



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**MODULACIÓN DE LOS GLICANOS DE SUPERFICIE
DE LOS MONOCITOS HUMANOS DURANTE LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE**

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

**SANDRA AMYRIS ORTEGA
FRANCISCO**

Tutora: BLANCA HAYDÉ RUIZ ORDAZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



MÉXICO, D. F.

ENERO 2013



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.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la asesoría de la Doctora Blanca Haydé Ruiz Ordaz, la supervisión técnica de la Doctora Verónica Monroy Martínez en el laboratorio 3 del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y el apoyo del comité tutorial conformado por la Doctora Leticia Rocha Zavaleta y el Doctor Edgar Zenteno Galindo.

Con el apoyo del Posgrado en Ciencias Bioquímicas UNAM

Este trabajo forma parte del proyecto “Dengue y Hemostasia” PAPIIT financiado por DGAPA-UNAM y CONACyT.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi familia, ya que siempre me han apoyado y es gracias a ellos que he logrado todo.

A mi mamá que siempre me ha motivado para lograr todo lo que me propongo, que me ha apoyado, que me ha escuchado y dado consejos, que siempre está conmigo. Y sobre todo que me ha enseñado a ser una mujer fuerte, capaz e independiente.

A mi papá que ha sido una gran inspiración para mí, siempre con hambre de conocimiento, que a pesar de los obstáculos siempre me ha apoyado en todos los aspectos y que sobre todo me ha sabido comprender.

A mi hermano Andrés que es otra gran motivación para mí, el chiquito de la familia, que a pesar de las diferencias es una persona con un enorme corazón y que siempre me ha apoyado.

A mi hermano Alfredo que está en el cielo y que fue un gran compañero en la escuela, un gran amigo, un apoyo y una inspiración.

En fin, a todos mis tíos, primos, abuelitos, sobrinos que me han mostrado su apoyo desde que inicie mis estudios.

Después quiero agradecer a mi novio Beto, amor gracias por apoyarme siempre, por motivarme a seguir y por quererme tanto.

No puede faltar el agradecimiento a todos mis amigos, especialmente a Gaby, Cynthia, Nadia, Daniel, Octavio, Israel, Karla, Memo, Rafa, Fany, Ingrid, a mis dos grandes amigos de toda la vida Miguel y Víctor. Mis amigos de la facultad Fernando y José, a todos ellos gracias.

Finalmente quiero agradecer a la doctora Blanca Ruiz por su enorme apoyo, por sus enseñanzas y consejos, a la doctora Veronica Monroy por su paciencia y apoyo. Y a todas las chicas del laboratorio porque me han enseñado mucho y son grandes amigas; a Janet, a Eli, a Jaqueline, a Gaby, a Adriana y a Omar.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	12
1. Situación actual del Dengue	12
1.1. Dengue en México.....	14
2. El agente etiológico	16
2.1. Ciclo de replicación viral.....	19
3. Transmisión del virus dengue	23
4. Manifestaciones clínicas del dengue	25
4.1. Curso de la enfermedad.....	27
4.2. Fase febril.....	28
4.3. Fase crítica.....	28
4.4. Fase de recuperación.....	29
4.5. Dengue severo.....	31
5. Patogénesis	33
5.1. Respuesta inmune a la infección.....	33
5.2. Inmunidad innata.....	33
5.3. Respuesta mediada por anticuerpos.....	34
5.4. Tormenta de citocinas.....	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41



HIPÓTESIS	42
OBJETIVOS	42
Objetivo general.....	42
Objetivos específicos.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Material Biológico	43
1.1. Obtención de monocitos humanos a partir de sangre completa de donadores sanos.....	43
1.2. Determinación de la pureza de los monocitos aislados.....	45
2. Evaluación de la infección de monocitos humanos	45
2.1 Análisis de la infección por microscopia de fluorescencia.....	45
2.2. Evaluación de la infección por citometría de flujo.....	46
3. Evaluación comparativa de glicanos de superficie	47
3.1. Evaluación por microscopia electrónica de transmisión con tinción de Rojo de Rutenio.....	47
3.2. Evaluación por citometría de flujo con lectinas de unión a glicanos.....	47
4. Evaluación comparativa de glicanos superficiales de monocitos estimulados con IL8 y TNFα	49
RESULTADOS	50
1. Aislamiento de monocitos humanos de sangre periférica	50



2. Evaluación de la infección de monocitos primarios por el virus dengue....	52
3. Evaluación comparativa de glicanos de superficie.....	56
3.1. Evaluación por microscopia electrónica con tinción de Rojo de Rutenio.....	56
3.2. Evaluación por citometría de flujo con lectinas de unión a glicanos.....	58
4. Evaluación comparativa de glicanos superficiales de monocitos estimulados con IL8 y TNFα.....	66
DISCUSIÓN.....	70
1. Aislamiento de monocitos humanos de sangre periférica.....	70
2. Evaluación de la infección de monocitos primarios por el virus dengue....	71
3. Evaluación comparativa de glicanos de superficie.....	74
4. Evaluación comparativa de glicanos superficiales de monocitos estimulados con IL8 y TNF α	79
CONCLUSIONES.....	80
REFERENCIAS.....	81



ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Riesgo global de contraer Dengue.....	13
Figura 2. Riesgo de transmisión de Dengue en México.....	15
Figura 3. El virus dengue.....	16
Figura 4. Estructura viral	17
Figura 5. Diagrama esquemático del genoma y la poliproteína del virus dengue.....	19
Figura 6. Esquema del ciclo de replicación viral.....	22
Figura 7. Esquema del ciclo de transmisión del virus.....	23
Figura 8. El mosquito vector.....	24
Figura 9. Criterios para el diagnóstico del dengue.....	26
Figura 10. Curso de la enfermedad.....	27
Figura 11. Manifestaciones hemorrágicas de la enfermedad.....	30
Figura 12. Modelo de la inmunopatogénesis del Dengue severo.....	36
Tabla 1. Evaluación del fenotipo superficial de monocitos-macrófagos-células dendríticas durante los procesos de diferenciación y maduración.....	38



Figura 13. Expresión de ácido siálico superficial durante la diferenciación y maduración de las células dendríticas.....	39
Tabla 2. Lectinas de unión a glicanos evaluadas.....	47
Figura 14. Ligando de unión a la lectina PNA.....	48
Figura 15. Ligando de unión a la lectina Concanavalina A.....	48
Figura 16. Ligando de unión a la lectina SNA.....	48
Figura 17. Ligando de unión a la lectina MAA.....	49
Figura 18. Monocitos de sangre periférica.....	50
Figura 19. Dotplot de monocitos.....	51
Figura 20. Evaluación de CD14.....	51
Figura 21. Evaluación de la infección de monocitos por el DENV2.....	53
Figura 22. Evaluación de la infección de monocitos por el DENV2 a diferentes multiplicidades de infección.....	53
Figura 23. Análisis de los eventos positivos a la proteína E en la infección por el DENV.....	54
Figura 24. Evaluación de la cinética de infección de monocitos por el DENV2.....	55
Figura 25. Evaluación comparativa de los glicanos de superficie.....	57
Figura 26. Lectinas de unión a glicanos.....	59



Tabla 3. Determinación de la infección de monocitos primarios de donadores por el virus dengue.....	60
Figura 27. Infección de monocitos humanos de diferentes donadores por el DENV2.....	61
Figura 28. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue del donador 121762.....	62
Tabla 4. Modulación de glicanos superficiales por la infección con el virus dengue....	63
Figura 29. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue. SNA.....	64
Figura 30. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue .MAA.....	64
Figura 31. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue UEA.....	65
Figura 32. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue. PNA.....	65
Figura 33. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue. Concanavalina A.....	66
Figura 34. Evaluación diferencial de monocitos estimulados con TNF α . SNA.....	67
Figura 35. Evaluación diferencial de monocitos estimulados con TNF α . MAA.....	68
Figura 36. Evaluación diferencial de monocitos estimulados con IL-8. SNA.....	68
Figura 37. Evaluación diferencial de monocitos estimulados con IL-8. MAA.....	69



RESUMEN

El virus del Dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, que presenta 4 serotipos denominados: DENV-1-4. Tiene una estructura esférica de 40-50 nm, con una envoltura lipídica, una nucleocápside isométrica y un genoma de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva, que codifica para tres proteínas estructurales y siete no estructurales, dentro de las cuales se encuentran las enzimas necesarias para su replicación. El Dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores (mosquitos del género *Aedes* como *A. aegypti*, *A. albopictus*) de mayor prevalencia en el mundo. La OMS reporta anualmente 100 millones de personas infectadas a nivel mundial y más de 500 000 casos de dengue severo, con una tasa de mortalidad del 2 al 15 %. La enfermedad presenta un espectro clínico muy amplio que va desde una forma benigna, auto-limitada con presencia de fiebre indiferenciada llamada Fiebre por Dengue (FD) ó Dengue Clásico, hasta las formas severas como; La Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y/o el Síndrome de Choque por Dengue (SCD) que en su conjunto se conocen como Dengue severo, que presenta una letalidad muy elevada (40% de los casos). En el Dengue severo se presentan alteraciones importantes en los sistemas de coagulación- inflamación, con la presencia de niveles incrementados de citocinas pro-inflamatorias (IL-8, TNF α), ocasionando daño a nivel del endotelio vascular. Se sabe que las citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-8 en diferentes procesos infecciosos favorecen el incremento en la expresión de glicanos de superficie (principalmente ácido siálico).

Por otro lado, en las interacciones tempranas de los microorganismos patógenos con su célula diana involucran el reconocimiento de moléculas de superficie (carbohidratos, proteínas) que les permiten ya sea internalizarse ó iniciar diferentes tipos de respuestas (pro-adherente, pro-inflamatoria, entre otras). Recientemente, se ha reportado la importancia de la participación de los carbohidratos (glicoproteínas) en las interacciones tempranas del DENV con células blanco.



En trabajos previos de nuestro grupo, observamos la participación de moléculas sializadas durante las interacciones tempranas del virus dengue (DENV) con células del mosquito *Aedes aegypti*. En el presente trabajo nos propusimos evaluar la posible participación de moléculas sializadas en células humanas infectadas con el virus dengue. Los monocitos humanos son células diana para el DENV, las cuales presentan este tipo de azúcares en su superficie. Así mismo, se conoce que durante la activación de los monocitos humanos por diferentes agonistas como el LPS o citocinas pro-inflamatorias, se presenta una modificación de moléculas sializadas, en la superficie celular del monocito. Con base en lo anterior, evaluamos la modulación de glicanos superficiales, tanto durante la infección de monocitos humanos por el DENV, como por la acción de las citocinas pro-inflamatorias IL-8 y TNF- α , las cuales juegan un papel importante en la patogénesis del Dengue severo.

Evaluamos la infección *in vitro* de monocitos humanos con el DENV. Inicialmente establecimos las condiciones necesarias para obtener los monocitos aislados de sangre periférica de donadores sanos, mediante la separación por densidad de gradientes con ficoll. Determinamos que la infección por DENV tiene un comportamiento dosis-respuesta dependiente.

Posteriormente, evaluamos mediante microscopía electrónica la expresión de glicanos de superficie tanto de células infectadas como no infectadas., Encontramos que los monocitos infectados por el virus dengue mostraban mayor afinidad al rojo de rutenio, observando un aumento en la intensidad de contraste de la membrana teñida, es decir. un aumento en la presencia de oligosacáridos que contienen ácido siálico. Estos datos se confirmaron paralelamente mediante ensayos de interacción con lectinas, observando un aumento en la unión de la lectina SNA en los monocitos infectados.

Además de evaluar la presencia del siálico en la superficie de los monocitos humanos, estudiamos la posible modulación de diferentes glicanos de la superficie celular, por lo que elegimos diferentes lectinas específicas útiles en la detección tanto de glicanos simples como complejos. Pudimos determinar que los monocitos contienen una gran variedad de glicanos superficiales simples y complejos tanto N como O-glicanos. Observamos que éstas células presentan gran cantidad de manosas y que expresan más ácido siálico α 2-6 que α 2-3. También detectamos la presencia de fucosa y de O-



glicanos. Al analizar los monocitos infectados con DENV en comparación con las células control, no observamos cambios significativos tanto en los niveles de fucosa como de O-glicanos. Sin embargo, encontramos un incremento considerable en los niveles de ácido siálico α 2-6, una tendencia a la disminución de ácido siálico α 2-3 y una disminución en los niveles de manosa.

Asimismo, con el objetivo de evaluar el posible papel de las citocinas pro-inflamatorias secretadas durante la infección por el DENV en la modulación de glicanos de superficie, estimulamos los monocitos primarios con $\text{TNF}\alpha$ e IL-8. Observamos que en cultivos celulares estimulados con $\text{TNF}\alpha$, los niveles de ácido siálico α 2-6 en la superficie celular se incrementan, mientras que los niveles de expresión de α 2-3 disminuyen.

Con base en nuestros resultados, proponemos que durante la infección por el virus dengue de monocitos humanos, la modulación de glicanos superficiales depende tanto del DENV como de moléculas efectoras del huésped secretadas en respuesta a la infección (citocinas pro-inflamatorias) y que posiblemente la suma de ambos estímulos es la que de como resultado la modulación de los glicanos de superficie del monocito.



INTRODUCCIÓN

SITUACIÓN ACTUAL DEL DENGUE

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial que constituye una de las prioridades de Salud Pública en los países tropicales y subtropicales del mundo, predominantemente en áreas urbanas y semiurbanas.

El Dengue es una infección viral autolimitada y sistémica transmitida a los humanos por mosquitos. El vector primario, el mosquito *Aedes aegypti*, ha alcanzado una amplia distribución a través de las latitudes tropicales y subtropicales. Emergió en África durante la trata de esclavos en el siglo XV, se expandió a Asia en los siglos XVIII y XIX durante los intercambios comerciales y se ha propagado globalmente con el incremento del turismo y del comercio en los últimos 50 años.

