellado Sánchez quien me ayudó en la estandarización de distintas técnicas así como en la producción de la proteína recombinante NS1.

A la Q.B.P. Juana Calderón Amador por todo el apoyo brindado, su ayuda y asesoría técnica, sus valiosos consejos e intervenciones durante el desarrollo de mi trabajo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	7
RESUMEN.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. ANTECEDENTES.....	12
1. Enfermedades por el virus del dengue (DV).....	12
1.1 Dengue Clásico o Fiebre por Dengue (FD).....	13
1.2 Dengue Hemorrágico (DHF).....	14
1.3 Síndrome de choque por dengue (SSD).....	15
2. Virus del Dengue.....	16
2.1 Proteínas estructurales.....	16
2.2 Proteínas no estructurales.....	18
2.3 Replicación del DV.....	19
3. Infección por DV.....	21
3.1 Mecanismos de entrada y células blanco.....	21
3.2 Inmunopatogenicidad del DV.....	23
4. Respuesta inmune humoral.....	27
4.1 Centros germinales.....	31
5. Respuesta inmune vs DV.....	33
5.1 Respuesta inmune innata.....	33
5.2 Respuesta inmune adaptativa.....	34
6. Modelos animales.....	37
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	40
IV. HIPÓTESIS.....	41
V. OBJETIVO GENERAL.....	41
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....	41
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
1. Material biológico.....	42
2. Propagación del DV2.....	45
2.1 Línea celular C6/36 (<i>A. albopictus</i>).....	45
2.2 Infección de células C6/36 con el virus del dengue.....	45
2.3 Obtención de partículas virales.....	45
3. Producción de la proteína NS1-GST.....	46
3.1 Transformación de las bacterias <i>E. coli</i> BL-21 con la construcción NS1-pGEX -4T2.....	46
3.2 Inducción de la expresión de la proteína NS1-GST en el plásmido pGEX-4-T2.46	
3.3 Purificación de la proteína NS1-GST.....	47
4. Inmunizaciones.....	48
5. Determinación de anticuerpos anti NS1 y anti NS3 por el método de ELISA.....	49
6. Determinación de anticuerpos anti E por el método de Western blot.....	50
7. Determinación de centros germinales.....	51
VIII. RESULTADOS.....	52
1. PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA NS1-GST.....	52

2.	DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-NS1, ANTI-NS3 y ANTI- E.	
	53	
3.	DETERMINACIÓN DE CENTROS GERMINALES	57
IX.	DISCUSIÓN.....	64
X.	CONCLUSIONES.....	71
XI.	PERSPECTIVAS	72
	APÉNDICES.....	73
	Apéndice 1.....	73
	Apéndice 2.....	74
	Apéndice 3.....	76
	Apéndice 4.....	77
	BIBLIOGRAFÍA.....	79

ABREVIATURAS UTILIZADAS.

Abs	Absorbancia
Ag	Antígeno
ADCC	Citotoxicidad dependiente de anticuerpos
Ac's	Anticuerpos
ADE	Fenómeno de infección facilitada
CMN	Células mononucleares.
DCs	Células dendríticas
DHF	Fiebre hemorrágica por dengue
D.O.	Densidad óptica
DSS	Síndrome de choque por dengue
DV	Virus del Dengue
DV2	Virus del dengue serotipo 2
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
Fc	Fracción cristalizable de los anticuerpos
FDC	Células dendríticas foliculares
FD	Fiebre del dengue o dengue clásico
GST	Glutación S transferasa
IC	Intracraneal
ID	Intradérmica
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina

IM	Intramuscular.
IFN	Interferón
IP	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil tiogalactósido
IR (RNA-)	Intermediario de replicación del virus del dengue (RNA de sentido negativo)
IV	Intravenosa
NK	Células citotóxicas naturales
PNA	Aglutinina de cacahuete (Peanut Agglutinin)
RNA+	RNA de sentido positivo, genoma viral
SDS	Duodecil sulfato de sodio.
Th	Linfocitos T cooperadores
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFP	Unidades formadoras de placa.

RESUMEN.

El dengue es una de la virosis más importantes a nivel mundial transmitida por vectores. Esta enfermedad es causada por cualquiera de los 4 serotipos del virus del dengue. A pesar de los esfuerzos e investigaciones para estudiar la enfermedad, no se conocen a profundidad los mecanismos de la infección y de la respuesta inmune que la combate. La complejidad de la enfermedad, la restricción de especie de esta infección y la carencia de un modelo animal han dificultado el estudio de la respuesta inmune protectora contra el virus. Por lo tanto es de suma importancia el desarrollo de modelos experimentales que permitan estudiar las reacciones que provoca el Virus del Dengue (DV) en el sistema inmune, de tal forma que se puedan entender las propiedades inmunogénicas y antigénicas de este virus.

A pesar de que diferentes autores afirman que el ratón no es susceptible a la infección por DV, este trabajo encontramos que el ratón si se infecta pero es capaz de resolver la infección. Es por esto que el estudio del DV no sólo como agente infeccioso, sino como antígeno es de suma importancia. De esta manera el objetivo del presente proyecto es estudiar la capacidad inmunogénica y en especial las características de la respuesta inmune humoral inducidas por el DV tipo II (DV2) en ratones BALB/c.

I. INTRODUCCIÓN.

El Dengue es una enfermedad viral infectocontagiosa cuyo agente etiológico es el virus del dengue (DV). En los últimos años la infección por el DV se ha convertido en un problema de salud pública ya que se estima que existen anualmente en el mundo de 50 a 100 millones de casos nuevos de dengue clásico o fiebre del dengue (FD) y alrededor de 250,000 a 500,000 casos de dengue hemorrágico o fiebre hemorrágica por dengue (DHF). Esta última (DHF), es la forma más severa de la enfermedad y tiene un alto índice de mortalidad.

A pesar de que en varios países del mundo el FD y DHF representan un problema de salud pública, éstos no han podido ser analizados del todo, ya que los estudios inmunológicos abordan etapas tardías cuando la infección ya está establecida, además de no existir un modelo animal de estudio. El hombre, el mosquito vector y algunos primates se infectan naturalmente. Dichas especies no son un buen modelo de estudio, por razones éticas, son de difícil manejo y mantenimiento costoso. La falta de modelos animales representa un problema, ya que mucha de la información relacionada a la capacidad inmunogénica del virus no es proveniente de estudios experimentales sino de estudios epidemiológicos, los cuales pueden proporcionar una idea de cómo se comporta el virus en una cierta población humana en un periodo dado, sin embargo no podemos determinar mecanísticamente por qué es que lo hace de esa forma.

La falta de modelos experimentales limita el desarrollo de vacunas. Éstas pueden ser opciones frente a una enfermedad difícil de controlar debido a su forma de transmisión, la picadura del mosquito (*Aedes aegypti*). Además de que existe la posibilidad de que la presencia de anticuerpos (Ac's) en contra de un serotipo dado, promuevan una infección de mayor gravedad (DHF) si la infección ocurre por otro serotipo diferente.

Por todo lo anterior es importante estudiar como es que se comporta el virus, no solo cuando éste infecta, sino también conocer sus características como inmunógeno, el tipo de respuesta que induce, aún cuando no se presenten las manifestaciones clínicas de la infección, el tipo de respuesta humoral, el tiempo en que se mantiene la respuesta, y si ésta representa un mecanismo de protección o como las estadísticas indican, representan un riesgo potencial ante infecciones subsecuentes.

II. ANTECEDENTES.

1. Enfermedades por el virus del dengue (DV).

El agente causal del dengue es el virus del dengue (DV), el cual se transmite al hombre mediante la picadura de la hembra hematófaga del mosquito (*A. aegypti*, *A. albopictus* y *A. scutellaris*). Una vez que el mosquito ha picado, éste puede transmitir el virus de inmediato o después de un periodo de 8 a 10 días, tiempo en el cual el virus se replica en las glándulas salivales (1,2). Los virus presentes en las glándulas salivales pasan al hombre durante la alimentación del mosquito con sangre, de tal forma que el mosquito es capaz de infectarse con el virus al alimentarse de un humano infectado y de transmitir el virus a otro humano sano al alimentarse de él (3).

Existen varias entidades clínicas cuyo agente etiológico es el DV. El dengue clásico (FD), el dengue hemorrágico (DHF) y el síndrome de choque por dengue (DSS), estos dos últimos son las formas más agresivas de la enfermedad, mientras que FD puede pasar inadvertido (4).

A pesar de que la patogenicidad del virus no se encuentra bien caracterizada, datos epidemiológicos indican que la DHF se presenta en personas que ya han sido infectadas previamente con un serotipo diferente al que en ese momento está generando la enfermedad (4).

1.1 Dengue Clásico o Fiebre por Dengue (FD).

El dengue clásico es una enfermedad auto limitada por el hospedero. Ésta presenta un periodo de incubación de 2 a 7 días postinfección, seguida de síntomas que pueden ir desde un leve resfriado hasta fiebre elevada, cefalea, mialgias y artralgias con dolor cervical y lumbar, anorexia, astenia, náuseas, vómito y dolor abdominal. Los síntomas respiratorios son: tos, rinitis y faringitis. Algunos aspectos clínicos pueden depender de la edad del paciente, por ejemplo el dolor abdominal es mas frecuente en niños. Si bien el FD es benigno y se autolimita, se presenta con gran debilidad física y algunas veces con periodos de convalecencia (5). Biopsias de muestras tomadas de lesiones en piel humana presentan edema perivascular e infiltración de células mononucleares (6).

El diagnóstico específico para FD depende del aislamiento del virus o de pruebas serológicas que identifican al virus. El virus debe ser aislado de la sangre durante la fase febril. Los títulos de viremia dependen del serotipo que esté causando la enfermedad y pueden ir desde casi indetectables hasta 10^8 (5).

La detección directa del antígeno viral en suero humano ha sido reportada mediante el uso de inmunoelectroforesis y radioinmunoanálisis (RIA) con anticuerpos monoclonales. La técnica de RT-PCR es una técnica rápida de diagnóstico mediante el uso de oligonucleótidos-serotipo específicos. Con esta técnica es posible establecer el serotipo que está infectando (7).

El diagnóstico serológico se basa en detectar un título de anticuerpos específicos para el DV, esto se realiza mediante pruebas de neutralización y ELISA. Pero ha sido difícil establecer que serotipo del virus es el agente etiológico, debido a las reacciones cruzadas que se presentan entre los distintos serotipos. Existe otra manera para determinar títulos de anticuerpos, mediante ELISA, con la cual no solo se puede detectar la infección, sino también si se trata de una respuesta primaria o secundaria (8).

1.2 Dengue Hemorrágico (DHF).

El DHF es una de las formas más severas de la enfermedad. En el humano la DHF se caracteriza por un incremento en la permeabilidad vascular, lo cual trae como consecuencia una hemoconcentración, disminución en el volumen sanguíneo, hipoxia, acidosis láctica, y estado de choque (9).

El mecanismo del DHF todavía no se entiende totalmente, usualmente se asocia con una segunda infección con un serotipo de dengue distinto al que causó la primera infección. Se propone, que los Ac's generados durante la primera infección forman complejos Ag-Ac, con el DV, facilitando la infección de células mononucleares (CMN), fenómeno que se conoce como infección facilitada (ADE) (6).

Para el diagnóstico se han desarrollado pruebas serológicas, pero como ya se mencionó para el FD, es difícil determinar el serotipo que está causando la actual infección. Actualmente se usa ELISA, pero se dan reacciones cruzadas con los anticuerpos desarrollados durante la infección primaria (5).

El tratamiento se basa en el monitoreo de los signos vitales y el hematocrito, la transfusión de plasma, la administración de oxígeno y un tratamiento con heparina, si existe presencia de coagulación intravascular diseminada. Una transfusión sanguínea se recomienda sólo en casos de hemorragia severa. No ha sido desarrollada una terapia antiviral efectiva (5).

1.3 Síndrome de choque por dengue (SSD).

El DSS es más grave y se caracteriza por hipotensión o choque profundo. Inicialmente la enfermedad se presenta como FD pero después de 2 a 5 días, progresa hasta choque con extremidades frías y húmedas, diaforesis, cianosis, respiración y pulso rápidos, e hipotensión. Puede haber hemorragias sin causa aparente, incluyendo petequias, hemorragias gastrointestinales e intracerebrales que pueden poner en peligro la vida. Algunas anomalías neurológicas han sido encontradas como encefalopatía (estupor, coma, convulsiones). El progreso hasta llegar al choque puede ser muy rápido si no se da tratamiento a la menor brevedad (9).

2. Virus del Dengue.

El DV pertenece a la familia de los *Arboviridae* y al género *Flavivirus*. Existen 4 serotipos diferentes (del 1 al 4) (6). El Virus del Dengue es un virus envuelto, y su genoma es de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva; que codifica para una poliproteína la cual es procesada generando 10 proteínas; tres proteínas estructurales (una de nucleocápside C, otra de membrana M y una glicoproteína de envoltura E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5), (10).