Actualmente el Dengue es endémico en más de 100 países en África, América, Medio Oriente, Sur-este Asiático, y el Pacífico Occidental. Por lo que se estima que el 55% de la población mundial está en riesgo, siendo el Sureste Asiático y el Pacífico Occidental las regiones más seriamente afectadas. Antes de 1970 sólo nueve países habían experimentado epidemias de Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD), para 1995 el número había incrementado a más del cuádruple.

Aunque no se ha determinado con exactitud la presencia real de la enfermedad (ya que existe sub-notificación), la Organización mundial de la Salud (OMS) reporta que de 50 a 100 millones de personas se infectan anualmente, de las cuales, 500 000 presentan la forma severa de la enfermedad y requieren hospitalización, una gran porción de ellos son niños, y cerca del 2.5 % mueren **(1)**.

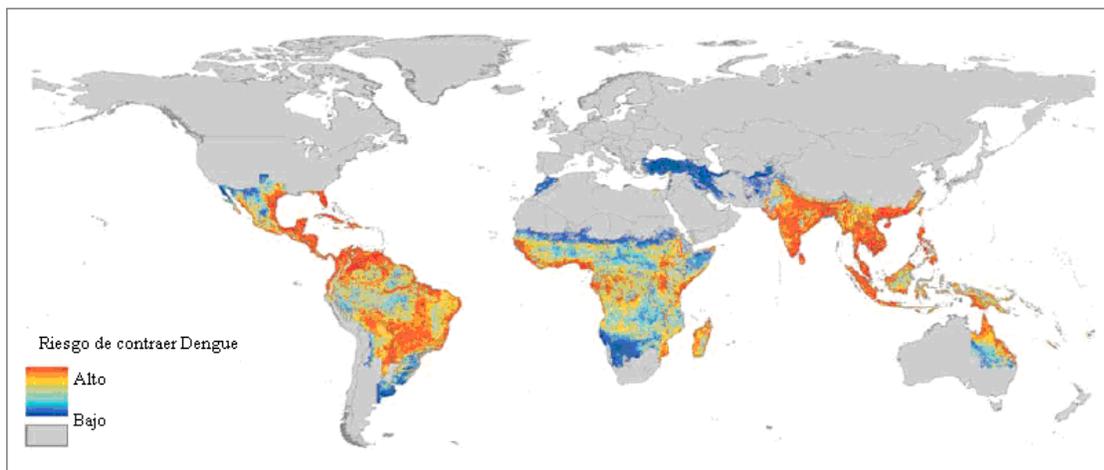


Figura 1. Riesgo global de contraer Dengue. Las diferentes tonalidades indican el nivel de riesgo que los habitantes de cada zona afrontan de infección por dengue. (Adaptado de Cameron P. Simmons 2012)

La diversidad antigénica del virus dengue es importante, ya que la falta de inmunidad protectora cruzada contra los cuatro serotipos virales, permite múltiples infecciones secuenciales. La propagación del Dengue, ilustra como el comercio (el transporte del mosquito vector), el incremento del turismo entre los países (el movimiento de personas viremicas), las masas urbanas (lo cuál lleva a múltiples infecciones por un mosquito infectado) y estrategias poco efectivas del control del vector, han propiciado una pandemia en la era moderna **(2)**.

En las epidemias de Dengue, la tasa de infección en personas que no habían sido expuestas anteriormente al virus, es frecuentemente del 40% al 50%, pero pueden presentar una tasa del 80% - 90%. Sin diagnóstico temprano y/o tratamiento oportuno, las tasas de mortalidad pueden exceder el 20%. Un acceso eficiente a cuidado médico y personal de salud adecuadamente preparado par el reconocimiento de síntomas y tratamiento del Dengue, pueden reducir la tasa de mortalidad a menos del 1.5%.

La FHD, una complicación potencialmente letal, fue reconocida por primera vez en los años 50's durante una epidemia de Dengue en Filipinas y Tailandia. Desde entonces, la incidencia y las epidemias de Dengue severo han aumentado exponencialmente en los últimos 35 años, no sólo por el incremento en el número de casos, sino también en los brotes de FHD que han ocurrido. Sólo en el 2007 se reportaron más de 890 000 casos de Dengue en América, de los cuales 26 00 fueron casos de FHD.



En América latina se ha observado que el número de enfermos de dengue aumenta cíclicamente de forma epidémica cada 3-5 años, siempre con una tendencia ascendente. La mayor incidencia en la región se observó en el 2002, con más de 1 millón de casos, entre ellos, 14 000 de FHD. Según datos la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en noviembre del 2005, 27 países habían notificado casos de Dengue y en 14 de ellos circulaban dos o tres serotipos simultáneamente. A partir de 1984 se registraron casos de FHD en el país, siendo Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Colima y Guerrero los estados más afectados.

El Dengue en México

En el periodo de 1998 a 2002 se reportan 69,082 casos de Dengue, incluyendo 3,222 de DHF. De los cuales, el estado de Nuevo León notificó 15,444 casos (22.4%); Tamaulipas 11,733 (17.0%); Veracruz 10,100 (14.6%); Oaxaca 4,468 (6.5%); Guerrero 3,659 (5.3%); Colima 2,985 (4.3%); Tabasco 2,465 (3.6%) y los restantes 18,228 casos (26.3%), corresponden a 23 entidades.

Los estados con mayor promedio de casos de Dengue Hemorrágico de 1998 a 2002 fueron: Colima con 22.5 casos por 100 mil habitantes, seguido en orden decreciente por los estados de Guerrero (3.2), Yucatán (2.8), Nayarit (2.7), Quintana Roo (2.2), Chiapas y Nuevo León (1.6 c/u), y Tamaulipas (1.3).

En cuanto a grupos de edad, el más afectado (en el periodo 1998-2002) fue el de 25 a 44 años de edad, con 33.3% del total de casos, seguido por el de 15 a 24 (22.2%) y por el de 5 a 14 (20.3%); el restante 24.2% corresponde a los otros grupos etáreos. Respecto al Dengue severo se observó el mismo patrón de comportamiento en 1998 y 1999, pero a partir de 2000 el grupo más afectado fue de 5 a 14 años.

En México como en otras partes del mundo, la presencia del Dengue está condicionada a la existencia del vector. Los estados de la República que tienen menor riesgo a presentar Dengue son: Baja California, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Tlaxcala y el D.F.

Los estados con mayor riesgo para la enfermedad son: Sonora, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Veracruz, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Figura 2).

La Secretaría de Salud en su reporte emitido, en el 2008 indica que se confirmaron 25040 casos de FD y 6114 de FHD, así como 115417 probables casos durante ese año **(3)**.



Figura 2. Riesgo de transmisión de Dengue en México. Las diferentes tonalidades indican el nivel de riesgo que los habitantes de cada zona afrontan de infección por dengue. (Tomado de Secretaría de Salud 2012)

Los factores determinantes para la aparición y la re-emergencia del Dengue son complejos y no se han estudiado completamente. En general, la propagación del Dengue es atribuida a la expansión de la distribución geográfica de los cuatro serotipos del virus y de los mosquitos vectores, el más importante de ellos es la especie, predominantemente urbana, *Aedes aegypti*. El rápido crecimiento urbano de la población de mosquitos ha dado como resultado un mayor número de personas expuestas al contacto con este mosquito, especialmente en áreas favorables para la reproducción del mismo **(1-5)**.

Se ha propuesto que la propagación del Dengue se debe a una combinación de los siguientes factores: el incremento de la urbanización, el crecimiento poblacional, la migración, los viajes internacionales y las dificultades del control efectivo del vector. El cambio climático también puede ser un factor que contribuya a la propagación del Dengue. Sin embargo, las investigaciones globales a cerca del Dengue, no han recibido el mismo nivel de fondos como en otras enfermedades tropicales de origen infeccioso. Actualmente no hay fármacos disponibles ni una vacuna autorizada y el diagnóstico en áreas endémicas es, en gran medida, clínico.

EL AGENTE ETIOLÓGICO

El virus Dengue pertenece a la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus*, al cual también pertenecen alrededor de 70 virus relacionados antigenicamente, entre ellos, el virus de la Fiebre Amarilla y el Virus del Oeste del Nilo, entre otros. Existen 4 serotipos diferentes denominados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4.

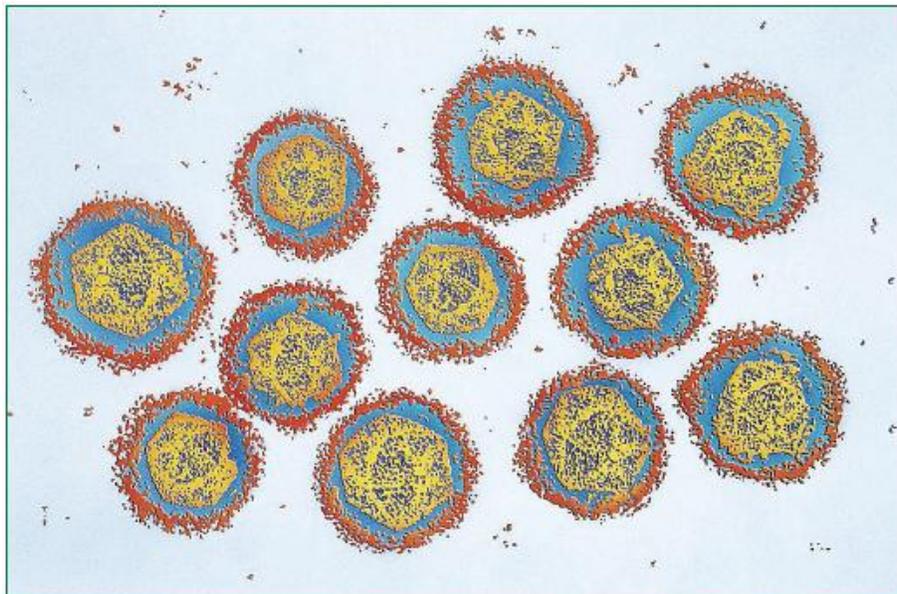


Figura 3. El virus dengue. Micrografía de transmisión electrónica con color aumentado. (Tomado de Rigou-Pérez 2006)

El virión maduro presenta tres proteínas estructurales, la proteína de cápside C, la proteína de membrana M, y la proteína de envoltura E. Múltiples copias de la proteína C (11kDa), encapsulan el genoma del virus de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva, para formar la nucleocápside viral de 30 a 35 nm de diámetro. La nucleocápside esta rodeada por una bicapa lipídica derivada de la célula hospedera, en la que 180 copias de las proteínas M y E están ancladas, su estructura es similar a la de otros Flavivirus, tiene forma esférica de 40 a 50 nm de diámetro. La proteína M es un pequeño fragmento proteolítico (aproximadamente de 8 kDa) de su forma precursora prM (aproximadamente 21kDa). La proteína E es de 53 kDa y tiene tres distintos dominios estructurales. El dominio I está estructuralmente posicionado entre el dominio II, el dominio de homodimerización, y el dominio III, tipo inmunoglobulina. Los análisis estructurales de los viriones maduros del DENV revelan que el virus posee una nucleocápside con organización icosaédrica y una envoltura esférica.

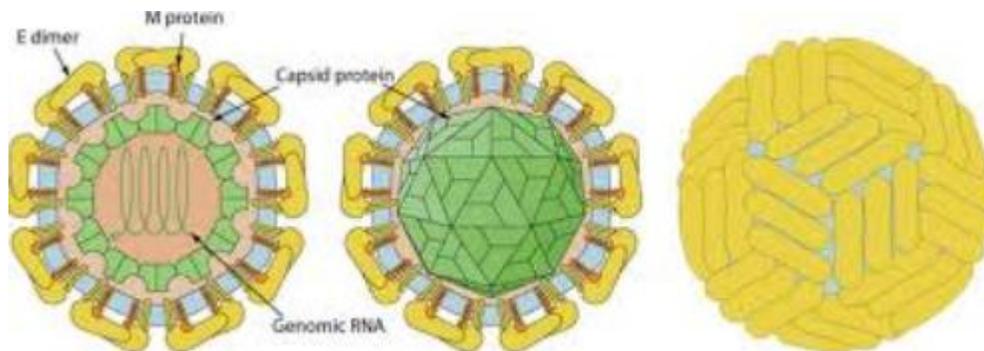


Figura 4. Estructura del virión. Representación de la conformación estructural de las partículas virales. En la figura se muestra la ubicación estructural de la proteína de la cápside (C), de la membrana (M) y de la envoltura (E), así como la organización superficial de la proteína E en dímeros. (Tomado de la base de datos “Viral pathogen resource”)

El genoma del virus es un RNA de cadena sencilla de aproximadamente de 11 kb que codifica para una poliproteína que presenta regiones cortas no traducibles 5' y 3', el RNA funciona como mensajero y codifica para 3 proteínas estructurales (cápside, pre-membrana y envoltura) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A,



NS4B and NS5) entre las que se encuentran las enzimas necesarias para su replicación. De las proteínas no estructurales del virus, las más caracterizadas son NS3, su cofactor NS2B, y NS5. NS3 contiene diferentes dominios (con funciones distintas, incluyendo una serin-proteasa, la cual requiere su cofactor NS2B. NS3 también presenta las funciones de trifosfatasa de nucleosidos y helicasa, necesarias para la síntesis del RNA viral; así como, actividad de 5' trifosfatasa. La proteína NS5 funciona como RNA polimerasa dependiente de RNA, así como, metiltransferasa. La glicoproteína NS1 se expresa en tres formas: La forma residente en el retículo endoplásmico, una forma anclada a la membrana y una forma soluble. En el diagnóstico de laboratorio del Dengue, es común la determinación de NS1 en el suero de los pacientes. NS1 está glicosilada en dos sitios, recientemente se ha demostrado que esta glicosilación es necesaria tanto durante la replicación del virus en células del mosquito como para la expresión de neurovirulencia en ratón **(8)**. La forma soluble de NS1 es otro blanco dominante para la inmunidad humoral y podría jugar un papel significativo en la patogénesis del DHF/SCHD. Las proteínas hidrofóbicas (que funcionan como co-factores de NS3) NS2A, NS4A y NA4B (cofactor de NS5) están menos caracterizadas. Recientemente se ha demostrado que son capaces de bloquear la transducción de señales mediadas por interferón. Mientras que las tres proteínas en combinación son más efectivas, NS4B, sola, es un potente inhibidor de la señalización del interferón β y γ (INF- β , INF- γ) **(9)**.