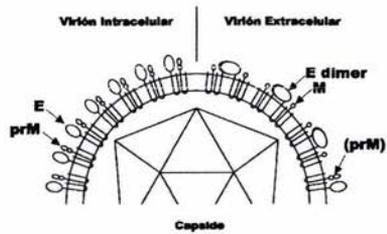
2.1 Proteínas estructurales.

- Proteína E. Es la más abundante e inmunogénica. Su peso molecular está alrededor de 50-60 kDa (10). Esta proteína está anclada en una bicapa lipídica que cubre la cápside y tiene diferentes sitios de glicosilación, dependiendo del serotipo (11). Se sabe que es la proteína que se une a la célula blanco, además de participar en la fusión de membrana inducida por la disminución del pH dentro del endosoma (12).

La proteína E esta formada por 3 dominios (A,B,y C). El dominio A, también conocido como dominio de dimerización, es discontinuo y va del aminoácido 50-130 y del 185-300, entre estos dos segmentos se encuentra el dominio C. El dominio A contiene 5 puentes disulfuro y en él se encuentran la mayor parte de los epitopos neutralizantes. En cuanto al dominio B, la mayor parte

de su antigenicidad depende de un puente disulfuro (6). En 1989 Innis identificó 25 dominios que contenían epitopos lineares los cuales reaccionaban con suero humano anti-DV, la mayoría de los dominios identificados eran altamente hidrofóbicos. Ese mismo año, mediante el uso de Ac's monoclonales Aaskov encontró otro punto de inmunogenicidad formado por tres porciones discontinuas de la proteína. Al año siguiente, mediante un análisis por computadora tomando en cuenta el tamaño de la proteína, hidrofobicidad y la accesibilidad, Roehrig predijo regiones antigénicas en prácticamente toda la proteína; y en 1992 Megret localizo 6 puntos de inmunogenicidad los cuales confirmaban los identificados por Aaskov y Roehrig (6).

- Proteína M. Tiene un peso molecular que va de los 9-12 kDa, y ésta es necesaria para las actividades de fusión e infectividad del virus. Es una proteína no glicosilada y se forma por el corte en la porción amino terminal de su precursora, la proteína prM unos momentos antes de la liberación del virión. La proteína prM es una glicoproteína de 18-19 kDa, está presente en los viriones inmaduros y se encuentra heterodimerizada a la proteína E, dándole estabilidad durante su transporte en las vesículas acídicas (13).
- Proteína C. Tiene un PM de 12 a 14 kDa y presenta una carga positiva ya que tiene una gran cantidad de residuos de lisina y arginina por lo que se cree que es la responsable de neutralizar la carga negativa del RNA viral. La proteína C no induce anticuerpos neutralizantes (6).



2.2 Proteínas no estructurales.

Existen otras 7 proteínas que también son codificadas por el RNA del DV, estas son no estructurales y sólo se expresan en las células infectadas por lo que su presencia indica replicación viral. Las características de algunas de ellas son las siguientes:

- NS3 tiene un peso molecular de 70 kDa y funciona como RNA helicasa y serina proteasa.
- NS5 tiene un peso molecular de 103 kDa y presenta una actividad de RNA polimerasa y metil transferasa.
- NS1, es una glicoproteína se presenta tanto en forma soluble como anclada en la membrana de la célula infectada. Tiene un peso molecular de aproximadamente 46 kDa. Se sabe que las formas solubles de ésta proteína inducen una fuerte respuesta de tipo humoral y que la inmunización con la proteína purificada o recombinante ofrecen cierta protección. En 1988 Putnak mediante el estudio de fragmentos de la NS1 expresada en *E.coli* JM101, demostró que Ac's policlonales de ratones

infectados reaccionaban mejor con la porción amino terminal de la proteína, mientras que el suero de conejo inmunizado con la proteína reaccionaba con la porción carboxi terminal. Henchal y Mason encontraron dos porciones de la proteína, 151-346 y 57-126 respectivamente, las cuales presentaban reacción con Ac's monoclonales (6).

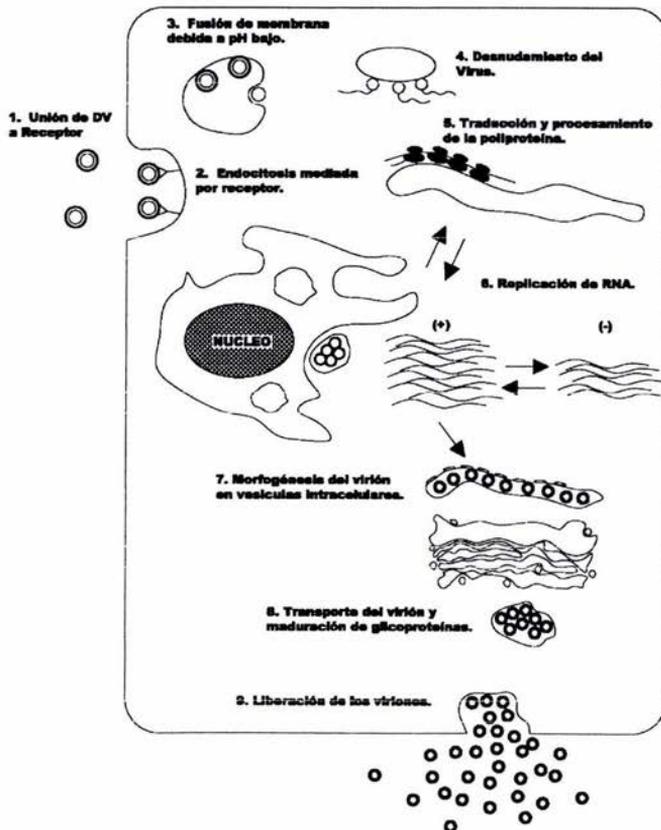
- Las proteínas no estructurales restantes son poco conservadas y NS4A, NS2A y NS2B parecen estar involucradas en el bloqueo de la señalización del IFN en la célula blanco (14).

2.3 Replicación del DV.

Los flavivirus entran por endocitosis mediada por receptor, debido a una disminución del pH en el endosoma se provoca la fusión de membrana. Estudios recientes han demostrado que el pH bajo causa que los dímeros de E se disocien y se rearreglen formando trímeros. Rey y colaboradores sugieren que el pH ácido puede resultar en un cambio conformacional de la proteína E ocasionando un rearreglo del dominio de dimerización en la superficie del virus, dejando al descubierto zonas hidrofóbicas responsables de la fusión con la membrana (12,15).

Después de la adsorción, entrada, y desnudamiento del virus, el RNA⁺ del virión se traduce en la poliproteína y se procesa para dar los 10 productos genómicos primarios, algunos de los cuales proveen los componentes esenciales

de la RNA polimerasa dependiente de RNA (NS5). El RNA⁺ se copia de un intermediario replicativo (IR) de cadena negativa (RNA⁻) a partir de la forma replicativa de doble cadena que funciona como molde. La replicación ocurre en el citosol y los cortes se realizan por la serina proteasa NS3 y su cofactor NS2B. Todos los sitios destinados para ser cortados dentro de la luz del retículo endoplásmico (C de prM, E de NS1 y NS4A de NS4B), quizás lo hacen por una peptidasa señal de la célula. El ensamblado del virión ocurre por un mecanismo desconocido (16).



3. Infección por DV.

Los estudios sobre qué receptores de superficie utiliza el virus para entrar a la célula son muchos, pero debido a la naturaleza diversa de la patología y su tropismo entre los diferentes serotipos, se piensa que existen diversos receptores que facilitan su entrada.

3.1 Mecanismos de entrada y células blanco.

En experimentos con primates, se ha visto que las células mononucleares (CMN) (17) son los principales sitios de replicación del virus, y por inmunolocalización se ha encontrado el virus en diversos tejidos como la piel, bazo, nódulos linfáticos, hígado, pulmón, cerebro y timo.

Al parecer existe cierta relación entre el receptor CD14 de los macrófagos y monocitos con el DV, ya que los lipopolisacáridos de algunas bacterias que se unen a CD14 evitan la infección por el DV, por lo que se cree que los lipopolisacáridos y las proteínas del DV compiten por el mismo receptor, evitando de esta manera la infección del DV (18).

Chen y colaboradores demostraron que DV2 se une selectivamente a una molécula denominada sulfato de heparina (HS), la cual se presenta en todos los tejidos y difiere en el grado de sulfatación. El HS de la célula blanco debe estar

altamente sulfatado, y éste se une al DV2 por medio de la proteína E. Usando un modelo de la proteína E cristalizada proveniente del virus de la encefalitis transmitida por la garrapata, se sugiere que existen sitios donde hay una gran cantidad de aminoácidos básicos y una serie de motivos que son los responsables de la unión del virus a la célula blanco. También postulan que la diferencia entre las estructuras y los grados de sulfatación en las distintas células son lo que da la especificidad a la infección por DV (19).

Estudios *in vitro* demuestran que las células dendríticas (DCs) son infectadas por DV. En un estudio comparativo entre el grado de infección de las DCs y las CMN, células blanco para el DV, se vio que en infecciones en ausencia de Ac's, las DCs se infectaban 10 veces más que los monocitos, pero en presencia de Ac's los monocitos incrementaban su grado de infección y el de las DCs permaneció igual. Por lo anterior se propuso que durante las infecciones primarias y secundarias, el DV infecta inicialmente a las DCs y es en éstas donde se replica, ya que no requieren la presencia de Ac's preexistentes. Mientras que en infecciones secundarias que terminan en DHF/DSS es probable que la infección se incremente por la presencia de Ac's que facilitan la entrada del virus a los CMN (20).

Se ha demostrado también que células que expresan DC-SIGN son susceptibles a la infección por DV de cualquier serotipo y que el grado de infección está directamente relacionado con el nivel de expresión de ésta molécula. Así que se sugiere que DC-SIGN permite la captura y replicación del DV (21).

3.2 Inmunopatogenicidad del DV.

Ya que el DHF ocurre fundamentalmente en infecciones secundarias, se ha propuesto el concepto de anticuerpos facilitadores, es decir, la presencia de anticuerpos en contra de un serotipo favorece la reinfección con un serotipo diferente (4). Al parecer el virus infecta con mayor facilidad en presencia anticuerpos no neutralizantes contra el DV, que en ausencia de éstos. Las inmunoglobulinas de clase IgG facilitan la entrada del virus al monocito por medio de sus receptores Fc, lo cual contribuye al aumento en el número de células infectadas. Se propone que la lisis de dichas células y su posterior eliminación, por el sistema inmune, permite la liberación de mediadores vasoactivos, enzimas, que activan el complemento, tromboplastina y factores de permeabilidad vascular así como la producción de citocinas y quimiocinas, lo cual daría lugar a los eventos fisiopatológicos observados, como la pérdida de plasma, hipotensión, y anomalías en la coagulación (22,23).

Estudios recientes se enfocan al papel que juegan las células T en la eliminación de los monocitos infectados en la DHF. Se han encontrado células T tanto citotóxicas (CD8+) como cooperadoras (CD4+) en personas que se han infectado naturalmente o por vacunas que contienen el virus atenuado. Las células T CD4+ pueden ser específicas para un serotipo del virus, presentar reacción cruzada con otro serotipo, o incluso con otros virus de la misma familia (24). Las células citotóxicas reconocen y lisan a las células infectadas en el contexto de

HLA-I, proliferan y producen: IFN- γ , interleucina 2 (IL-2), y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. Mientras las células T CD4+ reconocen en el contexto de HLA-II y también presentan reacción cruzada con los distintos serotipos (25).

Está reportado que pacientes con DHF presentan altos niveles de activación de células T CD4+ y CD8+ en comparación con aquellos que sólo desarrollan FD, lo que sugiere que esta alta activación se encuentre asociada con la patogenicidad en el DHF (25).

Las proteínas E, NS1 y la NS3 parecen tener epitopos importantes para el reconocimiento por células T CD4+ y CD8+. Se cree que existe un efecto agonista parcial en los linfocitos T citotóxicos ante la presencia de proteínas homólogas en los diferentes serotipos; de tal forma que estas células parcialmente activadas producen mediadores solubles, que pueden estar involucrados en la patogenicidad (26).

Otro factor que pudiera estar involucrado en la patogenicidad es el pecado antigénico original, fenómeno que consiste en que una vez que se ha generado una respuesta de memoria en contra de un serotipo específico, al infectarse con un serotipo distinto se montará una respuesta de linfocitos T citotóxicos principalmente en contra del serotipo que causó la infección primaria, mientras que

la respuesta en contra del agente causal de la infección secundaria es muy débil (27).

Durante la infección primaria un individuo genera Ac's específicos con capacidad neutralizante en contra del serotipo infectante, pero no así en contra de los demás serotipos; de tal forma que si dicho individuo se infectara nuevamente con el virus homólogo, este será capaz de resolver la infección, no así, en contra de los demás serotipos. Los Ac's generados en la primoinfección son capaces de reconocer a virus heterólogos pero no de neutralizarlos, formando así complejos Ag-Ac los cuales son internalizados por las CMN a través de receptores Fc. Los complejos Ag-Ac formados también producen activación del complemento, facilitando la entrada del DV. Debido a lo anterior los monocitos infectados son células blanco para los CD4+ de memoria generados durante la primoinfección, dando lugar a una reacción cruzada y produciendo citocinas como IFN- γ e IL-2. El IFN- γ induce una sobreexpresión de los receptores Fc γ y de las moléculas MHC clase I y II, lo que facilita la infección de más CMN. Los altos niveles de IL-2 inducen la extravasación de plasma y la activación del complemento (25).

Durante el desarrollo de la enfermedad podrían activarse distintas redes de citocinas como la generada por IL-1, a través de la inducción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IL-6, IL-8 y el factor activador de plaquetas (PAF), con el TNF- α estimulando a su vez la producción de IL-1, IL-6, IL-8 y PAF. De tal forma que la

compleja red de citocinas y quimiocinas llevan a altos niveles de mediadores en un corto tiempo y aumentan el efecto de sus actividades (22,28).

Otras células blanco para el DV son las células dendríticas (DCs), las cuales también contribuyen a la producción de citocinas, lo que lleva a otra teoría de la fisiopatología del DV. Al principio de la infección primaria las DCs infectadas son activadas y secretarán IL-12 e IFN- γ . Mientras se sigue replicando el virus y se sigue estimulando al sistema inmune innato, se aumenta la cantidad de IFN- γ y por lo tanto la activación de las células T y B. La viremia se elimina y la inmunidad humoral se desarrolla con las citocinas del tipo 1. En esta situación el desarrollo de DHF/DSS es poco probable. Durante una segunda infección heterotípica, por una reacción cruzada las células T serán activadas y producirán IFN- γ , aumentando la activación de DCs, y una mayor capacidad para estimular a las células T, que trae como consecuencia, una liberación de IL-12, un incremento en la secreción de TNF- α e IFN- γ y una desregularización de la respuesta mediada por las citocinas del tipo 1. Una cascada de eventos iniciados por una temprana pero pobremente controlada respuesta de citocinas del tipo 1, pudiera ser la responsable en la patogenicidad del DHF/DSS. Los niveles en plasma de IFN- γ y TNF- α se han encontrado elevados en DHF/DSS comparados con FD (29).

El papel preciso de las citocinas en el desarrollo de la enfermedad, así como la inmunorregulación y cómo todo ello conduce a la sintomatología observada, sigue aún en estudio.

Se ha observado que los títulos de anticuerpos contra las proteínas no estructurales son mayores en infecciones secundarias (30). Además durante DHF, la IL-8 y el receptor para el factor de necrosis tumoral se encuentran elevados (28). Por lo que se cree que las citocinas juegan un papel muy importante durante el desarrollo de la enfermedad, de verificarse esto, quizá se podría predecir el curso de la DHF por los niveles de citocinas.

Existen otros factores que se involucran en la patología del DHF como la predisposición genética. En pacientes mexicanos se encontró que el alelo HLA-DR4 puede ser un factor de protección en contra del DHF (31), mientras que en pacientes tailandeses la correlación de los alelos HLA-A*0207 y HLA-B*51 tienden a desarrollar DHF (32). Por lo antes mencionado, se sugiere que los genes del complejo principal de histocompatibilidad pudieran tener un papel importante en el desarrollo o no del DHF (31,32).

Otros factores de riesgo pudieran ser la existencia de cepas más virulentas, que se replican con mayor rapidez, incrementando la respuesta inmune y la enfermedad (33).

4. Respuesta inmune humoral.

La respuesta inmune humoral se caracteriza por los anticuerpos, que son producto de las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B. La función de

dichos anticuerpos es eliminar o neutralizar antígenos, por los cuales fueron inducidos. Las respuestas de Ac's varían dependiendo del tipo de Ag, la participación de células T, exposición previa al antígeno y el sitio anatómico. Se pueden producir Ac's de diferentes clases (IgM, IgG, IgA, IgE) y generar memoria inmunológica (34).

Las respuestas inmunitarias humorales se inician en los órganos linfoides periféricos, donde se lleva a cabo la activación de las células B y la generación de células productoras de Ac's, que consta de fases secuenciales específicas. La fase de reconocimiento, se da entre el Ag y la IgM e IgD de las células B maduras. Una vez reconocido el Ag estas células penetran a los tejidos linfoides periféricos, donde se dará la estimulación antigénica. El Ag se une a la IgM e IgD de membrana y comienza la fase de activación, que consiste en una serie de respuestas que conducen a la proliferación y a la diferenciación que da como resultado la generación de células efectoras y células de memoria (34).

El receptor para el Ag del linfocito B tiene dos funciones en la activación de las células B; primero el reconocimiento del Ag, y en segundo lugar, el receptor se une al Ag y lo internaliza en vesículas endosómicas, si es una proteína, es procesada y presentada a la célula T cooperadora (Th) (34).

Los acontecimientos celulares iniciales que se inducen por el reconocimiento del Ag por el receptor de célula B (BCR), preparan a las células B para la proliferación y la diferenciación subsiguientes, y ocurren los siguientes

eventos: entrada al ciclo celular, aumento en la expresión de CD80 y CD86, expresión de receptores de citocinas y expresión de proteínas antiapoptóticas (34).

Si el Ag que se ha reconocido por el BCR es una proteína, la respuesta que se inducirá, será en colaboración con los linfocitos T cooperadores (CD4+), a esto se le conoce como respuesta timo-dependiente (34).

Una vez que las células B y las T CD4+ han sido activadas, éstas se localizarán en la interfase de las vainas linfoides periarteriolares (PALS) y el folículo linfoide, dicha interacción lleva a que la célula T exprese ciertas moléculas de superficie y secrete citocinas esenciales para la estimulación, activación y proliferación de las células B (34).

La unión del Ag a la Ig de membrana, induce la expresión de moléculas coestimuladoras que aumentan la capacidad del linfocito B de activar las células Th. Los principales moléculas coestimuladoras que se expresan en las células B activadas son B7-2 y B7-1 (CD80 y CD86 respectivamente), que se unen al CD28 de la célula T. Las células Th pueden entonces reconocer a los complejos péptido-MHC II y a las moléculas coestimuladoras, y son estimulados para realizar su función efectora, que consiste en promover el crecimiento y la diferenciación de las células B. Debido a la coestimulación de B7, se induce una molécula de superficie en la célula T denominada ligando de CD40 (CD40L) que se une a su receptor CD40, en las células B que presentan el Ag, dicha interacción estimula la

proliferación y diferenciación en las células B. La unión de CD40 en los linfocitos B también provoca una mayor expresión de moléculas B7, lo que a su vez da lugar a mayor activación de células T (34).

La interacción CD40-CD40L conduce a acontecimientos importantes como son; el cambio de isotipo (clase), la maduración de la afinidad y la generación de las células B de memoria, dichos eventos ocurren en compartimientos muy especializados de la respuesta de linfocitos B, los centros germinales (34).

Las citocinas tienen dos papeles importantes en las respuestas de Ac's: proporcionan mecanismos de amplificación aumentando la proliferación y la diferenciación de la célula B. También determinan los tipos de Ac's producidos mediante la promoción selectiva del cambio a distintos isotipos de cadena pesada (34).

IL-2, IL-4, IL-5	IgM
IL-4, IL-6, IL-2, IFN- γ	IgG
IL-5, TGF- β	IgA
IL-4	IgE

4.1 Centros germinales.

Cuando el sistema inmune es estimulado por la presencia del patógeno o el antígeno, las células son movilizadas de su microambiente a un sitio donde se pueda facilitar el contacto celular y optimizar su estimulación. Para los linfocitos B, uno de estos sitios es el centro germinal. Es en éste donde ocurre la maduración de la afinidad y la generación de la memoria de linfocitos B. Los centros germinales se localizan en los órganos linfoides secundarios. Los sitios que están involucrados con la generación de dichos centros germinales son aquellos que reciben antígeno ya sea por la linfa, la sangre o por células especializadas llamadas M en el caso de las mucosas (35,36).

Durante la estimulación antigénica los folículos primarios sufren una transformación, produciendo una estructura secundaria altamente organizada que contiene al centro germinal. Las interacciones celulares que se llevan a cabo en este sitio provocan la mutación del receptor del linfocito B, dando lugar al cambio de isotipo. La selección positiva de células cuyo receptor es de alta afinidad, y la producción de células B de memoria antígeno específicas que terminan su diferenciación hacia células plasmáticas o de memoria en la médula (36,37).

En la respuesta primaria a un antígeno timo dependiente, los linfocitos B vírgenes de un ratón libre de patógenos, parecen ser activados en las zonas de T. 4 días después de la administración del antígeno, el destino de estas células es

formar un aglomerado (foci) de células productoras de anticuerpo en las zonas de T o dirigirse hacia el folículo primario donde se encuentra a una red de células dendríticas foliculares (FDC). Las pocas células B que se observan en la red de FDC unen de manera específica la lectina de aglutinina de cacahuete (PNA) (38) y se puede además detectar en ellos al antígeno administrado. El tamaño de las zonas PNA positivas y las del antígeno coinciden, y van aumentando conforme pasa el tiempo, de tal forma que para el día 7, el centro germinal se ve claramente formado. En este punto las células B del centro germinal están asociadas con FDC en las zonas claras y los centroblastos se encuentran en la zona oscura (35,36).

En la segunda vez que el antígeno es presentado, la cinética de formación del centro germinal es mucho más rápida. La aparición de sitios PNA positivos y la formación de zonas claras y oscuras ocurre en pocos días. La inmunización pasiva puede acelerar la formación del centro germinal en comparación a la respuesta secundaria. Después de unas semanas el centro germinal desaparece y las FDC permanecen en el folículo primario. Las FDC se organizan de tal forma que retienen el antígeno de manera extracelular, y sin interacción con el sistema inmune. Estos depósitos de FDC con antígeno toman una morfología especial con el tiempo, sugiriendo que dichas FDC no participan en otros encuentros con el mismo antígeno (35,36).

5. Respuesta inmune vs DV.

Como en todos los mecanismos en contra de antígenos, la respuesta inmune se divide en dos, la innata y la adaptativa. La respuesta inmunológica que induce el DV incluye la producción de elementos inespecíficos como los IFN de tipo 1 por fibroblastos y monocitos, así como la activación de células NK. La respuesta específica implica, además de los Ac's, la activación de linfocitos T cuyas funciones incluyen la secreción de citocinas y la lisis directa de células infectadas (6,39).

5.1 Respuesta inmune innata.

Los principales mecanismos de la respuesta inmune innata en contra de los virus está dada por el interferón de tipo 1 (IFN) y las células NK (6,39).

Una célula que ha sido infectada por DV secreta IFN α/β , el cual activa los mecanismos en contra del virus en células adyacentes y aumenta su resistencia vírica, mientras que IFN- γ inhibe la replicación viral y aumenta la eficacia de la respuesta inmune adaptativa induciendo un aumento en la expresión de MHC-I y II y estimulando a macrófagos y células NK (39).

Durante el inicio de la infección por virus, las células NK son el principal mecanismo de defensa, éstas son capaces de reconocer células infectadas ya que

reconocen la ausencia de MHC-I (que es un mecanismo de evasión del virus). Las NK's tienen receptores para Fc de los anticuerpos por lo que también pueden lisar a células que estén cubiertas con anticuerpos (39).

5.2 Respuesta inmune adaptativa.

A medida que la infección se va desarrollando, el sistema inmune adaptativo empieza a responder; comienzan a producirse células T citotóxicas y cooperadoras, así como anticuerpos. Estos últimos son una barrera para evitar la diseminación del virus a otras células. Se pueden crear anticuerpos en contra de cualquier proteína pero los más importantes son aquellos dirigidos contra las proteínas expresadas en la superficie de las células infectadas y en la superficie del virión (proteína E y M) (40).

Otras células involucradas, son las células T citotóxicas, las cuales son un sistema muy selectivo y eficaz en contra de los virus, estas destruyen a células infectadas y las reconocen en el contexto de MHC-I (40).

Los Ac's en contra del DV tienen tres funciones principales: neutralización, lisis mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de Ac's (ADCC). Aunque también se cree que pueden contribuir en el desarrollo del DHF, y en estudios *in vitro* se ha comprobado que las CMN se infectan con mayor facilidad en presencia de Ac's no neutralizantes (40).