Se han identificado diferentes genotipos (virus altamente relacionados en la secuencia de nucleótidos) para cada serotipo, dando como resultado la amplia variabilidad genética de los tipos del DENV.

La RNA polimerasa dependiente de RNA viral, presenta baja fidelidad, por lo que, la incorporación de mutaciones dentro de las hebras de los RNAs progenie, acoplado con la ausencia de una segunda hebra para lectura de prueba (proofreading), resulta en la generación de una gran cantidad de especies de RNAs virales, denominadas quasi-especies. Debido a la existencia de quasi-especies, se ha planeado la asociación de la patogénesis viral al grado de diversidad de secuencias intra-hospedero o a secuencias

particulares. Actualmente se realizan esfuerzos de secuenciación a gran escala del RNA del DENV para intentar responder este planteamiento. (5-10)

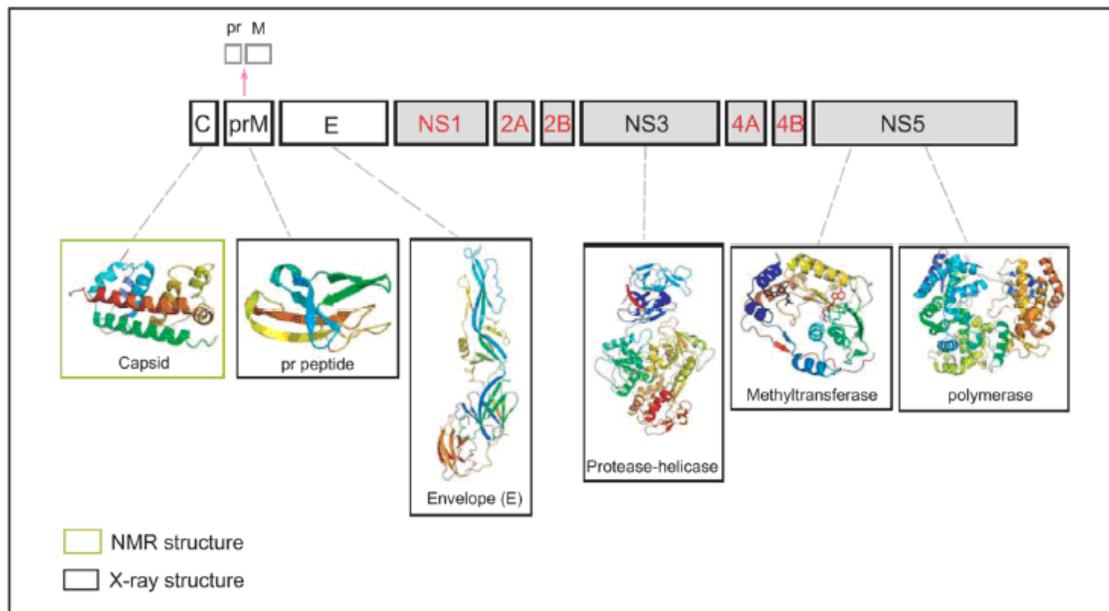


Figura 5. Diagrama esquemático del genoma y la poliproteína del virus dengue. El genoma viral es una cadena de RNA de polaridad positiva que contiene un cap en el extremo 5' pero carece de una cola de poliA en el extremo 3'. Las proteínas estructurales están codificadas en el extremo 5' seguidas de las proteínas no estructurales. (Tomado de Rushika and Richard J. Kuhn 2008)

Ciclo de replicación viral

El ciclo de vida intracelular de los Flavivirus es muy similar. La infección con un Flavivirus transmitido por artrópodos inicia cuando el vector se alimenta de sangre y el virus se transmite al hospedero. Durante la infección natural, las células del linaje mononuclear-fagocítico (monocitos, macrófagos y células dendríticas), incluyendo las células de Langerhans residentes de la piel, son los blancos primarios durante la infección por DENV. Aunque actualmente existe controversia en referencia del tipo de células que sirven como blanco primario del DENV en humanos. En insectos, se ha encontrado que la infección por DENV inicia en el intestino medio, a partir del cual se propaga y se replica en varios compartimentos y órganos. *In vitro* se ha mostrado que el DENV es capaz de infectar varios tipos de células humanas incluidas las células dendríticas, monocitos/macrófagos, células B, células T, células endoteliales, hepatocitos, células neuronales y recientemente células del músculo esquelético y



cardiaco (*in vivo*) **(13)**; así como varias líneas celulares utilizadas para su propagación **(12)**, incluidas las líneas celulares humanas (K562, U937, THP-1, HepG2, HUVEC, ECV304, Raji, HSB-2, Jurkat, LoVo, KU812), de mosquito (C6/36), de mono (Vero, BS-C-1, CV-1, LLC-MK2), de hámster (BHK), así como de macrófagos de murino (Raw, P388D1, J774). El amplio rango de células permisivas para el DENV indica que el virus debe unirse a una molécula de superficie celular ubicua, internalizarse mediante un complejo del receptor ó utilizar múltiples receptores durante la infección celular **(14)**.

Sin embargo, no se ha caracterizado un receptor específico. Recientemente se han hecho esfuerzos significativos por caracterizar los receptores celulares utilizados por el DENV. Se han propuesto diferentes receptores y co-receptores en células de en mamífero, incluido el heparán sulfato, la proteína del choque térmico 70 (Hsp 70, por sus siglas en inglés) y Hsp90; CD14, así como, la mejor caracterizada, DC-SIGN entre otros **(15)**.

Se sugiere que el DENV a nivel de la superficie celular interacciona con diferentes receptores, un receptor ubicuo de baja afinidad como DC-SING, que inicialmente captura el virus en la superficie celular, incrementando su concentración local y otro de alta afinidad que participa durante la internalización viral.

El virus interacciona y entra a una célula permisiva del hospedero mediante endocitosis mediada por receptor (Figura 6). Posterior de la internalización y acidificación del endosoma, la fusión de las membranas viral y vesicular permite la entrada de la nucleocápside al citoplasma y la liberación del genoma viral. Se conoce que el pH ácido del endosoma favorece la disociación de los homodímeros de la proteína E, lo cual permite la proyección al exterior del dominio II y la exposición del péptido de fusión hidrofóbico hacia la membrana. Subsecuentemente los dominios hidrofóbicos en el asa de fusión se insertan dentro de la región más exterior de la membrana blanco, desencadenando el ensamblaje de los trímeros de la proteína E. Después, se asume que el dominio III se modifica en su conformación y se dobla hacia el péptido de fusión en una conformación tipo horquilla. El mecanismo de repliegue podría forzar la membrana blanco y la membrana viral para dirigirse una hacia la otra y, eventualmente fusionarse, liberando la nucleocápside y el genoma viral dentro del citosol.



La traducción y replicación de las hebras positivas virales ocurren en asociación con estructuras membranosas intracelulares, específicamente el genoma del DENV es traducido en asociación con la membrana derivada del retículo endoplásmico. La estructura del genoma es similar a la del RNA mensajero celular, contiene una estructura tipo 5' 7-metil-guanosina (cap), una región 5' sin traducir (UTR), un marco único de lectura y una región 3'UTR; Sin embargo, a diferencia de los mensajeros celulares, no está poli-adenilado. La ausencia de una cola de poli A, implica que este virus no utiliza el mismo mecanismo de traducción que el mRNA mensajero. Además, se ha demostrado que la traducción de los Flavivirus ocurre bajo circunstancias que inhiben la traducción celular. La habilidad de los Flavivirus para la traducción de su genoma bajo diferentes condiciones, refleja la adaptación a las respuestas antivirales celulares, o a diferentes tipos celulares que contienen diferentes niveles de factores de traducción. Se conoce que diferentes cepas de DENV difieren en habilidades para replicarse en diferentes tipos celulares.

Una vez que el RNA viral recluta la maquinaria de traducción, la transición del inicio de la traducción a la elongación debe ocurrir cuando la subunidad pequeña ribosomal se ha colocado al inicio de la región 5'. Inicia la traducción del genoma con un intermediario de RNA de polaridad negativa, que sirve como templado para la producción de múltiples copias de RNA de polaridad positiva. Las moléculas de RNA son transcritas en una sola poliproteína, la cual es procesada post-traduccionalmente tanto por proteasas celulares como del virus. Rondas sucesivas de traducción producen niveles elevados de proteínas virales. Las proteínas estructurales junto con el genoma viral se ensamblan para formar nuevos viriones, los cuales son transportados a través de los compartimentos del aparato de Golgi y finalmente secretados. **(8-12)**

Después de la traducción y el plegamiento de las proteínas, las proteínas no estructurales inician la replicación del genoma viral. El nuevo RNA sintetizado es, subsecuentemente, empaquetado por la proteína C para formar la nucleocápside. La proteína prM y la proteína E forman heterodímeros que son orientados dentro de la luz del retículo endoplásmico. Las partículas inmaduras formadas en el retículo endoplásmico, maduran mientras viajan a través de la vía secretoria.

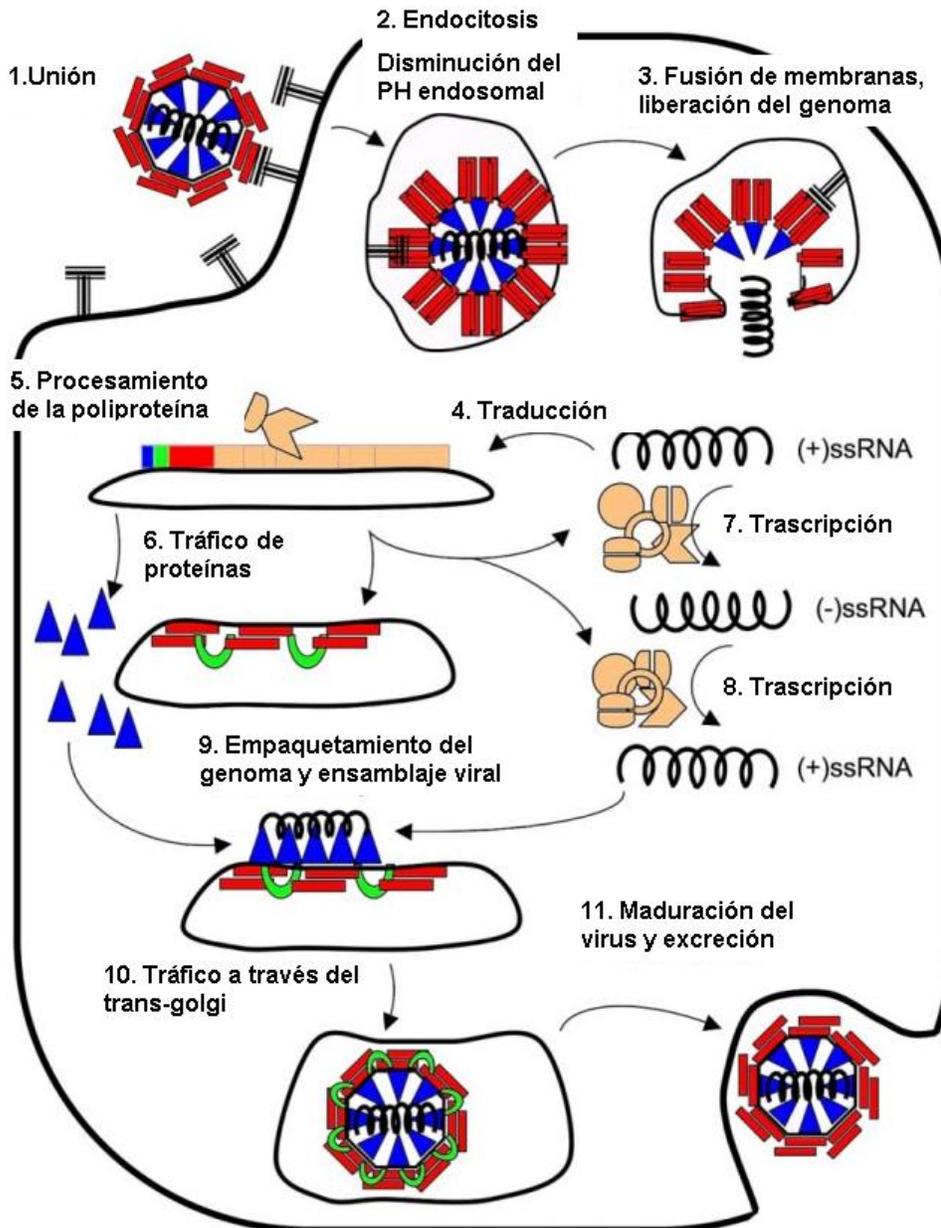


Figura 6. Esquema del ciclo de replicación viral. El virus se une a receptores celulares de alta afinidad que concentran las partículas virales en la superficie, un receptor de alta afinidad es el encargado de internalizar el virus a través de endocitosis mediada por receptores. La disminución del pH endosomal permite la fusión de las membranas y la liberación del genoma, se lleva a cabo la traducción del RNA viral y el procesamiento de la poliproteína. Se traduce el genoma a través de un intermediario antisentido. Se ensambla la partícula viral y se excreta a través del tráfico del aparato de golgi. (Adaptado de Watowich 2010)

TRANSMISIÓN DEL DENV

El virus Dengue tiene un ciclo de hospederos de humano-mosquito, mosquito-humano, en donde el humano actúa como hospedero y reservorio para el virus y el mosquito es el principal y extremadamente eficiente vector (Figura 7). El hospedero inicial para el virus es el humano. Cuando una hembra de mosquitos del género *Aedes* (*Aegypti*, *Albopictus*) se alimenta de un humano infectado, adquiere al virus. El DENV se replica dentro del mosquito y durante una nueva alimentación el mosquito transmite el virus a otros humanos por el resto de su vida (por lo cual es altamente eficiente).