En la fase febril de las infecciones primarias o en el periodo de convalecencia, los niveles de IgM son muy altos, comparados con los de IgG, que son muy bajos. En cambio en infecciones secundarias, se detectan niveles muy altos de IgG, mientras las IgM son muy bajas o incluso están ausentes (6).

La proteína E es inmunodominante ya que tanto en FD como DHF pueden detectarse Ac's en contra de ésta, mientras que los Ac's anti-NS1 son raros en pacientes con infección primaria pero son frecuentes en pacientes con infección secundaria (30).

Al estudiar qué proteínas del DV2 son inmunodominantes, Valdés encontró que en pacientes colombianos que presentaban DC ó DHF tenían el siguiente patrón de Ac's

- Tanto en la respuesta primaria como secundaria, anti E es el que se detecta con mayor frecuencia.
- Existe gran respuesta de Ac's para NS5 (semejante a E).
- NS3 da una respuesta significativa y específica en casos secundarios, probablemente debido a la especificidad de los anticuerpos de acuerdo al serotipo infectante (todos los casos que presentaron anti-NS3 fueron secundarios, y al serotipo DV2).
- NS3 (la cual es considerada la proteasa viral) es un importante blanco para las células T humanas. Estos resultados confirman, una vez mas, que NS3 y NS5 (producidas durante los primeros pasos de la replicación viral) son

capaces de producir la formación de Ac's específicos, cuya función se desconoce aún.

- Anti-NS1 son detectados sólo en pacientes con infección secundaria, por ello se ha sugerido que los Ac's anti-NS1 están relacionados con DHF.

El papel de la proteína NS1 en la replicación y la morfogénesis no es claro; aunque, se encuentra en títulos muy altos en animales infectadas con el virus (41)

Existen estudios donde se encontró que sueros de pacientes que desarrollaron DHF tenían niveles altos de IgG1, en comparación con aquellos que presentaban FD, mientras que los niveles de IgG2 en los pacientes con DHF eran bajos, la explicación a esto sería que los Ac's de tipo IgG1 activan de manera más eficiente la vía clásica del complemento y como consecuencia la generación de C3a y C5a lo que lleva a una coagulación intravascular diseminada y a un estado de hipovolemia. Estos resultados indican que no existe un patrón establecido en la respuesta de Ac's, y que dependiendo de dicha respuesta o el isotipo de Ac's producido, puede afectar el rumbo que tomen las manifestaciones clínicas (42).

Henchal en 1995, reporta que los Ac's capaces de aumentar la infección son aquellos dirigidos hacia la proteína E y la pre-M, los cuales a altas concentraciones pueden neutralizar el virus pero al disminuir su concentración intensifican la infección (6).

6. Modelos animales.

Existen tres especies que se infectan naturalmente, el hombre, los mosquitos y algunos primates. La falta de modelos animales adecuados para estudiar los mecanismos de infección, de evasión viral y de inmunidad, representan un gran problema para el estudio del DV.

Se ha evaluado la respuesta inmune de ratones de diferentes cepas en contra del virus, en ellos existen algunas constantes; la mayor parte de estos estudios se hacen con cepas del virus adaptado, es decir, virus que han sufrido varios pases por cerebro de ratón, lo cual los hace más virulentos y aparentemente hace más susceptible a algunos animales. Algunas cepas adaptadas de DV llegan a ser mortales en un 40% en ratones BALB/c adultos inoculadas por vía intracraneal (IC) (43).

Chaturvedi en 1977, reporta que en ratones albinos adultos no existe una diferencia considerable en la respuesta de Ac's totales en contra del DV si es administrado por distintas vías, intracraneal (IC), intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV). En 1978 reporta que estos mismos ratones inoculados con el virus IC, encontraron DV en cerebro desde el día 2, alcanzado su pico en el día 10; en el hígado al día 4; en bazo desde el día 5 y en el corazón al día 7. También se sabe que el suero de ratones inmunizados IP con el DV, es capaz de ofrecer protección si se es transferido a otros animales inmunizados por vía IC (44).

En ratones BALB/c adultos, está reportado que el DV2 no es patógeno. Si se realizan inmunizaciones por vía intradérmica (ID) en el cojinete plantar y por vía intramuscular (IM), la ID presenta una mayor producción de anticuerpos y durante más tiempo. La inmunización ID induce respuesta primaria como secundaria, y los títulos más altos se presentan después del día 7. En respuesta inmune secundaria se desarrollan títulos más altos que con una sola dosis, sobre todo si ambas inmunizaciones se efectúan en el mismo cojinete plantar. También midieron la densidad de DCs en el cojinete plantar donde se realizó la inmunización y se vio que un día después de ésta se incrementa ligeramente la cantidad de DCs, a partir de este punto disminuye hasta llegar a un punto bajo al día 7, y luego se incrementan hasta llegar a niveles normales. Una explicación a la variación de las DCs en la zona de inoculación puede ser que al inicio se ve un incremento debido a que las DCs migran hacia el punto donde se encuentra el antígeno para poder capturarlo y transportarlo posteriormente a los nódulos linfáticos, razón por la cual un día después de la inoculación disminuye su densidad (45).

Existen reportes que la inmunización pasiva de Ac's anti-NS3 ofrece protección en contra del DV administrado IC en ratones albinos de 2 semanas de edad (46). De la misma forma la inmunización pasiva de Ac's anti-NS1 también ofrece protección en ratones (47), a pesar que estudios *in vitro* indican que dichos Ac's presentan reacción cruzada con células endoteliales (48).

También se ha estudiado la respuesta de ratones deficientes de receptores para IFN α/β y γ , a los cuales al administrarles por vía IP DV2 adaptado, presentan

síntomas de infección e incluso muerte, pero si se usan animales deficientes en una sola clase de IFN el virus no resulta letal. Al administrar virus no adaptado, éste no resulta letal, pero sí induce un buen título de anticuerpos, capaces de ofrecer protección en contra del virus adaptado. La producción de anticuerpos en estos ratones fue normal, los niveles de IgG antivirales estaban dentro de los límites normales pero con una tendencia a IgG1 (49).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El dengue en especial el DHF y DSS, son considerados problemas de salud pública en diversas partes del mundo, incluyendo México, desafortunadamente se carece de una vacuna y se desconocen muchos de los mecanismos de la respuesta inmune involucrados en la protección contra el virus, esto es debido en parte a la falta de un modelo experimental animal. EL DV infecta principalmente al hombre, algunos primates y al mosquito (*A. aegypti*, *A. albopictus* y *A. scutellaris*). Ello dificulta el desarrollo de un modelo experimental. Sin embargo, el DV contiene una serie de antígenos que molecular y estructuralmente pueden ser estudiados como inmunógenos en animales de laboratorio y de esta forma estudiar las características de la respuesta inmune inducida por este virus.

IV. HIPÓTESIS.

- ↪ Debido a las características moleculares y estructurales de sus antígenos, el DV se comportará como un inmunógeno capaz de inducir una respuesta de linfocitos B.

V. OBJETIVO GENERAL.

- ↪ Estudiar las características generales de la respuesta de linfocitos B inducida por el DV serotipo II en un modelo murino.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Obtención del DV2 mediante su propagación en células de mosquito C6/36.
- Producción de la proteína recombinante NS1 para el desarrollo de ELISA.
- Analizar la producción de anticuerpos anti-NS1, anti-NS3 y anti-E, inducida por la inoculación de DV serotipo II.
- Estudiar la formación de centros germinales ante la inoculación de DV serotipo II.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Material biológico.

- **Células.**

Células C6/36 (*A. albopictus*). Donadas por la Dra. Rosa Maria del Ángel del departamento de Patología Experimental del CINVESTAV. Número de ATCC.-CRL-1660. Es una línea celular proveniente de una suspensión del total de las células del mosquito *A. albopictus* en estado larvario.

- **Ratones.**

Se usaron ratones BALB/c machos de 6 semanas, proporcionados por el bioterio del CINVESTAV. Los ratones se permanecieron 3 semanas con agua y comida *ad libitum*.

- **Cepas bacterianas.**

E. coli BL-21 codon plus (DE3): donada por la Dra. Leticia Cedillo Barrón del departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV.

- **Vectores.**

El vector utilizado para la producción de la proteína de fusión NS1-GST fue pGex-4-T2 proporcionado por la Dra. Leticia Cedillo Barrón del departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV. Este es un vector de expresión en procariontes el cual está bajo la función del promotor del operón de la lactosa por lo se induce la síntesis de la proteína al adicionar IPTG. Este vector también contiene el gen para la síntesis de la glutation-S-transferasa el cual se fusiona con el gen de interés (NS1, NS3 o E), dando lugar a proteínas de fusión con GST.

- **Virus.**

Virus Del Dengue (serotipo 2). Donado por el Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE). El virus fue aislado del suero de pacientes en fase aguda de la enfermedad.

- **Anticuerpos.**

Anti-ratón HRP, IgA, IgG e IgM de chivo (Zymed), No. de catálogo.- 62-8320.

Anti NS3 monoclonal donado por la Dra. Leticia Cedillo Barrón del departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV. Este anticuerpo fue producido y probado en el Lab de la Dra. Leticia Cedillo Barrón.

- **Proteínas.**

Tanto la proteína de fusión NS3-GST como la proteína E-GST fueron donadas por la Dra. Leticia Cedillo Barrón del departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV.

- **Lectinas.**

Aglutinina de cacahuate (PNA) acoplada a FITC. (Vector). No de catálogo.- FL-1071.

Ulex europaeus acoplada a FITC (Vector). No. de Catálogo.- FL-1061.

2. Propagación del DV2.

2.1 Línea celular C6/36 (*A. albopictus*).

Se tomó una alícuota de 0.5 ml de medio que contenía a las células y se colocaron en una caja de cultivo, en donde se completó el volumen con el medio para crecimiento (apéndice 1) hasta 5 mL, se incubó a 34°C sin CO₂. El medio se cambió cada 48 horas.

2.2 Infección de células C6/36 con el virus del dengue.

Se eliminó el medio y se agregó una cantidad determinada de virus (dependiendo del título de éste), se dejó incubando a 37°C con 5% de CO₂ durante 2 horas con agitación, con la tapa de la caja semiabierta; transcurrido este tiempo, se desechó el virus y se colocó 5 mL de medio de mantenimiento (apéndice 1) para C6/36, se incubó a 34°C sin CO₂.

2.3 Obtención de partículas virales.

Se tomó el medio que contenía las células C6/37 infectadas por DV, y se lisaron las células por congelamiento y descongelamiento (4 veces), se filtró por una membrana de 0.22 mm y se recuperó el sobrenadante.

3. Producción de la proteína NS1-GST.

3.1 Trasformación de las bacterias *E.coli* BL-21 con la construcción NS1-pGEX -4T2.

El primer paso fue la transformación de las bacterias *E. coli* BL21 con la construcción NS1-pGEX 4—T2, para lo cual se colocó 1 μ l de la construcción con 200 μ l de la bacteria, se dejaron 20 minutos a 4°C, seguido de 45 segundos a 45°C y por último 5 minutos en hielo. Después se adicionó 500 μ l de caldo Luria (LB) y se incubó 1 hora a 37°C en agitación. Pasado este tiempo se sembró en medio con ampicilina y se incubó a 37°C durante 18 horas. Una colonia recombinante se sembró en 5 mL de caldo LB con ampicilina y se dejó incubando de 14-16 horas a 37°C.

3.2 Inducción de la expresión de la proteína NS1-GST en el plásmido pGEX-4-T2.

El cultivo obtenido se transfirió a más medio LB en la siguiente proporción: por cada 50 μ L de cultivo se colocó 5 mL de medio LB con una concentración de 50 μ g/ml de ampicilina. Se dejó incubando a 37 °C en agitación hasta que alcanzó una D.O. de 0.5-1.0 a 550 nm. En este punto se agregó IPTG (100 mM) a una concentración final de 0.75 mM y se incubó a 37°C durante 6 horas.

Para verificar la inducción de la proteína de fusión NS1-GST se tomaron muestras del cultivo a los tiempos 0, a las 3 horas y a las 6 horas se lisaron las células y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10 % (apéndice 2), durante 1 hora a 100 mV, después se tiñó el gel con solución de tinte (apéndice 2), y se lavó con una solución de ácido acético y alcohol metílico, para eliminar el exceso de colorante, y se examinó la existencia de una banda gruesa alrededor de los 64 kDa.