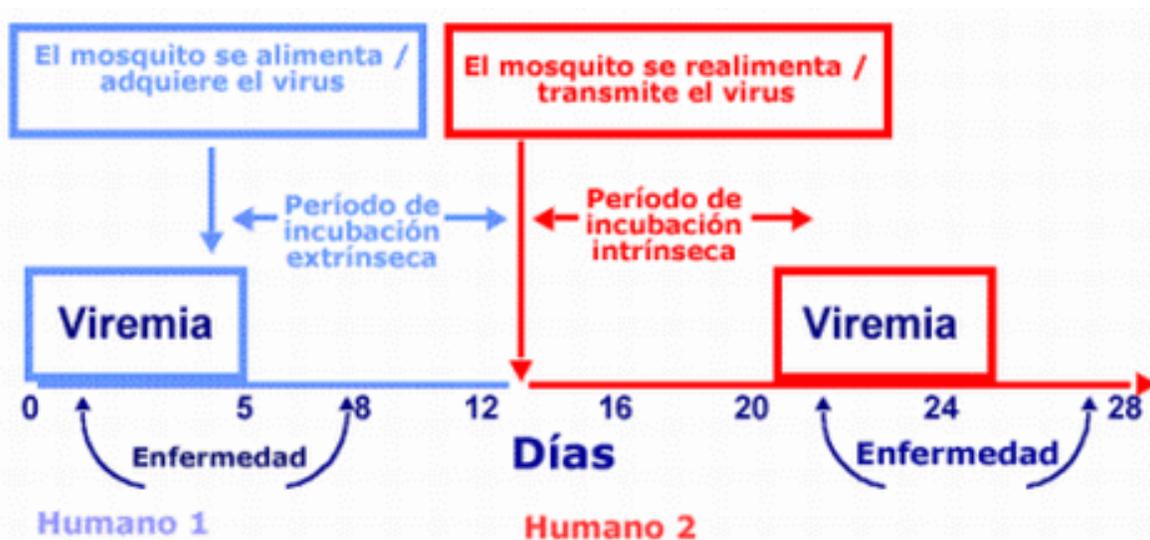


Figura 7. Esquema del ciclo de transmisión del virus. La transmisión se lleva a cabo a través de la picadura del mosquito siguiendo un ciclo de hospederos humano-mosquito-humano. (Tomado del Center for Disease Control (CDC))

El DENV es transmitido a las personas necesariamente por los mosquitos vectores, los cuales se presentan en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Los síntomas de la infección, usualmente, inician entre los 4 y 7 días posteriores a la picadura del mosquito y terminan aproximadamente en 10 días. Para que la transmisión ocurra, el mosquito debe alimentarse de una persona virémica, cuando existe una gran concentración de virus en la sangre; este periodo usualmente inicia un poco antes de que comiencen los síntomas. Algunas personas (el 95% de los casos) nunca presentan

síntomas significativos (asintomáticos). Pero el 5% de las personas manifiestan las formas graves de la enfermedad.



Figura 8. El mosquito vector. El vector primario para la transmisión del virus dengue al humano, son los mosquitos del género *Aedes*, principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus*. (Tomado del Center for Disease Control (CDC))

En casos raros, el DENV puede ser transmitido en trasplantes de órganos o sangre provenientes de donadores infectados, asimismo, existe evidencia de transmisión viral de una mujer embarazada a su feto. Pero en la gran mayoría de las ocasiones, la transmisión viral se lleva a cabo mediante la picadura del mosquito.

En los trópicos y sub-trópicos, el dengue es endémico y ocurre cada año, usualmente durante la temporada en la que la población de los mosquitos *Aedes* es alta, frecuentemente cuando la lluvia favorece su reproducción. Las epidemias de dengue requieren una coincidencia de una elevada densidad del vector, un gran número de personas sin inmunidad a uno de los cuatro serotipos y la circulación de los serotipos virales. **(16)**



MANIFESTACIONES CLÍNICAS DEL DENGUE

El dengue tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, frecuentemente con evolución clínica y resultados impredecibles. Mientras que la mayoría de los pacientes se recuperan (90-95% de los casos) siguiendo un curso clínico no severo auto-limitado, una pequeña proporción (5-10% de los casos) progresa a una forma severa de la enfermedad, principalmente caracterizada por extravasación de plasma con o sin hemorragia (que es letal en el 20-40% de los casos). La rehidratación intravenosa es la terapia de elección; esta intervención puede reducir la tasa de letalidad a menos del 1% de los casos severos. El grupo que progresa de la forma no severa a la forma severa es difícil de definir, pero este es un problema importante ya que el tratamiento oportuno y adecuado puede prevenir el desarrollo de condiciones clínicas más severas ó la muerte.

Tanto el tratamiento, como la decisión del sitio en donde debe ser administrado este tratamiento (en una instalación de cuidado de la salud, o en casa) están influenciados por la clasificación del caso de dengue, agrupándose en tres categorías: Fiebre indiferenciada, fiebre por dengue (FD) y fiebre hemorrágica por dengue (FHD). FHD fue adicionalmente clasificada en cuatro grados de severidad, con los grados III y IV definidos como Síndrome de Choque por Dengue (SCD). Existen diferentes reportes referentes a las dificultades en el uso de esta clasificación ya que no llenan el estricto criterio de la FHD. Con base en lo anterior, la OMS actualmente modificó los criterios de clasificación en Dengue severo y no severo, aunque la clasificación en FD/FHD/SCD continua siendo ampliamente usada. Estudios dirigidos por la OMS, confirmaron que utilizando una serie de parámetros clínicos y/o de laboratorio se observa una clara diferencia entre los pacientes con dengue severo y con dengue no severo (Figura 9). Sin embargo, era conveniente dividir al extenso grupo de pacientes con dengue no severo en dos grupos: pacientes con signos de alarma y aquellos que no los tenían. Los criterios para el diagnostico de dengue (con o sin signos de alarma) y del dengue severo se presentan en la siguiente tabla extraída de la “Guía para el diagnostico, tratamiento, prevención y control del dengue” que emitió la OMS en el año 2009 (la más reciente).

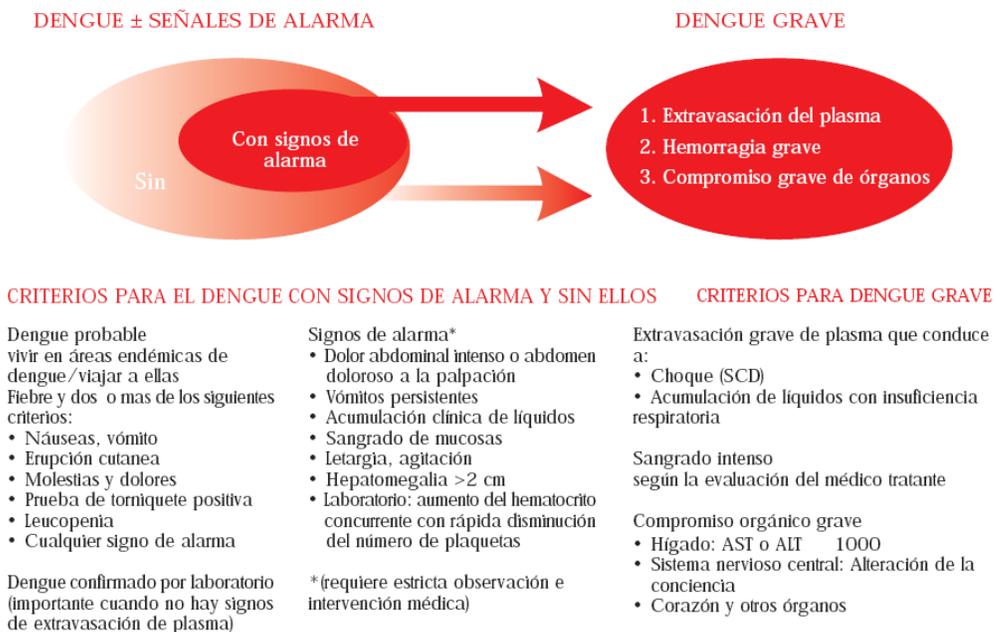


Figura 9. Criterios para el diagnóstico del dengue. La OMS sugiere la clasificación del dengue en dos grandes grupos: Dengue no severo, con o sin signos de alarma, y Dengue severo. (Tomado de la “Guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control del dengue” 2009)

Expertos concuerdan con que “El Dengue es una enfermedad con diferentes presentaciones clínicas y frecuentemente con resultados y evolución clínica impredecibles” La clasificación en niveles de severidad tiene un gran potencial para ser usada en el uso práctico de las decisiones de los clínicos, así como en reportes más consistentes para una sistema de vigilancia internacional, y como una medida final en las pruebas para vacunas y fármacos contra el dengue.

Curso de la enfermedad

Posterior al periodo de incubación del DENV en el humano, la enfermedad inicia abruptamente, presentándose tres fases: la fase febril, la crítica y la de recuperación.

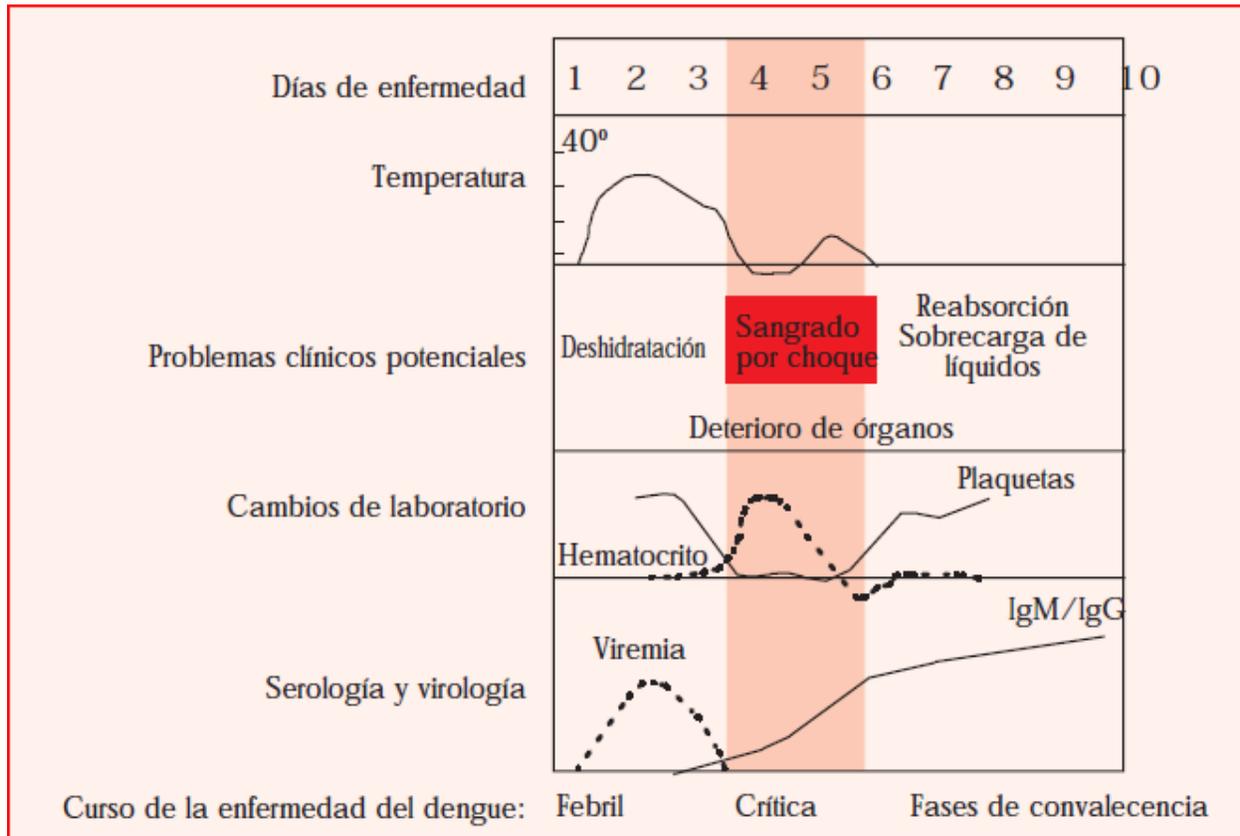


Figura 10. Curso de la enfermedad. Se reconocen tres fases en el curso de la enfermedad del Dengue: La fase febril, la crítica y la de convalecencia. (Tomado de la "Guía para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control del dengue" 2009)

El manejo del dengue severo (Síndrome de choque por dengue) es relativamente simple económico y muy eficiente salvando vidas, siempre y cuando exista un diagnóstico temprano y un tratamiento oportuno. La clave es el rápido reconocimiento y comprensión de las diferentes fases de la enfermedad, conduciendo a un acercamiento racional del manejo del caso y un buen resultado clínico.



FASE FEBRIL

Generalmente los pacientes desarrollan una fiebre repentina muy elevada. Esta fase febril aguda, usualmente, dura de 2 a 7 días y es frecuentemente acompañada de enrojecimiento facial, eritema cutáneo, dolor de cuerpo generalizado, mialgia, artralgia y dolor de cabeza. Algunos pacientes pueden presentar dolor de cabeza, anorexia, náusea y/o vómito. Puede ser difícil distinguir clínicamente entre el dengue y otras enfermedades febriles ó exantemáticas (como Sarampeón, Rubeóla, entre otras). Asimismo, estas manifestaciones clínicas son indistinguibles entre los casos de dengue severo y no severo. Por lo que, el monitoreo de los signos de alarma es crucial para reconocer la progresión a la fase crítica.

Manifestaciones hemorrágicas leves como petequias y sangrado de mucosas (por ejemplo, nariz o encías) deben también ser observadas. Un sangrado vaginal masivo (en mujeres en edad fértil) y sangrado gastrointestinal puede ocurrir durante esta fase pero no es común. El hígado suele agrandarse y volverse sensible después de pocos días de la fiebre.

FASE CRÍTICA

Durante la defervescencia, cuando la temperatura desciende de 38.5 a 37.5 ° C y de 37,5 o menos y se mantiene por debajo de este nivel, por lo general entre los días 3-7 de la enfermedad, puede presentarse abruptamente un aumento de la permeabilidad capilar en paralelo con el aumento de los niveles de hematocrito **(2,9)**. Esto marca el inicio de la fase crítica. El periodo clínicamente significativo de extravasación de plasma usualmente dura de 24 a 48 horas. Una leucopenia progresiva, seguida de una rápida disminución en la cuenta de plaquetas, usualmente precede a la extravasación de plasma. En este punto los pacientes sin incremento en la permeabilidad vascular mejoran, mientras aquellos con un incremento en la permeabilidad vascular, pueden progresar a Dengue severo como resultado de la pérdida del volumen plasmático. El grado de extravasación de plasma varía. El derrame pleural y la ascitis pueden ser clínicamente detectables dependiendo del grado de la extravasación y el volumen puede sustituirse mediante terapia con fluidos.



El grado en el incremento del hematocrito por arriba de los niveles basales, frecuentemente refleja la severidad de la extravasación plasmática. El choque hipovolémico ocurre cuando un volumen crítico de plasma se pierde en el espacio intersticial. Esto se manifiesta con signos de alarma. La temperatura del cuerpo puede estar disminuida cuando ocurre el choque. En choque prolongado, se presenta una hipoperfusión de órganos, resultando en insuficiencia de órganos, acidosis metabólica y coagulación intra-vascular diseminada. Esto a su vez favorece la instalación de una coagulopatía por consumo (manifestada por la presencia de hemorragias graves). La cuenta total de células blancas puede incrementar en pacientes con sangrado severo. Además el deterioro severo de los órganos, ocasiona manifestaciones graves como hepatitis, encefalitis o miocarditis, y/o sangrado severo, el cual se puede desarrollar sin la presencia de choque.

Los pacientes que mejoran pasando la etapa de defervescencia, generalmente presentan dengue no severo. Sin embargo, algunos pacientes progresan a la fase crítica con extravasación de plasma sin defervescencia. En estos pacientes, cambios en la cuenta completa de sangre podrían usarse para guiar el inicio de la fase crítica y la extravasación de plasma. Los pacientes que se deterioran, manifestarán signos de alarma. Esto se llama dengue con signos de alarma. Los casos de Dengue con signos de alarma, se pueden recuperar con rehidratación intravenosa temprana. Pero en algunos casos se progresará a Dengue severo (falla multi-orgánica y muerte).

FASE DE RECUPERACIÓN

Si el paciente sobrevive a las 24-48 horas de la fase crítica, se puede iniciar una reabsorción gradual de líquido extravascular en las siguientes 48-72 horas. En general los pacientes se recuperan y estabilizan su estado hemodinámico y diuresis. Algunos pueden presentar salpullido conocido como “islas blancas en el mar rojo” (Figura 11). Durante esta fase también se puede presentar prurito generalizado, bradicardia y cambios electrocardiográficos. El hematocrito se estabiliza o puede ser menor debido al efecto de dilución de los líquidos reabsorbidos. La cuenta de las células blancas usualmente aumenta, pero la recuperación de la cuenta de plaquetas es generalmente

tardía. Durante la fase crítica y/o de recuperación, la terapia excesiva de fluidos se asocia con edema pulmonar o insuficiencia cardiaca congestiva.



Figura 11. Manifestaciones hemorrágicas de la enfermedad. A) Típicas petequias en un infante con Dengue. B) Sangrado alrededor del sitio de inyección, común en los casos con Dengue. C) Hematoma en un paciente con Dengue Severo. D) Salpullido común que aparece después de una recuperación de una enfermedad aguda en un paciente adulto con Dengue.



DENGUE SEVERO

El Dengue severo es definido por una o más de las siguientes condiciones: (i) extravasación de plasma que puede llevar a choque por Dengue y/o acumulación de fluido con o sin dificultades respiratorias, y/o (ii) sangrado severo, y/o deterioro severo de órganos. Mientras la permeabilidad vascular del Dengue progresa, se agrava la hipovolemia que puede conducir a choque. Generalmente ocurre cerca de la defervescencia, durante el día 4 o 5 (en un rango de 3 a 7 días) de la enfermedad, precedida por signos de alarma. Durante la etapa inicial de choque hipovolémico, el mecanismo compensatorio, el cual mantiene una presión sanguínea sistólica normal, también produce taquicardia y vasoconstricción periférica con perfusión cutánea reducida, resultando en extremidades frías y retraso en el tiempo de llenado capilar. Únicamente la presión diastólica aumenta cerca de la presión sistólica y la presión del pulso se hace más estrecha mientras que la resistencia vascular periférica aumenta. Los pacientes en choque por Dengue frecuentemente permanecen conscientes y lúcidos. Finalmente hay una descompensación y ambas presiones desaparecen abruptamente. La presencia de choque hipotensivo prolongado e hipoxia pueden llevar a deterioro multiorgánico y un curso clínico extremadamente difícil. Se considera que el paciente presenta choque si la presión de pulso (diferencia entre las presiones sistólica y diastólica) es menor o igual a 20 mmHg en niños o si el paciente presenta signos de perfusión capilar pobre (extremidades frías, retraso del llenado capilar, o pulso rápido). En adultos la presión del pulso de menos de 20 mmHg puede indicar choque severo. La hipotensión está, generalmente, asociada con choque prolongado el cual frecuentemente se complica con la presencia de sangrado.

Los pacientes con Dengue severo pueden tener alteraciones en la coagulación, pero que no son suficientes para causar un sangrado mayor. Cuando ocurre un sangrado importante, generalmente se presenta choque profundo, mientras que esto en combinación con trombocitopenia, hipoxia y acidosis puede resultar en deterioro multiorgánico y coagulación intra-vascular diseminada. Si se ha ingerido ácido acetil salicílico, ibuprofeno o cortico-esteroides puede presentarse un sangrado profundo.



Las manifestaciones inusuales incluyen falla aguda del hígado y encefalopatía, incluso en ausencia de extravasación de plasma o choque. También se han reportado casos esporádicos de Dengue con cardiomiopatía y la encefalitis. Sin embargo, la mayoría de las muertes por Dengue ocurren en pacientes con choque severo, particularmente si la situación se complica por sobrecarga de líquidos. El Dengue severo puede ser considerado si el paciente es originario de un área endémica para Dengue, presentando fiebre de 2 a 7 días de evolución, más alguna de las siguientes manifestaciones:

- Evidencia de extravasación plasmática como:
 - Hematocrito alto o en aumento progresivo
 - Efusión pleural o ascitis
 - Compromiso circulatorio o choque (taquicardia, frío, extremidades húmedas, retraso en el tiempo de llenado capilar mayor a tres segundos, debilidad o pulso indetectable, estrechamiento en la presión del pulso o en choque tardío
- Sangrado importante
- Un nivel de consciencia alterado (letargia o inquietud, como, convulsiones)
- Implicación gastrointestinal severa (vómito persistente, incremento o intenso dolor abdominal, ictericia).
- Se presenta un severo deterioro orgánico (falla hepática aguda, falla renal aguda, encefalopatía o encefalitis, u otras manifestaciones inusuales, cardiomiopatía).**(1)**



PATOGÉNESIS

La patogénesis del Dengue es resultado de una compleja interacción de factores virales, epidemiológicos y del huésped. Los factores de riesgo asociados con el desarrollo de las formas severas de la enfermedad incluyen: la edad, el serotipo, el genotipo viral, la información genética del hospedero, alta densidad del vector, inmunidad previa, hiperendemicidad regional (más de un serotipo circulando en un brote), entre otros. Estudios retrospectivos y prospectivos en humanos han demostrado que una infección secundaria con un serotipo diferente al de la primoinfección, es un factor de riesgo importante para la instalación de las formas severas del Dengue, aunque se han descrito casos de Dengue severo en el curso de una infección primaria.

Un factor patognomónico del Dengue severo es la pérdida de la integridad del endotelio vascular (favoreciendo la presencia del choque). Se propone que los complejos del DENV con anticuerpos heterotípicos no neutralizantes favorecen la internalización viral en las células portadoras de receptores Fc (FcR), como monocitos, macrófagos y células dendríticas. El resultado de esto es una infección potenciada con producción elevada de carga viral, resultando en una activación celular con liberación de grandes cantidades tanto de citosinas pro-inflamatorias como de mediadores químicos (aminas vasoactivas), lo cual resulta en el daño a las células endoteliales con la subsecuente extravasación de plasma.

RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN

Inmunidad innata

La primera línea de defensa contra el DENV es la producción de interferones (IFNs). Como ya se mencionó anteriormente, el DENV infecta principalmente células dendríticas intersticiales, las cuales inducen la producción de INF γ . Se ha reportado que tanto el INF tipo I (α, β) como tipo II (γ) son cruciales para la protección contra la infección por DENV. Además de presentarse una activación temprana de las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés "natural killers"), siendo las principales



productoras de de INFy durante la clarificación viral. Las moléculas de INF secretadas, interaccionan con los receptores de INF presentes en las células del linaje mieloide activando la vía de señalización JAK/STAT que resulta en la expresión de más de 100 proteínas efectoras. Estas respuestas iniciales promueven la respuesta inmune adaptativa, a través tanto de la estimulación de células dendríticas como de la activación de células B y T. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que el DENV es capaz de inhibir la respuesta del INFy. En particular, se conoce que las proteínas virales NS2A, NS4A, NS4B y NS5, pueden bloquear la señalización de INF, reduciendo la activación de STAT **(13)**.

Respuesta inmune mediada por anticuerpos

La respuesta humoral humana se desarrolla en aproximadamente 6 días posterior a la picadura del mosquito. La respuesta mediada por anticuerpos esta principalmente dirigida contras las glicoproteínas E y M, presentes en la superficie del virus. También se generan anticuerpos contra NS1, ya que esta proteína además de ser expresada en la superficie de las células infectadas es secretada como un factor soluble.

Los anticuerpos pueden tanto neutralizar como potenciar la infección por el DENV, *in vivo* e *in vitro*, por lo tanto, los anticuerpos juegan un papel dual para controlar la infección viral. Asimismo, mediante estudios epidemiológicos se ha demostrado que en una infección secundaria con un serotipo heterólogo o infecciones primarias en niños que nacen con inmunidad de la madre contra el DENV, significativamente incrementan el riesgo a desarrollar la forma severa de la enfermedad. Estas observaciones clínicas han permitido la aceptación extensa de la hipótesis de la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE por sus siglas en inglés “antibody-dependent enhanced”) en el Dengue. Se propone que los anticuerpos específicos dirigen a las partículas virales a las células portadoras del FcR, como los monocitos, macrófagos y células dendríticas que son permisivas para la infección por DENV, resultando en una mayor carga viral y eventualmente en la potenciación de la enfermedad. La entrada del virus a la célula por



facilitación mediada por anticuerpos, suprime la respuesta inmune antiviral y promueve la producción de partículas virales.

Tormenta de citocinas

En estudios clínicos se ha demostrado que los niveles de citocinas y mediadores inmunes como TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, MCP-1 e IFN- γ , e IFN- α están significativamente incrementados en FHD/SCD.

Diferentes autores **(17-21)** proponen que en Dengue severo se puede presentar una tormenta de citocinas que puede ser inducida por la activación de un gran número de células T con baja avidéz y con reactividad cruzada al DENV, causando una activación inmune masiva. Específicamente la quimiocina IL-8, que es producida abundantemente por monocitos, células endoteliales y hepatocitos, esta sistemáticamente incrementada debido al daño en las células endoteliales del hígado. La activación del sistema de la coagulación, resulta en un incremento en la expresión de IL-6 e IL-8 por monocitos, mientras que la vía anticoagulante APC-PS desregula la producción de IL-8 por las células endoteliales. Mientras que TNF- α es un potenciador de la células endoteliales, aumentando la permeabilidad vascular. El TNF- α favorece el incremento en la expresión del Factor Tisular en monocitos y regula a la baja la expresión de Trombomodulina en las células endoteliales. También activa el sistema de la fibrinólisis; aumenta la expresión de oxido nítrico; e induce la muerte de células T.

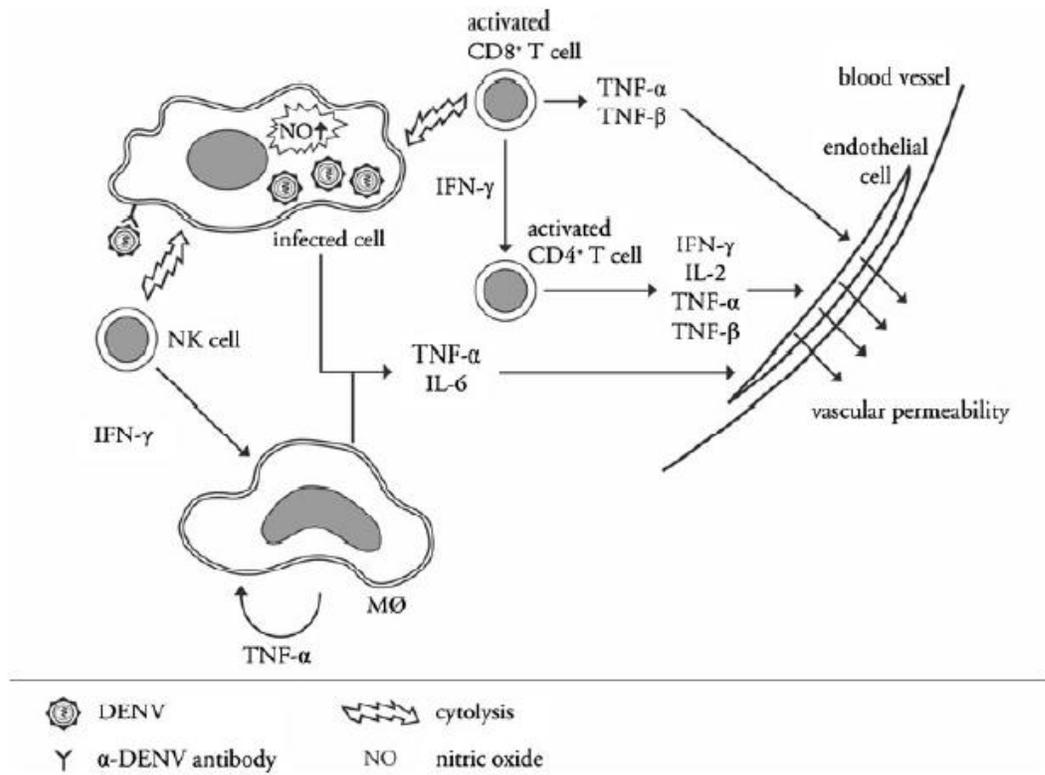


Figura 12. Modelo de la inmunopatogénesis del Dengue severo. Propuesta de un modelo integral de inmunopatogénesis, señalando el daño inducido por la respuesta inmune del huésped. (Tomado de Rodenhuis-Zybert 2010)

Una importante fuente de producción de citosinas pro-inflamatorias son las células monocíticas y los macrófagos, las cuales al igual que la respuesta inmune en general, juegan un papel dual durante la infección por DENV, ya que por un lado favorecen la eliminación viral por diferentes mecanismos: digestión y eliminación del DENV (fagocitosis), por secreción de citocinas que inhiben la replicación del DENV, presentación de antígenos del virus a células T y B para generar respuesta inmune específica, generación de respuesta tipo Th1 (expresión de IL-12 e INF-γ); Sin embargo, por otro lado, potencian la infección debido a la entrada del virus por



facilitación inmune, activando linfocitos T citotóxicos que pueden generar daño tisular, incrementando la permeabilidad, dando como resultado edema y choque hipovolémico.