3.3 Purificación de la proteína NS1-GST.

Una vez que se verificó la inducción de la proteína se purificaron los cuerpos de inclusión formados por la proteína, para esto se centrifugó 20 min. a 4°C a 6000 rpm, se resuspendió el paquete celular en una solución de sacarosa al 15%, tritón 100X al 0.12% y Tris pH 8.0 50 mM, este se sonicó 1 min a intervalos de 10 seg modificando la amplitud hasta llegar a 0.08hz. posteriormente se centrifugó 20 min. a 4 °C durante a 6000 rpm, se resuspendió el paquete celular en una solución de tritón 100X al 0.12% y Tris pH 8.0 50 mM y EDTA 10 mM. Nuevamente la solución obtenida se sonicó 1 min a intervalos de 10 seg modificando la amplitud hasta llegar a 0.08hz. Se centrifugó una vez más durante 20 min. a 4 °C a 6000 rpm, se resuspendió el paquete celular en una solución de Tris pH 8.0 50 mM y EDTA 10 mM. Finalmente, se agregó regulador de muestra (apéndice 2) y la muestra se hirvió por 5 min.; después la mezcla se corrió en un gel de preparativo de poliacrilamida al 8% de 25 x 25 (apéndice 3).

Posteriormente la banda que correspondía a NS1-GST se identificó mediante una porción del gel la cual se tiñó con una solución de CuCl_2 0.3M por 5 min. Después se alineó la porción del gel teñida con el resto y se cortó la porción del gel que correspondía a la proteína. Esta se maceró y se colocó con un poco de PBS (apéndice 4) y se dejó a 4°C toda la noche, esto para que la proteína difundiera al PBS y al día siguiente se obtuvo el PBS con la NS1-GST.

Se determinó la concentración de proteína usando el kit DC para la determinación de proteínas (BioRad)

4. Inmunizaciones.

Se tomaron 4 grupos de 2 ratones, se inoculó a cada uno $100\ \mu\text{L}$ de un extracto de DV2 con un título de 6.2×10^6 UFP, $50\ \mu\text{g}$ de proteína NS1-GST, un lisado de células C6/36 y $100\ \mu\text{L}$ de solución salina, esta primera inmunización se realizó en el cojinete plantar y con adyuvante incompleto de Freund. Después de esta primera inmunización se realizaron otras dos en intervalos de 7 días y por vía IV, sin adyuvante. 7 días después de la última inmunización se realizó una punción cardíaca y se extrajeron bazo, ganglios sacrales y poplíteos.

5. Determinación de anticuerpos anti NS1 y anti NS3 por el método de ELISA.

Se fijaron las placas para ELISA de 96 pozos adicionando en cada pozo una cantidad de 0.5 μg de proteína (NS1-GST o NS3-GST) en 75 μL de regulador de carbonatos (apéndice 4) por pozo. Las placas fueron incubadas 1 hora a 37°C y durante toda la noche a 4°C, después se lavaron 4 veces con solución de lavado (apéndice 4). Posteriormente se bloquearon las placas adicionando a cada pozo 100 μL de solución de bloqueo (apéndice 4). Se incubaron una hora a 37°C y posteriormente se lavaron cuatro veces con solución de lavado.

Se analizaron los sueros diluyendo cada uno de estos en solución de bloqueo para obtener una dilución 1:100. Se transfieren 75 μL de los sueros diluidos a la placa de ELISA previamente sensibilizada. Se incubaron 1 hora a 37°C y al término de ese tiempo de lavaron 5 veces con solución de lavado. Se agregaron 75 μL de una solución 1:1000 en solución de bloqueo de un anticuerpo anti-ratón (IgA, IgM e IgG) marcado con peroxidasa de rábano. La incubación fue durante 1 hora a 37°C y posteriormente se lavaron con solución de lavado 5 veces.

El revelado de las placas se realizó adicionando 75 μL de solución de revelado a cada pozo (apéndice 4). Se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente 15 minutos y la reacción se detuvo con 10 μL / pozo de H_2SO_4 2.5 N.

La absorbancia (Abs) fue leída a 490 nm en un lector de ELISA (Vectra modelo Sunrise)

En el caso del ELISA para NS1, como control positivo se usó el suero de los ratones inmunizados con NS1-GST y como control negativo el suero de los animales inmunizados con solución salina. Mientras que para la ELISA de NS3 como control positivo se usó un Ac's monoclonal anti-NS3 y el mismo control negativo que para NS1.

6. Determinación de anticuerpos anti E por el método de Western blot.

Se corrió un gel preparativo de poliacrilamida al 10 %, en el que se corrió 186 µg de la proteína E-GST durante 1 hora a 100 mV, la proteína del gel fue transferida a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 100 mV. Trascurrido este tiempo se bloqueó la membrana con solución de bloqueo (apéndice 4) durante 2 horas a 37°C, se lavó la membrana 5 veces con solución de lavado (apéndice 4), y se cortó en tiras, que fueron incubadas con los sueros de ratones diluidos 1:50 durante 1 hora a 37°C en agitación, se lavó 5 veces, después se adicionó el anticuerpo secundario anti-Ig's totales de ratón conjugado a peroxidasa, a una dilución de 1:1000 y se incubó 1 hora a 37 °C en agitación, nuevamente se lavó y se reveló con una solución de diaminobencidina (apéndice 2).

7. Determinación de centros germinales.

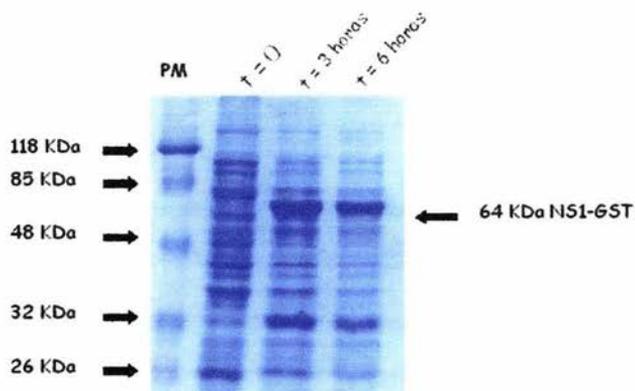
Se hicieron cortes transversales de 7 μm de espesor (criostato Leica CM-1900) tanto del bazo como de los ganglios, posteriormente se fijaron con acetona fría durante 20 minutos, seguida de cloroformo 10 minutos. Una vez fijados se hidrataron con BSA al 0.2%, y se colocaron la PNA-FITC a una dilución 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Como lectina control se utilizó *Ulex europaeus*-FITC, la cual es específica para células endoteliales. Terminado el periodo de incubación se lavó y se observó en el microscopio de epifluorescencia para hacer el análisis cuantitativo.

VIII. RESULTADOS.

1. PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA NS1-GST.

Para obtener la proteína NS1-GST, las bacterias *E. coli* BL-21 fueron transformadas con la construcción pGEX-4-T2-NS1, las colonias transformantes, fueron identificadas por ser resistentes a ampicilina, se cultivaron en medio LB y se indujo la producción de la proteína mediante la adición de IPTG. En este punto verificamos que la proteína se haya inducido a diferentes tiempos (0, 3 y 6 horas), mediante electroforesis. Confirmado esto, purificamos los cuerpos de inclusión formados por las proteínas, la mezcla se corrió en un gel preparativo de poliacrilamida al 8% de 25 x 25 cm. Una vez que se corrió el gel se identificó la banda que corresponde a NS1-GST proteína de interés, se cortó dicha porción para ser fragmentada en pedazos y colocada con una pequeña cantidad de PBS a 4°C durante toda la noche y al día siguiente recuperar el PBS al cual difundió la proteína para después determinar la concentración de ésta.

En la siguiente imagen se muestra la inducción de la proteína en varios tiempos después de la adición del IPTG, notamos que a los tiempos de 3h y 6 h ya se presenta una banda gruesa alrededor de los 64 kDa, que corresponde al peso molecular predicho de la proteína de fusión NS1-GST.



Inducción de la proteína NS1-GST a diferentes tiempos de inducción (0, 3 y 6 horas) se lisaron las células *E.coli* BL-21 y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10 %, durante 1 hora a 100 mV, se observa la existencia de una banda gruesa alrededor de los 64 kDa que corresponde al PM de NS1-GST.

Una vez que se extrajo la proteína se determinó su concentración usando el kit DC para determinación de proteínas, y se obtuvo una concentración de 3mg/mL

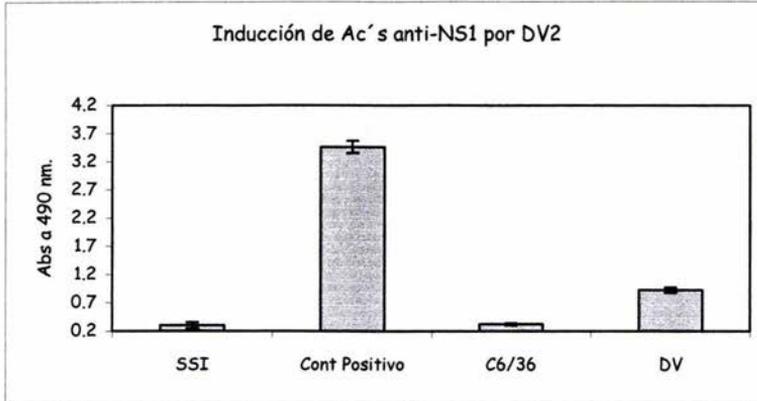
2. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-NS1, ANTI-NS3 y ANTI- E.

Para determinar si los ratones generan una respuesta de anticuerpos en contra de proteínas virales cuando se les inocula el virus completo, se tomaron 4 grupos de 2 ratones cada uno y se les administraron 100 μ l de un extracto de DV2 con un título de 6.2×10^6 UFP, 50 μ g de proteína anti-NS1-GST, 100 μ L de un lisado de C6/36 y 100 μ L de solución salina, respectivamente, en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund. A esto siguieron dos refuerzos IV a

intervalos de 7 días. 7 días después de la última inmunización se realizó una punción cardiaca y se separó el suero para ser evaluado por la técnica correspondiente.

Anti-NS1.

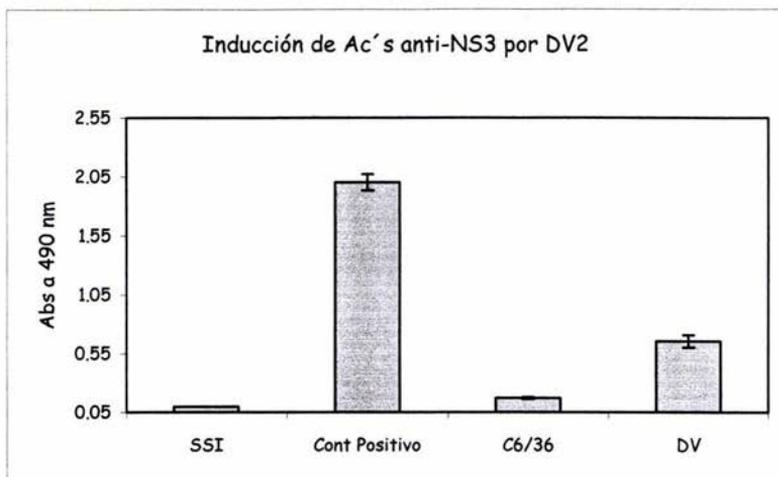
El control positivo se trata de un suero de un animal inmunizado con la proteína NS1-GST que da respuestas muy elevadas, una Abs 3.0 en promedio, mientras que la respuesta del SSI es mucho menor (Abs 0.3), y la respuesta del problema se encuentra entre estos dos valores (Abs 0.9) confirmando de esta manera la presencia de Ac's anti- NS1; la Abs para el grupo de C6/36 es de aproximadamente 0.3, valor semejante al de SSI lo que indica que los anticuerpos que se pudieron haber generado en contra de las células de mosquito no interfieren con nuestro sistema.



Detección de anticuerpos totales anti-NS1 por ELISA, en suero de ratones BALB/c. Los ratones fueron inculados con 100 μ L de solución salina (SSI), 50 μ g de proteína NS1-GST, 100 μ L de lisado de células C6/36 y 100 μ L de DV2 con título de 6.2×10^6 UFP, en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund, seguido de dos inmunizaciones adicionales IV sin adyuvante, a intervalos de 7 días. Los sueros se diluyeron 1:100 y fueron probados por ELISA. La placa fue sensibilizada con 0.5 μ g de proteína NS1-GST. Los resultados están expresados en absorbancia.

Anti-NS3.

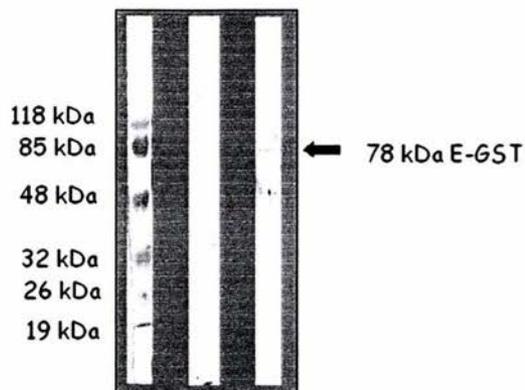
En el caso de la proteína NS3 observamos un patrón muy parecido solo que la respuesta de todas las muestras se ven disminuidas con respecto a NS1, con Abs 0.1 para SSI, Abs 2.0 para el control positivo, Abs 0.17 para C6/36, la muestra problema da una Abs 0.65 El control positivo se trata de un anticuerpo monoclonal anti-NS3 que se utilizó sin diluir.



Detección de anticuerpos totales anti-NS3 por ELISA, en suero de ratones BALB/c. Los ratones fueron inoculados con 100 μ L de solución salina (SSI), 100 μ L de lisado de células C6/36 y 100 μ L de DV2 con título de 6.2×10^6 UFP, en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund, seguida de dos inmunizaciones adicionales IV sin el adyuvante, a intervalos de 7 días. Los sueros se diluyeron 1:100 y fueron probados por ELISA. Como control positivo se usó un anticuerpo monoclonal anti-NS3. La placa fue sensibilizada con 0.5 μ g de proteína NS3-GST. Los resultados están expresados en absorbancia.

Anti -E.

Para determinar si se habían producido Ac's anti-E, se hizo un Western Blot, donde el control negativo se trata del SSI usado en la ELISA y donde se obtuvo una banda alrededor de los 78 kDa que corresponde al PM de la proteína E-GST:



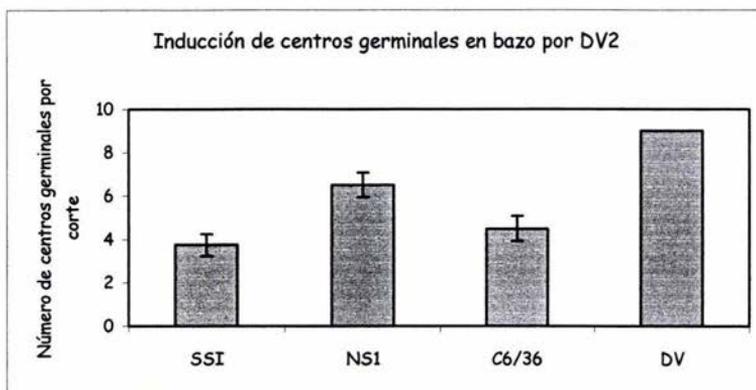
Análisis de la proteína E recombinante del DV2. Se corrió un gel preparativo de poliacrilamida al 10% con 185 μg de la proteína E, que fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se cortó en tiras que fueron incubadas con los sueros de ratones diluidos 1:50 y después con un anticuerpo secundario anti Ig's totales de ratón conjugado a peroxidasa. Carril PM: Marcadores de peso molecular, Carril 1: Suero de ratón inmunizado con SSI, Carril 2: Suero de ratón inmunizado con DV. Se detecta la presencia de anticuerpos anti-proteína E viral

3. DETERMINACIÓN DE CENTROS GERMINALES.

A los mismos ratones a los que se les determinó la presencia de Ac's específicos para DV-2, se les extrajo el bazo, ganglios sacrales, y ganglios poplíteos, de éstos se hicieron cortes y se marcaron con PNA-FITC, lectina específica para linfocitos B en centros germinales, y una lectina control *Ulex europaeus*-FITC que marca células endoteliales. Una vez que se realizó el marcaje, se cuantificó el número de centros germinales por corte, como áreas bien definidas, PNA positivas.

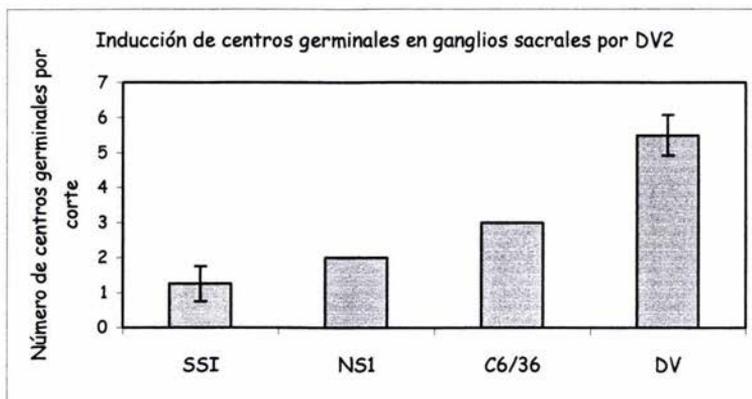
En el bazo existe un mayor número de centros germinales en los ratones inmunizados con DV que en los demás controles. Cabe destacar que los ratones

inmunizados con DV presentaron prácticamente el doble de centros germinales que los inmunizados solamente con C6/36 sin infectar.



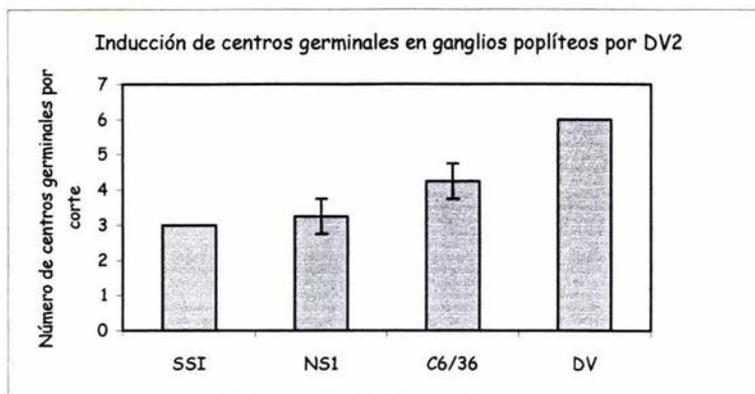
Número de centros germinales PNA positivos por corte de bazo. Ratones inmunizados con 100 μ L de solución salina (SPI), 50 μ g de proteína NS1-GST, 100 μ L de lisado de células C6/36 y 100 μ L de DV2 con título de 6.2×10^6 UFP. Las inmunizaciones se realizaron en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund, seguidas de dos inmunizaciones adicionales IV, sin adyuvante a intervalos de 7 días. Los centros germinales se marcaron con PNA-FITC.

En los ganglios sacrales se ve un patrón similar al del bazo, con la diferencia que en los animales inmunizados con NS1, es algo menor que en aquellos inmunizados con C6/36.

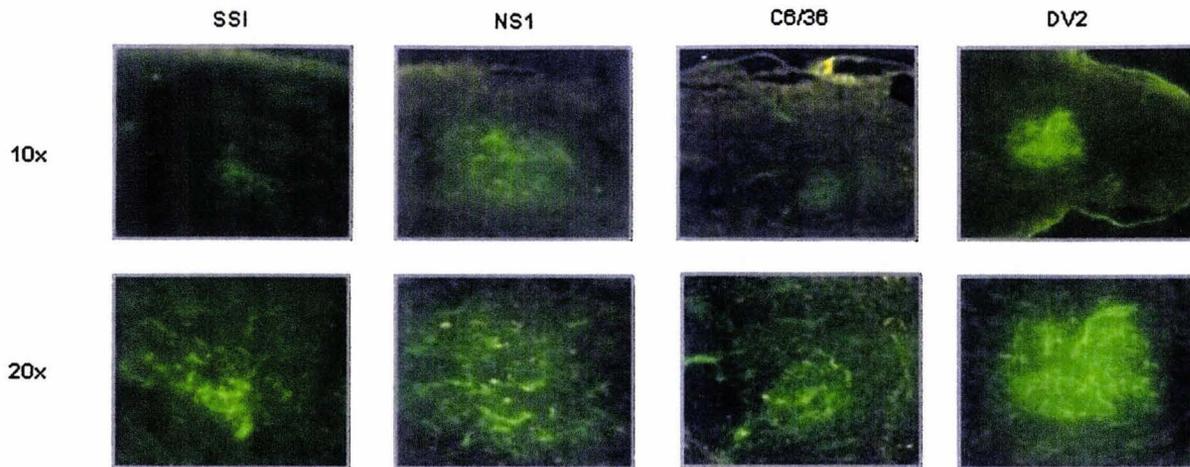


Número de centros germinales PNA positivos por corte de ganglio sacral. Ratones inmunizados con 100 μ L de solución salina (SSI), 50 μ g de proteína NS1-GST, 100 μ L de lisado de células C6/36 y 100 μ L de DV2 con título de 6.2×10^6 UFP. Las inmunizaciones se realizaron en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund, seguidas de dos inmunizaciones adicionales IV, sin adyuvante a intervalos de 7 días. Los centros germinales se marcaron con PNA-FITC.

En los ganglios poplíteos, aun que se ve el mismo patrón que en los ganglios sacrales, es importante destacar que en este caso la diferencia en el número de centros germinales entre los controles y el problema se reduce en comparación a los otros dos casos.

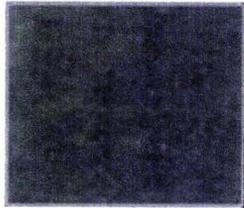
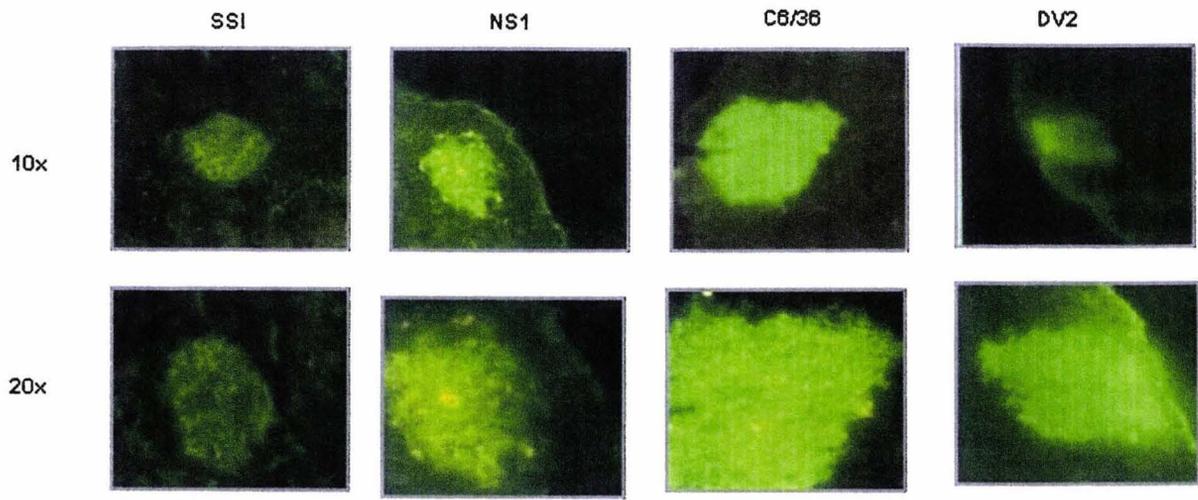


Número de centros germinales PNA positivos por corte de ganglio poplíteo. Ratones inmunizados con 100 μ L de solución salina (SPI), 50 μ g de proteína NS1-GST, 100 μ L de lisado de células C6/36 y 100 μ L de DV2 con título de 6.2×10^6 UFP. Las inmunizaciones se realizaron en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund, seguidas de dos inmunizaciones adicionales IV, sin adyuvante a intervalos de 7 días. Los centros germinales se marcaron con PNA-FITC.



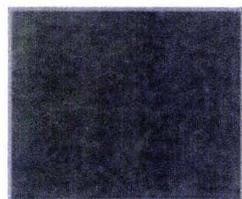
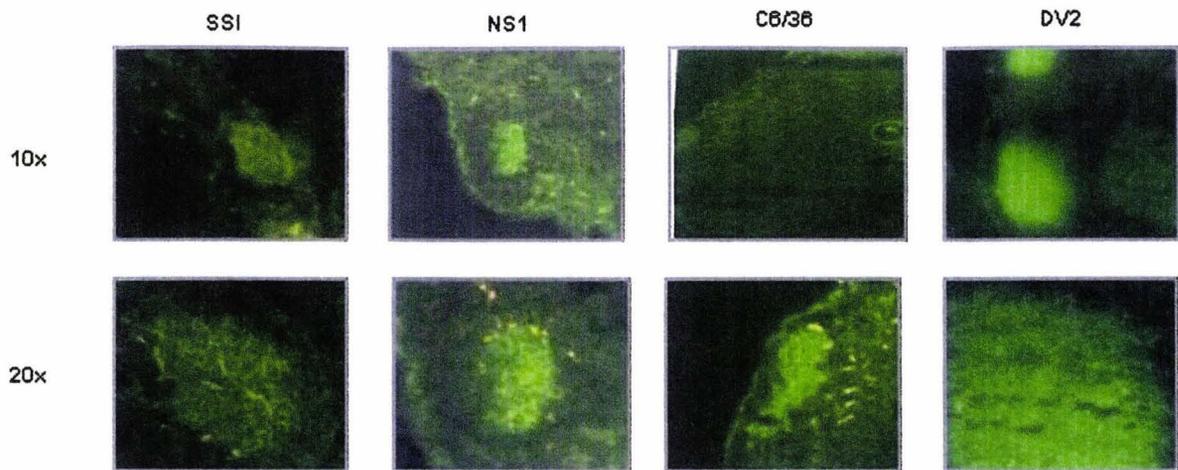
Ulex europeus

Cortes de bazo de ratones inoculados con 100 μL de solución salina (SSI), 50 μg de proteína NS1-GST, 100 μL de lisado de células C6/36 y 100 μL de DV2 con título de 6.2×10^5 UFP. Las inmunizaciones se realizaron en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund, seguidas de dos refuerzos adicionales IV, sin adyuvante a intervalos de 7 días. Los centros germinales se marcaron con PNA-FITC. Como control negativo para PNA se usó la lectina *Ulex europeus*-FITC.