Por otro lado, en relación a la activación de las células que participan en el sistema inmune y la expresión diferencial del glicocalix de las mismas, en 2009 François Trottein y colaboradores observaron que durante el proceso de diferenciación monocito-macrófago, monocito-dendrítica, la expresión de glicanos superficiales y de epítopes glicosiladas se modifica a nivel de la superficie celular. Específicamente, se ven incrementados los niveles de ácido siálico en su conformación α 2-6, evaluados mediante el reconocimiento por la lectina *Sambucus nigra*, así como, los niveles de las epítopes de sialil LewisX. Estos mismos autores mostraron que no sólo durante la diferenciación, sino que también durante la maduración de macrófagos y células dendríticas activadas con LPS se expresan transcritos para la biosíntesis de glicanos y glicosaminoglicanos de manera diferencial. La expresión de genes involucrados en la biosíntesis de glicanos fueron los que codifican para glicosiltransferasas (GT's) **(25)**. En la tabla I, se muestran los resultados obtenidos por este grupo, en donde se puede observar que existen diferencias en los marcadores superficiales de las células maduras y las células activadas con LPS en relación con las células no activadas (analizados mediante citometría de flujo).

Ags	Monocytes	DCs		Mφs	
	Medium	Medium	LPS	Medium	LPS
<i>Cell Markers</i>					
CD14	45.4 ± 4.8	1.4 ± 0.24	2.2 ± 0.58	3.2 ± 0.58	2.4 ± 0.51
CD1a	1.2 ± 0.5	451.6 ± 99.7	218.4 ± 53.8	1.8 ± 0.37	2 ± 0.55
CD209	1.25 ± 0.6	313 ± 42.7	172.3 ± 35.3	2.25 ± 0.63	2.75 ± 0.44
CD16	0.5 ± 1.1	1 ± 0.2	1 ± 0.3	30.5 ± 9.3	29 ± 10.01
RFD7	2.1 ± 0.1	0.6 ± 0.4	0.05 ± 0.1	31.3 ± 26.9	9.7 ± 2.5
CD80	5.7 ± 2.2	31.3 ± 5.7	183.5 ± 30.3	11.33 ± 2.7	76 ± 12.4
CD86	2.3 ± 0.9	8.71 ± 1.57	276.1 ± 35.05	17.3 ± 3.65	87.9 ± 21.25
HLA-DR	3.7 ± 1.1	80 ± 8.1	232.7 ± 21.9	66.5 ± 9.6	74.7 ± 13.5
CD83	0.9 ± 0.4	2.1 ± 0.85	22.5 ± 4.7	0.75 ± 0.48	1 ± 0.71
<i>Glycan Ag</i>					
Le ^X	5 ± 4.8	1 ± 0.8	0.5 ± 0.4	1.3 ± 0.6	2 ± 1
sLe ^X	53 ± 5	1509 ± 643	565 ± 181	621 ± 303	224 ± 128
Le ^a	3.5 ± 1.4	2.2 ± 1.4	1.8 ± 1.6	22.5 ± 17.5	24.3 ± 28.9
sLe ^a	1.2 ± 0.49	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2	1.7 ± 1.5	1.1 ± 0.9
Le ^b	1.25 ± 0.63	1.7 ± 1.5	2.7 ± 2.5	8.5 ± 5.5	5.7 ± 3.1
Le ^y	2.4 ± 1.4	5.7 ± 4.7	5.4 ± 2.9	21.8 ± 19.3	23.5 ± 19.6
SNA	577 ± 195	1514 ± 447	1756 ± 585	1531 ± 714	1422 ± 524
G _{M3}	4.2 ± 3	13.2 ± 4.2	19 ± 11	11 ± 6.2	23 ± 3.6
G _{D3}	0.17 ± 0.15	1.4 ± 0.8	0.8 ± 1.1	2.1 ± 2.2	3 ± 5.2

Tabla 1. Evaluación del fenotipo superficial de monocitos-macrófagos-células dendríticas durante los procesos de diferenciación y maduración. Se observa la modulación de glicanos de superficie durante la diferenciación de monocitos a macrófagos y células dendríticas, así como durante la activación con LPS. (Tomado de Trottein 2009)

De manera similar, Videira y colaboradores (2008), reportaron la modulación de glicanos superficiales, específicamente de ácido siálico, durante el proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas, así como durante la activación de los monocitos con citocinas pro-inflamatorias como TNF α , INF- γ e IL-1 β , y finalmente con la activación mediante un agonista como el LPS. En este ensayo la evaluación se llevó a cabo con lectinas de unión a glicanos *Sambucus nigra* (SNA) que reconoce ácido siálico α 2-6, *Mackia amurensis* (MAA) que reconoce ácido siálico α 2-3 y Peanut aglutinin(PNA) que reconoce O-glicanos asilados (26).

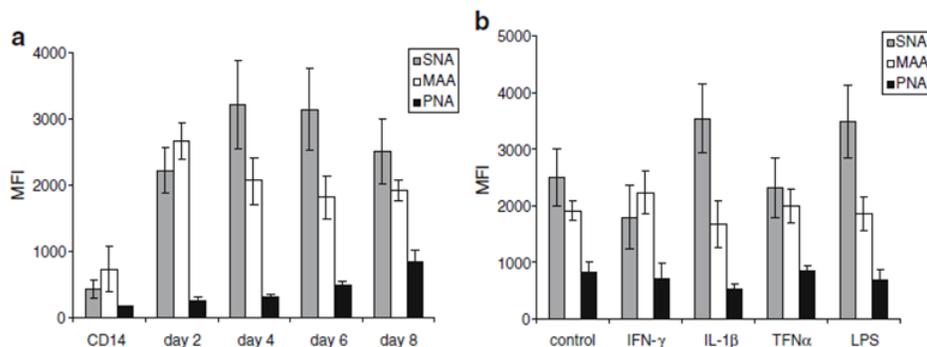


Figura 13. Expresión de ácido siálico superficial durante la diferenciación y maduración de las células dendríticas. Se observa la modulación de ácido siálico de superficie durante la diferenciación y activación de células dendríticas. (Tomado de Videira 2008)

En general, la glicosilación de proteínas juega un papel crucial en numerosos procesos biológicos, incluyendo la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. En condiciones fisiológicas, los azúcares ejercen diversas funciones en el sistema inmune: Son ligandos para proteínas que se unen a glicanos, o funcionando como moléculas de adhesión y lectinas que median la diferenciación celular, sobrevivencia, adhesión, y tráfico. Durante condiciones de estrés o infección, los glicanos también juegan un papel importante, desencadenando o controlando diferentes vías de señalización, migración, expansión y/o funciones efectoras de las células del sistema inmune.

Los carbohidratos expuestos en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC's), también juegan un papel crucial en diferentes aspectos de la respuesta inmune, ya que pueden participar durante la interacción huésped-patógeno, influyen en el tropismo y migración de patógenos, y modelan sus funciones biológicas después del contacto célula-célula. Por ejemplo, los azúcares toman parte en el dialogo cruzado entre las APC's y los linfocitos T para modular la intensidad y la calidad de la respuesta inmune adquirida. Además, de participar durante las interacciones de las APC's con las células del sistema inmune innato, incluyendo las células asesinas naturales que son apoyadas por interacciones entre receptores y moléculas portadoras de glicanos.



Se sabe también que la diferenciación y activación de las APC's, incluyendo monocitos y macrófagos, está acompañada de una remodelación programada de moléculas de la superficie celular (glicosilación) con consecuencias biológicamente importantes.

La biosíntesis de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos involucra la acción de diferentes glicosiltransferasas (GT's), que son las enzimas que catalizan la transferencia de motivos de azúcar a partir de moléculas donadoras activadas a moléculas aceptoras específicas, formando esqueletos glicosídicos. Las GT's se han clasificado en familias por sus similitudes en la secuencia de aminoácidos, y por el azúcar que utilizan como donador.

Los ácidos siálicos son un grupo de azúcares negativamente cargados, que usualmente aparecen en la región terminal de la estructura de carbohidratos de los glicoconjugados. Debido a su posición expuesta, los ácidos siálicos están involucrados en varios procesos biológicos que van desde la adhesión celular, la comunicación celular, las interacciones huésped-patógeno y la metástasis, así como durante la modulación de la respuesta inmune.

Recientemente, Sophie Groux-Degroote y colaboradores observaron (2008), que en la exposición de mucosa bronquial con interleucinas pro-inflamatorias, favorece la sobreexpresión de epítopes de Lewis X sializados, como modelo de estudio para pacientes con fibrosis quística, enfermedad en la cual la respuesta inmune/inflamatorio se encuentra exacerbada, las citocinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-8) aumentan la expresión de GT's y sulfotransferasas involucradas en la biosíntesis de epítopes de Lewis^x sializados o sulfatados en la mucosa bronquial humana **(28)**.

El incremento en la expresión de epítopes de Lewis X sializados en glicoproteínas bronquiales, después del tratamiento con citocinas, es relevante biológicamente, ya que este epítipo es un receptor preferencial para *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria responsable de la cronicidad de la infección de las vías respiratorias, involucrada en la mortalidad de pacientes con fibrosis quística.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Dengue constituye un problema importante de Salud Pública a nivel mundial, y actualmente no se cuenta con un antiviral ni con una vacuna efectiva contra el DENV, además de que no existe un modelo animal en el que se logre reproducir la enfermedad para su estudio *in vivo*. En trabajos previos de nuestro grupo, observamos la participación de moléculas sializadas durante las interacciones tempranas del DENV con células del mosquito *Aedes aegypti*. En el presente trabajo evaluamos la posible participación de estas moléculas en células humanas. Los monocitos humanos son células diana para el DENV, las cuales presentan este tipo de azúcares en su superficie. Así mismo, se sabe que durante la activación de los monocitos humanos se presenta una modificación de moléculas sializadas en la superficie celular del monocito (Videira 2008, Delannoy 2009). Asimismo, se ha descrito que la exposición de las células a citocinas pro-inflamatorias (IL-8, IL-6)) favorece la expresión superficial de epítopes sializados, como el antígeno sialilLewis X. En el presente estudio, nos propusimos evaluar la modulación de glicanos superficiales, tanto durante la infección de monocitos humanos por el DENV, como por la acción de las citocinas pro-inflamatorias IL-8 y TNF- α , las cuales juegan un papel importante en el Dengue severo.

Con base en lo anterior, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:



HIPÓTESIS

Durante la infección de monocitos humanos por el virus dengue se presenta una remodelación del glicocálix celular, lo cual puede ser importante durante las interacciones tempranas del virus dengue con los monocitos humanos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de glicanos de superficiales en monocitos humanos durante la infección por el virus dengue.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Obtención de monocitos humanos y establecimiento de cultivos primarios.
- ❖ Determinar los posibles cambios en la expresión de glicanos superficiales de las células infectadas en comparación con las no infectadas (mediante microscopia electrónica y citometría de flujo)
- ❖ Evaluar la participación de IL-8 y TNF- α (recombinantes), en la remodelación del glicolalix de los monocitos humanos.



MATERIALES Y MÉTODOS

1- MATERIAL BIOLÓGICO

Los monocitos humanos se obtuvieron a partir de paquetes de concentrados de sangre completa de donadores sanos del banco de sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” con la colaboración de la Doctora Mónica Viveros Rogel.

La cepa viral utilizada es un aislado prototipo del serotipo 2 llamada Nueva Guinea C (ya que se aisló de esta región), y se obtuvo del CDC (Center for Disease Control), Fort Collins, Colorado E.U.A.

1.1- Obtención de monocitos humanos a partir de sangre completa de donadores sanos.

De la sangre completa de donadores sanos (con serología negativa para los virus de inmunodeficiencia humana, VIH, Hepatitis B y C, y para VDRL, prueba serológica de los laboratorios de investigación de las enfermedades venéreas, Venereal Disease Research Laboratory por sus siglas en inglés) se separó el paquete celular del suero autólogo después de una centrifugación a 2500 rpm durante 30 minutos.

La obtención de las PBMC's (células mononucleares de sangre periférica, siglas en inglés) se llevó a cabo mediante centrifugación por gradiente de densidad. Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó un medio de separación de linfocitos: Lymphoprep, también conocido como Ficoll Hypaque, que es un polisacárido neutro hidrofílico de peso molecular alto, que se utiliza para separar a los componentes de la sangre (glóbulos blancos, glóbulos rojos o eritrocitos). El procedimiento que se realizó para separar a las PBMC's fue el siguiente: se partió de una muestra de sangre completa (se solicitó al banco de sangre del INCMNSZ un paquete o concentrado leucocitario) de un donador con resultados de serología negativa para el VIH, para los virus de



Hepatitis B y C y para la prueba de VDRL. La muestra de sangre completa se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos. Con una pipeta se separó el plasma, cuidando de no tomar células para no contaminar el plasma. El paquete celular restante se diluyó 1:2 con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS: Phosphate Buffer Solution por sus siglas en inglés) y se transfirió a un tubo para centrifuga de 50 mL con aproximadamente 15 ml de Ficoll en cada tubo. Sobre la capa de Ficoll se agregan lentamente de 25 a 30 ml de la suspensión 1:2 del paquete celular, por cada tubo, cuidando de no mezclar las fases. La mezcla se centrifugó durante 30 min 3300 rpm sin freno ni aceleración para que las fases se separen mejor. Después de la centrifugación en el Ficoll, se pueden observar las células mononucleares separadas en la interfase, en forma de una nata delgada de color blanco, la cual se separó y se transfirió con ayuda de una pipeta serológica o de una pipeta de transferencia a un tubo para centrifuga nuevo que contiene aproximadamente 30 ml de PBS para remover el exceso de ficoll. Las PBMC's se lavan con aproximadamente 40 ml de PBS 2 veces y se centrifugan 10 minutos a 2000 rpm en cada lavado. Finalmente se incubaron las células en 5 ml de una solución de lisis de eritrocitos durante 3 minutos en hielo con agitación constante, para eliminar los eritrocitos que quedaron. Al término de la incubación, se completó el volumen a 50 mL con PBS y se centrifugó la suspensión durante 5 min a 1500 rpm. Se decantó el sobrenadante para eliminar los restos de eritrocitos y de solución de lisis y se repitió 2 veces el lavado con PBS.

Las PBMC's se resuspenden y mantienen en medio RPMI suplementado con 20% de Suero Fetal Bovino, y 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (10 000 U/mL y 10 mg/mL respectivamente); en placas de 24 pozos, colocando 1mL de suspensión celular por pozo.

Después de 24 horas de cultivo, se separan los monocitos de las demás células mononucleares aprovechando su característica de adherencia, por lo que se lavan los pozos con PBS, dejando en cultivo los monocitos adheridos. Posteriormente, una vez que se requiera cosechar los monocitos, las células adheridas se remueven colocando las placas en hielo por aproximadamente 10 minutos, y mecánicamente mediante arrastradores de células. Las células se cuentan en cámara de Neubauer.



1. 2- Identificación de los monocitos aislados

Se evaluó la expresión de CD14 mediante citometría de flujo para determinar la pureza de las células adheridas, así como el tiempo de diferenciación de monocitos a macrófagos, y de esta manera definir a que tiempos era posible utilizar las células adheridas como mayoritariamente monocitos. Después de remover las células adheridas mecánicamente, se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 5 min, se lavan dos veces con PBS para retirar el exceso de paraformaldehído y se incubaron durante 2 horas con un anticuerpo monoclonal anti-CD14 acoplado a ficoeritrina (fluoróforo de excitación a 480 nm y de emisión a 578 nm); después de dos lavados, se evalúa la intensidad media de fluorescencia por citometría de flujo.

2- Evaluación de la infección de monocitos humanos.

2.1 Análisis de la infección por microscopia de fluorescencia

Se infectaron las células con multiplicidades de infección de 1 y 5 (a partir de un título de virus de 10^7 UFP/mL), se incubaron con el virus durante 24 horas y se realizó la inmunohistoquímica.

Para evaluar la infección de monocitos, se evaluó la presencia de la proteína E del DENV tanto dentro de las células como en la membrana de las mismas. Se desprendieron las células infectadas mecánicamente con gendarme, se fijaron con paraformaldehído al 2% 5 minutos, se lavaron, se permeabilizaron con tritón al 0.2% 10 minutos y después de lavaron nuevamente. Posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos con PBS-BSA (Albúmina sérica bovina, Bovine Serum Albumin, por sus siglas en inglés) al 2 % durante una hora a 37°C; se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti la proteína de envoltura del virus o anti-E hecho en ratón (Millipore, EUA), en dilución 1:300 en PBS durante 2 horas. Después de lavar 2 veces con PBS, se incubaron las muestras con el anticuerpo detector que es un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado con FITC (Isocianato de fluoresceína, fluoróforo de excitación a 490 nm y emisión a 514nm, Millipore) en dilución 1:300 en PBS y se lavaron. Finalmente, se



cubrieron las muestras con el medio de montaje fluorescente (Vectashield, Vector) y se examinaron al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse) equipado con el filtro para FITC. Las imágenes se tomaron con una apertura numérica de 1.3 y el objetivo de 60X.

2.2. Evaluación de la infección por DENV mediante Citometría de Flujo

Para determinar las mejores condiciones de infección de los monocitos humanos, se infectan dichas células con diferentes multiplicidades de infección (1, 5 y 10) y se analizaron a diferentes tiempos post-infección (8, 24, y 48 horas), tomando en cuenta reportes previos de infección de monocitos. Dichas condiciones se evaluaron mediante citometría de flujo, siguiendo el mismo protocolo que se utilizó para la inmunohistoquímica a excepción de la permeabilización con Tritón.

Las células se desprendieron mecánicamente, se fijaron con paraformaldehído al 2% 5 minutos. Se lavaron y posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos con PBS-BSA al 2% 1 hora a 37°C. El anticuerpo detector anti la proteína E del virus se utilizó en una dilución 1:1000, incubando durante 2 horas a temperatura ambiente, después de lavar, el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a FITC se utilizó en una dilución 1:300 en PBS, incubando 1 hora y media en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente las células se lavaron y se resuspendieron en medio de adquisición FACSFlow. Las muestras se analizaron en el Citómetro de flujo FACS Calibur (BD) utilizando el láser azul, detectando en el canal FL-1 para determinar la fluorescencia emitida por FITC, evaluando 10 000 eventos de la región elegida como monocitos.

FUNDAMENTO

Los fluorocromos o fluoróforos son moléculas que absorben luz a determinada longitud de onda y emiten a otra diferente. Se caracterizan por su espectro de excitación y de emisión por lo que su utilización está condicionada por el tipo de láser que disponga el citómetro. En la citometría de flujo, la intensidad de fluorescencia detectada por el citómetro es directamente proporcional al número de moléculas unidas al anticuerpo acoplado a fluorocromo.



3- Evaluación comparativa de glicanos de superficie.

3.1- Evaluación por microscopia electrónica de transmisión con tinción de Rojo de Rutenio

Se compararon los monocitos no infectados con los infectados al teñir los carbohidratos de superficie con rojo de rutenio (SIGMA), colorante positivo con alta afinidad a carbohidratos cargados negativamente, es decir, al ácido siálico, siguiendo el protocolo descrito por Martínez-Palomo en 1969. Se fijaron y se tiñeron las muestras con una solución de glutaraldehído al 2.5% y 50 mg/ml de rojo de rutenio en buffer de cacodilatos durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres enjuagues con buffer, se continuó la postfijación con tetraóxido de osmio al 4% más 50 mg/ml de rojo de rutenio durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad, nuevamente se realizaron tres enjuagues y se continuó con la deshidratación con etanol a concentraciones ascendentes (5 min en cada solución) de 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100%, ésta última por triplicado. Posteriormente se realizó la preinclusión con resina-óxido de propileno en mezcla 1:1 por 16 horas, por último se esperó a que se evaporara el óxido de propileno para incluir en resina, teniendo como resultado un bloque que se corta en laminillas con un microtomo y se evalúa al microscopio electrónico. Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM1010, a una apertura numérica de 1.5 y objetivos de 10 000, 25 000 y 120 000X.

3.2- Evaluación por citometría de flujo con lectinas de unión a glicanos.

Las lectinas acopladas a FITC utilizadas para evaluar epítopes glicosiladas son:

Tabla 2. Lectinas de unión a glicanos evaluadas

Lectina	Nombre científico	Carbohidrato que reconoce
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Acido siálico α 2-6
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	Acido siálico α 2-3
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Galactosa β 1-3 N-acetilgalactosamina
UEA	<i>Ulex europeus</i>	L-Fucosa expuesta

ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Manosas terminales
------	-----------------------------	--------------------

- ◆ Lectina de cacahuate (*Arachis hypogaeae*) PNA, la cual reconoce uniones galactosa β1-3 N-acetilgalactosamina, este disacárido usualmente se encuentra en la unidad *core* de los O-glicanos

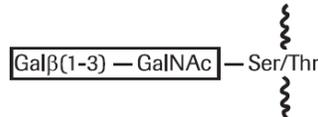


Figura 14. Ligando de unión a la lectina PNA. El disacárido galactosa β1-3 N-acetilgalactosamina se conoce como el core1 de los O-glicanos.

- ◆ Concanavalina A, la cual reconoce N-glicanos con gran cantidad de manosas terminales.

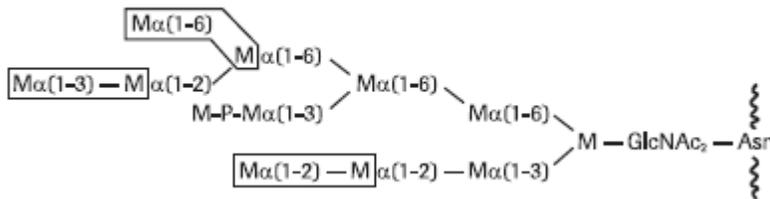


Figura 15. Ligando de unión a la lectina Concanavalina A. Las manosas terminales de los N-glicanos ricos en manosa, N-glicanos híbridos o en O-glicanos.

- ◆ UEA (*Ulex europaeus*), la cual reconoce fucosas expuestas.
- ◆ SNA (*Sambucus nigra*), que reconoce ácido siálico en su conformación α2-6

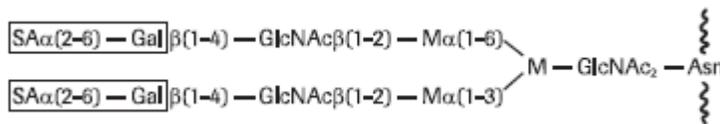


Figura 16. Ligando de unión a la lectinas SNA. Ácido siálico terminal unido α2-6 a galactosa o N-acetilgalactosamina.

- ◆ MMA (*Maackia amurensis*), que reconoce ácido siálico en su conformación α2-3.

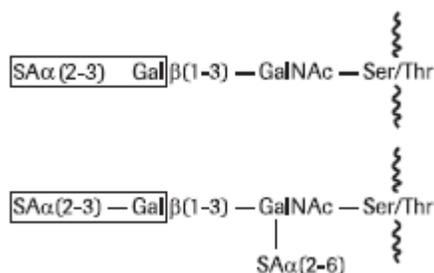


Figura 17. Ligando de unión a la lectinas MAA. Ácido siálico terminal unido α 2-3 a galactosa.

Las células (infectadas o no), se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 5 minutos, se lavaron para remover el exceso de paraformaldehído, posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos con PBS-BSA al 2% durante 30 minutos a 37°C y se incubaron con la lectina acoplada a FIT-C en dilución 1:100 durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad, finalmente se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio de adquisición para ser analizadas por citometría de flujo.

4- Evaluación comparativa de glicanos superficiales de monocitos estimulados con IL8 y TNF α .

Los monocitos aislados se incubaron durante 48 horas con las citocinas pro-inflamatorias IL-8 a 50 ng/mL y TNF α 100 pg/mL por separado, agregando dichas citocinas en el medio de cultivo.

Después de la incubación, se removieron las células mecánicamente y se analizaron los glicanos de superficie con las lectinas siguiendo el mismo protocolo que con las células infectadas.

Se comparó la intensidad media de fluorescencia de de las células estimuladas con las interleucinas con los controles sin estimular.

RESULTADOS

1- Aislamiento de monocitos humanos a partir de sangre periférica

Después de 24 horas de cultivo de las células mononucleares de sangre periférica, se separan los monocitos de las demás células aprovechando su característica de adherencia, por lo que se lavaron los pozos con PBS, las células adheridas se observan al microscopio óptico con morfología circular (Figura 18).



Figura 18. Monocitos de sangre periférica. Cultivo de monocitos primarios, vistos en microscopio de campo claro a 20X.

Posteriormente, se evaluó la expresión de CD14 por citometría de flujo para determinar la pureza de las células adheridas, así como, el tiempo de diferenciación de monocitos a macrófagos, y de esta manera definir a que tiempos era posible utilizar las células adheridas como mayoritariamente monocitos. Se determinó la región de monocitos, descartando los restos celulares, eligiendo y marcando la región a analizar en el citómetro como R1, a aquella región positiva a CD14 (Figura 19). Evaluando esta región, se encontró que hasta las 48 horas post-separación más del 95% de las células eran CD14 positivas, por lo que era el tiempo adecuado para utilizar los monocitos (Figura 20). Se analizaron 10 000 eventos de la región R1.

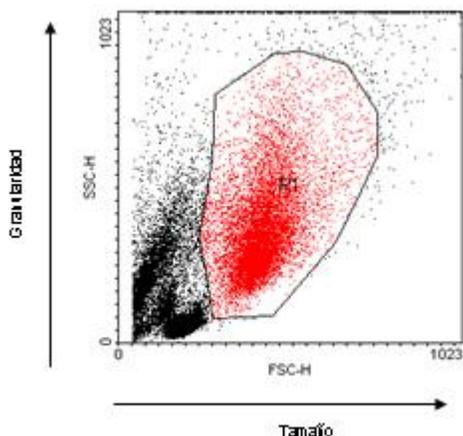


Figura 19. Dotplot de monocitos. Región seleccionada para la evaluación de monocitos, R1 en rojo, en un dotplot de tamaño (eje de las x) contra granularidad (eje de las y), en citómetro FacsCalibur.