Ulex europaeus

Cortes de ganglios poplíteos de ratones inoculados con 100 μ L de solución salina (SSI), 50 μ g de proteína NS1-GST, 100 μ L de lisado de células C6/36 y 100 μ L de DV2 con título de 6.2×10^6 UFP. Las inmunizaciones se realizaron en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund, seguidas de dos refuerzos adicionales IV sin adyuvante a intervalos de 7 días. Los centros germinales se marcaron con PNA-FITC. Como control negativo para PNA se usó la lectina *Ulex europaeus*-FITC.



Ulex europeus

Cortes de ganglios sacrales de ratones inoculados con 100 μL de solución salina (SSI), 50 μg de proteína NS1-GST, 100 μL de lisado de células C6/36 y 100 μL de DV2 con título de 6.2×10^5 UFP. Las inmunizaciones se realizaron en el cojinete plantar con adyuvante incompleto de Freund, seguidas de dos refuerzos adicionales IV, sin adyuvante a intervalos de 7 días. Los centros germinales se marcaron con PNA-FITC. Como control negativo para PNA, se usó la lectina *Ulex europeus*-FITC.

IX. DISCUSIÓN.

El DHF se ha asociado con infecciones secundarias con un DV heterólogo al que provocó la infección primaria. Esto se supone que se debe a la presencia de Ac's producidos durante la primera infección los cuales no se encuentran en concentraciones adecuadas para neutralizar el virus. Durante la segunda infección y al formar complejos Ag-Ac se facilita la entrada del virus a las células blanco por medio de los receptores para el Fc de los Ac's (4). Lo anterior se ha concluido mediante datos epidemiológicos en humanos y estudios *in vitro* e *in vivo* en primates (17).

Se sabe que los ratones BALB/c adultos no son susceptibles a la enfermedad por DV no adaptado y que al ser inmunizados ID en una sólo dosis o repetidas, presentan una buena respuesta de tipo humoral (21), mientras que al ser inoculados con virus adaptado IC, un 40% de los animales muere (43). Ya que el interés principal de éste proyecto era estudiar el DV como Ag y no como agente infeccioso, al intentar establecer nuestro modelo usamos ratones BALB/c y DV no adaptado. Éstos ratones desarrollan una respuesta de tipo humoral con virus no adaptado, y éste no resulta mortal en dichos animales (21), lo que nos permitió estudiar el virus como antígeno y no como agente infeccioso. Las rutas seleccionadas para inocular el virus fueron ID e IV, debido a que está reportado que por éstas se produce un buen título de Ac's.

El propósito de este trabajo fué analizar *in vivo* la respuesta de linfocitos B que genera el DV2 como antígeno viral. Nos enfocamos a analizar la respuesta de linfocitos B en ratones BALB/c desde dos ángulos: a) la producción de anticuerpos circulantes y, b) análisis *in situ* de la inducción de centros germinales.

No existen estudios en ratón donde se haya determinado Ac's en contra de proteínas específicas del DV, y como en humanos se ha relacionado la producción de ciertos anticuerpos (anti-NS1) con el DHF (41), en este trabajo se determinó la producción de Ac's en contra de 3 proteínas del virus, una estructural (proteína E) y dos no estructurales (NS1 y NS3). Se seleccionaron éstas tres proteínas por distintas causas; la primera es que la proteína E es la más abundante en el virión y existen reportes de que es la más inmunogénica (6,10,41), lo que sugiere que se produjeran Ac's en contra de está. Las proteínas NS1 y NS3 fueron seleccionadas debido a que al ser proteínas no estructurales, éstas sólo estarán presentes si el virus se está replicando, además se ha reportado que al inmunizar ratones pasivamente con Ac's anti-NS1 y anti-NS3, éstos parecen ofrecer cierta protección en contra de DV adaptado inoculado IC (46,47), a pesar de que de que los Ac's anti-NS1 presentan reacción cruzada con células endoteliales (48).

Los Ac's anti-E fueron evaluados por Western blot, donde se observa una banda alrededor de los 78 kDa, que corresponde al peso molecular de E-GST. Este resultado era de esperarse ya que como se mencionó anteriormente se trata de la proteína más abundante y más expuesta, además de que está reportado que se trata de una proteína altamente inmunogénica (6,10,41).

En cuanto a la respuesta que se obtuvo en la determinación de Ac's anti-NS1 y anti-NS3, vemos que existe una producción de estos anticuerpos. Ello resulta muy interesante ya que se ha reportado que los ratones BALB/c adultos no son susceptibles al DV. Sin embargo, al tratarse de dos proteínas no estructurales, éstas sólo pueden estar presentes si el virus se está replicando, y por lo tanto creemos que sí debe existir infección, aunque tal vez los ratones adultos son capaces de resolverla. En los resultados notamos que en los ratones inoculados con C6/36 se detectan valores de Abs similares al del grupo de SSI, por lo que los Ac's generados en contra de los antígenos de las células de mosquito C6/36, no interfieren en la detección de los Ac's específicos para DV2.

Existen reportes que indican que la proteína E es la que induce una mayor respuesta de Ac's en humanos tanto en infecciones primarias como secundarias, mientras que las respuestas para NS3 y NS1 sólo se dan en infecciones secundarias en el caso particular de DV2 (41).

En este caso no podemos determinar que proteína fue la que produjo mayor cantidad de Ac's. Las respuestas obtenidas para las proteínas NS1 y NS3, no son comparables ya que a pesar de haber sensibilizado ambas placas con la misma cantidad de proteína, durante la producción de la proteína NS1-GST, notamos que en la etapa de purificación solo se corta la porción del gel donde se encuentra la proteína de interés y ésta se coloca en PBS para que difunda hacia éste. Con esta técnica es muy probable que si no se alinea bien el fragmento del gel en donde se localizó la banda de la NS1-GST, se corte una porción que no sólo contenga la

proteína de interés, sino otras que estén cercanas al peso molecular, de tal forma que éstas también difundan y nuestra proteína pudiera no estar pura. Dado que la NS3-GST se produce de igual forma, y el método de cuantificación detecta la totalidad de proteínas, no podemos saber la concentración real absoluta de la proteína de interés, y por lo tanto la cantidad exacta con que fue sensibilizada la placa. En el caso los Ac's anti-E, como fueron determinados por otra técnica no podemos comparar con las otras proteínas. Pero sería de esperarse que la proteína E, por encontrarse en mayor cantidad en los viriones, fuese la que produjo una mayor cantidad de Ac's en comparación con las otras dos proteínas.

Como la primera inoculación se efectuó en los cojinetes plantares, seguida de dos refuerzos IV en la base de la cola, la formación de centros germinales se evaluó en el bazo, ganglios poplíteos y sacrales, por la posible contaminación de la zona en la inoculación IV. Lo que observamos es que en los tres casos existe mayor número de centros germinales para los ratones inoculados con DV2, en comparación con los controles. Es importante remarcar que incluso en los ratones inoculados con SSI existía un pequeño número constante de centros germinales. Ello es normal pues los ratones con los que trabajamos definitivamente no son animales libres de gérmenes ni de antígenos, y es por ello que presentan un número basal de centros germinales. Sin embargo, esta basal de centros germinales se encuentra muy por debajo del encontrado en los animales inoculados con DV.

No existen estudios donde se determine número de centros germinales después de una inoculación con DV. En este trabajo se detectó la inducción de centros germinales mediante el uso de PNA, lectina que marca específicamente los linfocitos B de centros germinales (38), ésta es una buena técnica para detectar la diferencial de centros germinales entre los distintos grupos, pero no nos permite determinar si esos centros germinales son DV específicos. Ya que el DV2 se propaga en células C6/36, y a que lo que se inoculara como fuente de DV2 es un lisado de C6/36 infectadas, lo que nos podría indicar el número real de centros germinales específicos para DV2, es la diferencia de centros germinales entre los ratones inmunizados con C6/36 y DV2, aunque se deben efectuar más estudios como realizar un doble marcaje para determinar si el Ag (DV) está presente en algunos de los centros germinales. Otra técnica para confirmar esto sería realizar RT-PCR con los órganos linfoides secundarios para determinar si se encuentra el Ag, con la desventaja que no nos indicaría si el Ag está en el centro germinal o en otra zona del órgano.

En el bazo fue donde se observó mayor número de centros germinales, esto no es de sorprender ya que las dos últimas inoculaciones fueron IV y sabemos que el bazo es el órgano linfoide secundario a donde llegan los Ag que se encuentran sistémicos.

En los ganglios se cuantificó un menor número de centros germinales. Cabe mencionar que en el ganglio sacral se ve gran número de centros germinales cuando se inoculara DV2, específicamente si se compara con el número

tan reducido en los controles; ello puede deberse, a la contaminación que se da durante la inoculación en la vena de la cola, y es por esto que es importante también evaluar estos ganglios.

En los ganglios poplíteos se ve que la diferencia de centros germinales entre los controles y el DV2 es menor a la diferencia existente entre los otros dos grupos, esto se puede deber a que los refuerzos se colocaron por vía I.V., promoviendo la formación de nuevos centros germinales en otros órganos linfoides secundarios.

Como los centros germinales son los sitios donde se da la hipermutación somática de Ac's, la maduración de la afinidad de las Ig's, el cambio de isotipo y la generación de memoria (35,37), es posible que al evaluar las clases de Ig's se encuentren diferentes isotipos, y que se desarrolle una memoria inmunológica, si es que la diferencia en el número de centros germinales efectivamente es debida al DV2.

Debido a que se detectan Ac's en contra de 3 proteínas del DV y que si existe una diferencial de centros germinales entre el grupo de C6/36 y DV, podemos concluir que algunos de los centros germinales inducidos después de la inoculación con el virus son DV específicos ya, que es en estos sitios donde se diferencian los linfocitos B a células plasmáticas, responsables de la producción de Ac's.

Encontramos que se inducen Ac's específicos para 3 distintas proteínas del virus: contra proteína E, que se reporta como la más inmunogénica; contra las proteínas NS1 y NS3, que sólo se expresan si existe replicación viral activa. Estos resultados sugieren que el ratón BALB/c es un modelo susceptible a la infección pero que es capaz de resolverla, quizá cursando asintomática. En cuanto a la formación de centros germinales, notamos un incremento de éstos en los ratones inoculados con DV. Es posible que esta diferencia se deba a centros germinales DV2-específicos.

Los resultados obtenidos aportan evidencia *in vivo* de que al inocular DV en el ratón, el virus promueve eventos inmunológicos antígeno-huésped capaces inducir anticuerpos y la formación centros germinales, además de desarrollan infección sin inducir sintomatología aparente.

X. CONCLUSIONES.

- El DV2 es capaz de inducir una respuesta de linfocitos B, para 3 diferentes proteínas, la proteína E, la NS1 y la NS3.
- El hecho de que se detecten Ac's específicos anti NS1 y anti-NS3 indica que existe una replicación del virus y por lo tanto infección.
- Existe un mayor número de centros germinales en el grupo inoculado con DV2, que en los controles, lo que podría hacernos pensar que dicha diferencia es debida a DV2.

XI. PERSPECTIVAS.

- Realizar una cinética de formación de Ac's, así como determinar la clase de los mismos.
- Realizar dobles marcajes para determinar centros geminales DV específicos.
- Determinar que células de ratón son las que se infectan con DV.
- Evaluar la formación de Ac's para otras proteínas del DV.
- Verificar si en el ratón también se presenta en fenómeno de infección facilitada.
- Determinar que citocinas están involucradas durante la infección por DV en el ratón.

APÉNDICES.

Apéndice 1.

Preparación de soluciones.

Medio de crecimiento para célula C6/36.

Medio esencial mínimo (MEM) 10x	100 mL
Aminoácidos no esenciales (100X)	10 mL
Solución de antibióticos	10 mL
Solución de vitaminas (100x)	10 mL
Suero fetal bovino certificado	70 mL
Solución de bicarbonato al 3.7 %	10 mL
Solución de L-glutamato (100x)	10 mL
Agua estéril	780 mL

Medio de mantenimiento para célula C6/36.

Medio esencial mínimo (MEM) 10x	100 mL
Aminoácidos no esenciales (100X)	10 mL
Solución de antibióticos	10 mL
Solución de vitaminas (100x)	10 mL
Suero fetal bovino certificado	20 mL
Solución de bicarbonato de sodio al 3	10 mL
Solución de L-glutamato (100x)	10 mL
Agua estéril	830 mL

Apéndice 2.

Preparación de reactivos para electroforesis y Western blot.

Gel de separación. Para 15 mL de gel al 10%.

H ₂ O (mili-Q)	5.9 mL
Mezcla de acrilamidas 30%	5 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	3.8 mL
SDS 10%	0.15 mL
Persulfato de amonio (APS) 10%	0.15 mL
TEMED	0.006 mL

Gel concentrador. Para 3 mL.

H ₂ O (mili-Q)	2.1 mL
Mezcla de acrilamidas 30%	0.5 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	0.38 mL
SDS 10%	0.03 mL
Persulfato de amonio (APS) 10%	0.03 mL
TEMED	0.003 mL

Regulador de corrimiento.

Tris-glicina 5x	200 mL
SDS 10%	12 mL
Agua bidestilada.	c.b.p. 1000 mL

Regulador de muestra.

SDS 10%	5 mL
EDTA	37 mg
Glicerol	5 mL
Tris-HCl 2M pH 6.8	1.25 mL
Azul de bromofenol	5 mg
Agua bidestilada	c.b.p. 50 mL

*Dividir en fracciones de 1 mL y congelar.

Regulador de transferencia.

Tris-Base	12.5 mL
Glicina	14.49 g
Etanol	200 mL
Agua bidestilada	c.b.p. 1000 mL

Solución de diaminobencidina. Por cada 60 mL de PBS, adicionar 30 mg de diaminobencidina y adicionar 60 μ L de H₂O₂ al 30%.

Apéndice 3.

Gel separador (purificación de proteínas). Para 100 mL de gel al 8%.

H ₂ O (mili-Q)	46.4mL
Mezcla de acrilamidas 30%	26.8 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	25 mL
SDS 10%	1 mL
Persulfato de amonio (APS) 10%	1 mL
TEMED	0.03 mL

Gel concentrador. Para 8 mL.

H ₂ O (milli-Q)	5.5 mL
Mezcla de acrilamidas 30%	1.3 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	1 mL
SDS 10%	0.08 mL
Persulfato de amonio (APS) 10%	0.08 mL
TEMED	0.008 mL

Apéndice 4.

Soluciones para ELISA.

Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH: 7.4.

Cloruro de sodio	8.7 g
Fosfato monobásico de sodio	0.7 g
Fosfato dibásico de sodio	2.7 g
Agua destilada	c.b.p 1000 mL

Solución reguladora de carbonatos pH: 9.5

Bicarbonato de sodio	5.6 g
Carbonato de sodio	3.5 g
Agua destilada	c.b.p 100 mL

Solución reguladora de citratos pH:5.6.

Ácido cítrico	0.4 g
Citrato de sodio	2.9 g
Agua destilada	c.b.p 100 mL

Solución de PBS – Tween. 0.1%.

Tween 20	0.1 mL
PBS	c.b.p 1000 mL

Solución de bloqueo (ELISA) albúmina al 5%.

Albúmina sérica bovina	5 g
Solución de PBS-tween	c.b.p. 100 mL

Solución reveladora (ELISA).

Peroxido de hidrógeno al 30%	50 μ L
Orto –fenildiamina	10 mg
Solución reguladora de citratos	6 mL

Solución de H₂SO₄ 2.5 N.

Ácido sulfúrico	6.6 mL
Agua destilada	c.b.p. 100 mL

BIBLIOGRAFÍA.

1. Beaty, B. J. and Marquardt W. *The biology of disease vectors*. Colorado University Press, USA.
2. Putnam J. and Scott T. 1955. The effect of multiple host contacts of the infectivity of dengue virus 2 infected *Aedes aegypti*. *J. Parasitol* 81:170-174.
3. Gómez Dantés H. *Dengue en: Enfermedades tropicales en México. Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica*. InDRE, SSA, Mexico D.F.
4. Halstead, S. B. 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239:476-481.
5. Gómez Dantés H. 1995. Dengue y dengue Hemorrágico: Cuadro Clínico, diagnóstico y vigilancia epidemiológica. *Enfermedades infecciosas y microbiología* 15:139.
6. Gubler, D. J. and G. Kuno. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAN INTERNATIONAL, New York.
7. Deubel, V., M. Laille, J. P. Hugnot, E. Chungue, J. L. Guesdon, M. T. Drouet, S. Bassot, and D. Chevrier. 1990. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J. Virol. Methods* 30:41-54.
8. Cuzzubbo, A. J., D. W. Vaughn, A. Nisalak, T. Solomon, S. Kalayanaroj, J. Aaskov, N. M. Dung, and P. L. Devine. 2000. Comparison of PanBio Dengue Duo IgM and IgG capture ELISA and venture technologies dengue IgM and IgG dot blot. *J. Clin. Virol.* 16:135-144.
9. Organización Panamericana de la Salud. *Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control*. New York, USA.
10. Helenius Ari. 1995. Alphavirus and Flavivirus Glycoproteins: Structures and functions. *Cell* 81:651-653.
11. Hung, S. L., P. L. Lee, H. W. Chen, L. K. Chen, C. L. Kao, and C. C. King. 1999. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology* 257:156-167.
12. Modis, Y., S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427:313-319.
13. Guirakhoo, F., R. A. Bolin, and J. T. Roehrig. 1992. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and

alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology* 191:921-931.

14. Muñoz Jordán J.L. and Sánchez-Burgos G.G. 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *PNAS* 100:14333-14338.
15. Modis, Y., S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison. 2003. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:6986-6991.
16. Chambers T.J. 1992. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Ann Rev Microbiol* 44:649-688.
17. Halstead, S. B. 1979. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J.Infect.Dis.* 140:527-533.
18. Chen, Y. C., S. Y. Wang, and C. C. King. 1999. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J.Virol.* 73:2650-2657.
19. Chen, Y. C. 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparin sulfate. *Nat.Med.* 3:866-871.
20. Wu, S. J., G. Grouard-Vogel, W. Sun, J. R. Mascola, E. Brachtel, R. Putvatana, M. K. Louder, L. Filgueira, M. A. Marovich, H. K. Wong, A. Blauvelt, G. S. Murphy, M. L. Robb, B. L. Innes, D. L. Birx, C. G. Hayes, and S. S. Frankel. 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat.Med.* 6:816-820.
21. Taweekhaisupapong, S., S. Sriurairatana, S. Angsubhakorn, S. Yoksan, M. M. Khin, S. Sahaphong, and N. Bhamarapavati. 1996. Langerhans cell density and serological changes following intradermal immunisation of mice with dengue 2 virus. *J.Med.Microbiol.* 45:138-145.
22. Chaturvedi, U. C., R. Agarwal, E. A. Elbishbishi, and A. S. Mustafa. 2000. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol.Med.Microbiol* 28:183-188.
23. Kurane, I. and F. A. Ennis. 1994. Cytokines in dengue virus infections: role of cytokines in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 5:443-448.
24. Roehrig, J. T., A. J. Johnson, A. R. Hunt, B. J. Beaty, and J. H. Mathews. 1992. Enhancement of the antibody response to flavivirus B-cell epitopes by using homologous or heterologous T-cell epitopes. *J. Virol.* 66:3385-3390.

25. Kurane, I., B. L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, A. Meager, J. Janus, and F. A. Ennis. 1991. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J.Clin.Invest* 88:1473-1480.
26. Kurane, I., L. Zeng, M. A. Brinton, and F. A. Ennis. 1998. Definition of an epitope on NS3 recognized by human CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones cross-reactive for dengue virus types 2, 3, and 4. *Virology* 240:169-174.
27. Mongkolsapaya, J., W. Dejnirattisai, X. N. Xu, S. Vasanawathana, N. Tangthawornchaikul, A. Chairunsri, S. Sawasdivorn, T. Duangchinda, T. Dong, S. Rowland-Jones, P. T. Yenchitsomanus, A. McMichael, P. Malasit, and G. Screaton. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat.Med.* 9:921-927.
28. Bethell, D. B., K. Flobbe, X. T. Cao, N. P. Day, T. P. Pham, W. A. Buurman, M. J. Cardoso, N. J. White, and D. Kwiatkowski. 1998. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J.Infect.Dis.* 177:778-782.
29. Libraty, D. H., S. Pichyangkul, C. Ajariyakhajorn, T. P. Endy, and F. A. Ennis. 2001. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J.Virol.* 75:3501-3508.
30. Kuno, G., A. V. Vorndam, D. J. Gubler, and I. Gomez. 1990. Study of anti-dengue NS1 antibody by western blot. *J.Med.Virol.* 32:102-108.
31. LaFleur, C., J. Granados, G. Vargas-Alarcon, J. Ruiz-Morales, C. Villarreal-Garza, L. Higuera, G. Hernandez-Pacheco, T. Cutino-Moguel, H. Rangel, R. Figueroa, M. Acosta, E. Lazcano, and C. Ramos. 2002. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum.Immunol.* 63:1039-1044.
32. Stephens, H. A., R. Klaythong, M. Sirikong, D. W. Vaughn, S. Green, S. Kalayanarooj, T. P. Endy, D. H. Libraty, A. Nisalak, B. L. Innis, A. L. Rothman, F. A. Ennis, and D. Chandanayingyong. 2002. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens* 60:309-318.
33. Rico-Hesse, R., L. M. Harrison, R. A. Salas, D. Tovar, A. Nisalak, C. Ramos, J. Boshell, M. T. de Mesa, R. M. Nogueira, and A. T. da Rosa. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230:244-251.

34. Abul K.Abbas. *Inmunología celular y molecular*. Mc Graw-Hill Interamericana, México.
35. Kelsoe, G. 1995. The germinal center reaction. *Immunol.Today* 16:324-326.
36. Kelsoe, G. 1995. In situ studies of the germinal center reaction. *Adv.Immunol.* 60:267-288.
37. Kosco-Vilbois M.H. and Bonnefoy J.Y. 1997. The physiology of murine germinal center reactions. *Immunological Reviews* 156:127-136.
38. Rose M.L. and Malchiodi F. 1981. Binding of peanut to thymic cortex and germinal centres of lymphoid tissue. *Immunology* 42:583-591.
39. Field y Col. 1996. Flaviviruses. In *Virus taxonomy and fundamental virology*. E.U.A., pp. 1043-1117.
40. Kurane, I., A. L. Rothman, P. G. Livingston, S. Green, S. J. Gagnon, J. Janus, B. L. Innis, S. Nimmannitya, A. Nisalak, and F. A. Ennis. 1994. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch.Virol.Suppl* 9:59-64.
41. Valdes, K., M. Alvarez, M. Pupo, S. Vazquez, R. Rodriguez, and M. G. Guzman. 2000. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 7:856-857.
42. Thein S. and J. Aaskov. 1993. Changes in Levels of anti-Dengue Virus IgG Subclasses in Patients with Disease of Varying Severity. *J.Med.Virol.* 40:102-106.
43. Raut C.G., Deolankar R.P., Kolhapure R.M., and Goverdhan M.K. 1996. Suceptibility of laboratory-bred rodents to the experimental infection with Dengue Virus type 2. *Acta Virologica* 40:143-146.
44. Chaturvedi, U. C., P. Tandon, A. Mathur, and A. Kumar. 1978. Host defence mechanisms against dengue virus infection of mice. *J.Gen.Virol.* 39:293-302.
45. Van Der Broek M.F. and Ulrike Muller. 1995. Antiviral Defense in mice lacking alfa/beta and gamma Interferons receptors. *J.Virol.* 69:4792-4796.
46. Cellina H-C.Tan, Eu-Hian Yap, Mulkit Singh, Vicent Deubel, and Yow-Cheong Chan. 1990. Passive protection studies in mice with monoclonal antibodies directed against the non-structural protein NS3 of dengue 1 virus. *J.Gen.Virol.* 71:745-748.

47. Schlesinger, J. J., M. W. Brandriss, and E. E. Walsh. 1987. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J.Gen.Virol.* 68 (Pt 3):853-857.
48. Lin, C. F., H. Y. Lei, A. L. Shiau, C. C. Liu, H. S. Liu, T. M. Yeh, S. H. Chen, and Y. S. Lin. 2003. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J.Med.Virol.* 69:82-90.
49. Johnson, A. J. and J. T. Roehrig. 1999. New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J.Virol.* 73:783-786.