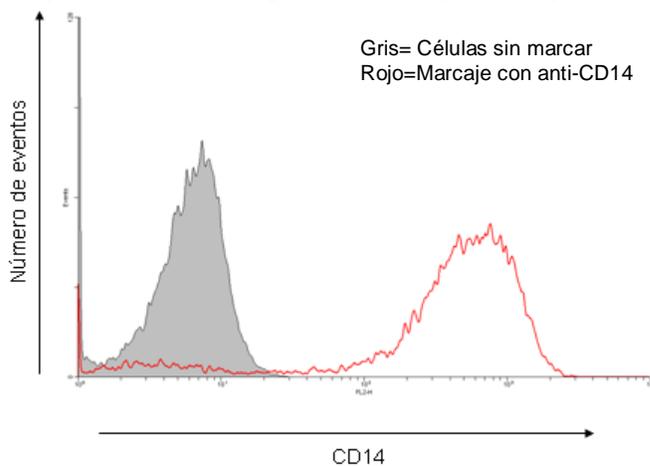


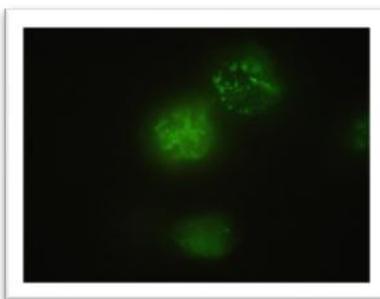
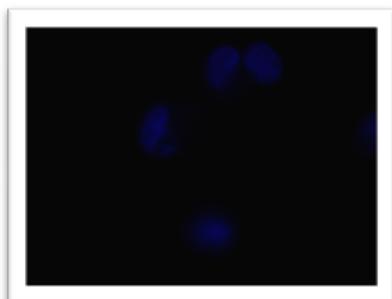
Figura 20. Evaluación de CD14. Histograma de evaluación de la expresión de CD14, en un cultivo de 48 horas post-separación. En citómetro FacsCalibur, 10 000 eventos de R1.

El método utilizado para aislar los monocitos, nos ofreció un 95% de células positivas para CD14, hasta 48 horas pos-separación. Por lo que, se utilizaron monocitos de 24 horas post-separación para evaluar la infección por el virus dengue.

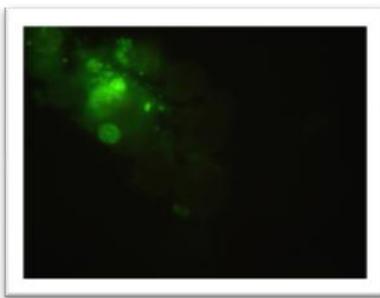
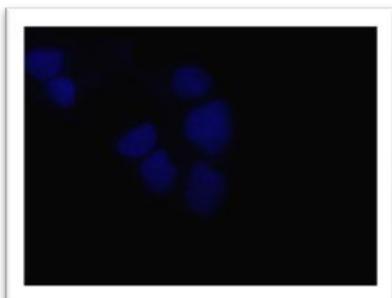
2- Evaluación de la infección de monocitos primarios por el virus dengue.

2.1. Evaluación por microscopia de fluorescencia

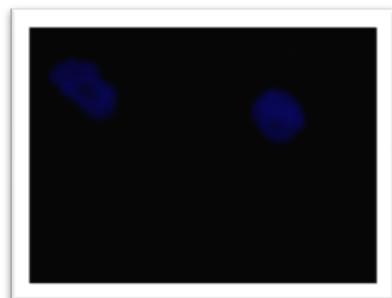
Se determinó si los monocitos primarios eran permisibles a la infección por el virus dengue serotipo 2 mediante microscopia de fluorescencia, detectando la proteína de envoltura del virus (E), tanto en la superficie como fuera de la célula. La infección se detectó 24 horas pos-inoculo a multiplicidades de infección de 1 y 5. En la figura 19 se puede observar la presencia de las proteínas virales tanto dentro como en la superficie de las células a las dos diferentes multiplicidades de infección utilizadas.



Expresión de la proteína E del DENV
en monocitos humanos m.o.i.=1



Expresión de la proteína E del DENV
en monocitos humanos m.o.i.=5



Control negativo

Figura 21. Evaluación de la infección de monocitos por el DENV2. Marcaje fluorescente de la proteína de envoltura (E) del virus dengue en células monocíticas de sangre periférica infectadas con el DENV 24 horas, a 1 y 5 MOI. Micrografías tomadas con Microscopio Olympus acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) con aumento de 20X

2.2. Evaluación por Citometría de Flujo

La evaluación cuantitativa de la infección se realizó mediante citometría de flujo, detectando de la proteína E del virus mediante un anticuerpo monoclonal anti-E y un anticuerpo detector secundario acoplado al fluoróforo FIT-C. La fluorescencia emitida es directamente proporcional al número de células infectadas.

Se evaluó la infección a multiplicidades de infección de 1, 5 y 10; también se evaluó la cinética de infección a 8,24 y 48 horas post-inoculo (Figura 22,23,24) Tomando en cuenta reportes previos de la infección en monocitos *in vitro* (23,24).

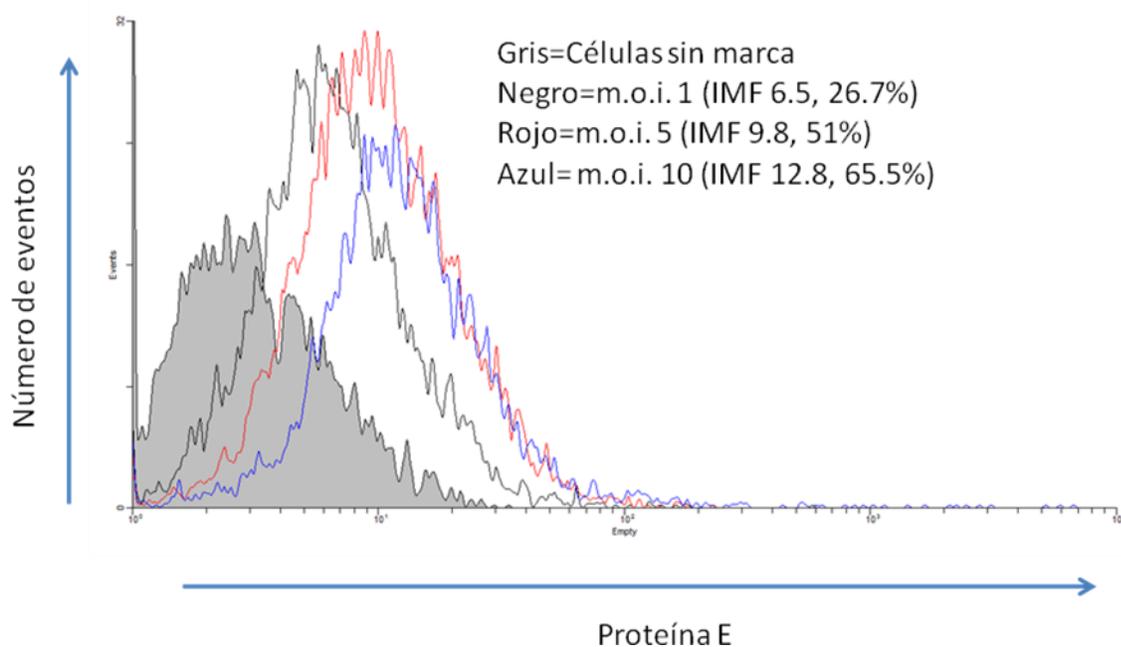


Figura 22. Evaluación de la infección de monocitos por el DENV2. Expresión superficial de la proteína E del DENV en monocitos humanos a diferentes multiplicidades de infección (1, 5 y 10) 24 horas post inoculo. Se muestra la intensidad media de fluorescencia y el porcentaje de células infectadas para cada caso.

El histograma de la figura 22 nos indica que la infección es dosis-dependiente, ya que, a mayor dosis de virus, es mayor la expresión de la proteína E en las células infectadas. Cabe mencionar que no en todas las células se detectó infección, en la multiplicidad de infección de 1, sólo se infectaron el 26.7% de las células evaluadas; mientras que a la multiplicidad de infección de 10 se infectaron el 65.5%. Por otro lado, el valor de la intensidad media de fluorescencia aumentó conforme aumento la dosis de virus inoculada al cultivo celular pasando de 6.5 a 12.8 en una escala logarítmica. Analizando los eventos positivos para la proteína E, también podemos observar que el valor de eventos positivos incrementa dependiendo de la dosis, Figura 23.

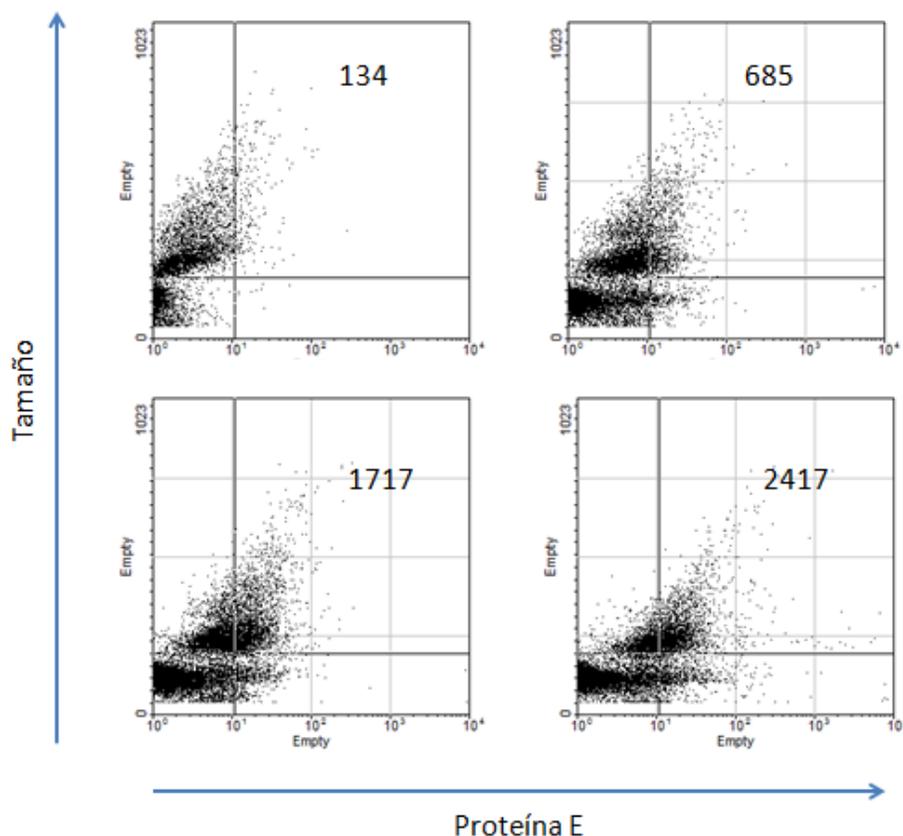


Figura 23. Análisis de los eventos positivos a la proteína E en la infección por el DENV. Expresión superficial de la proteína E del DENV en monocitos humanos a diferentes multiplicidades de infección (1, 5 y 10) 24 horas post inoculo. Se muestra el número de eventos positivos para cada caso. El Dot Plot superior izquierdo corresponde al control de células, el superior derecho a la m.o.i. de 1, el inferior izquierdo a la m.o.i. de 5 y finalmente el inferior derecho a la m.o.i. de 10.

La infección de monocitos primarios se evaluó mediante citometría de flujo, encontrando una respuesta dosis dependiente, el número de eventos positivos para la expresión de la proteína E aumenta cuando se aumenta la dosis de virus. A una multiplicidad de infección de 10, se observa que más del 65% de infección a las 24 horas pos-inoculo.

Posteriormente se evaluó la cinética de infección a 8, 24 y 48 horas pos-inoculo, encontrando una infección directamente proporcional al tiempo de exposición al virus, figura 24.

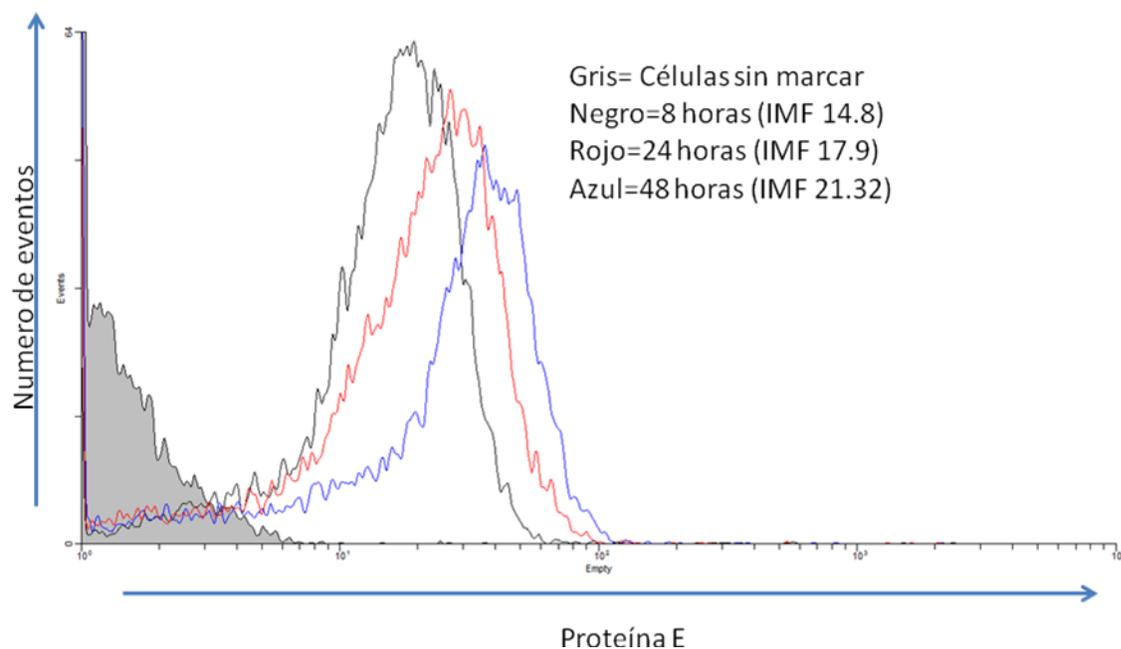


Figura 24. Evaluación de la cinética de infección de monocitos por el DENV2. Expresión superficial de la proteína E del DENV en monocitos humanos a diferentes tiempos postinoculo . Se muestra la intensidad media de fluorescencia para cada condición.

La intensidad media de fluorescencia en los monocitos aumentó conforme al tiempo de exposición del virus, en una escala logarítmica de 14.8 a 21.3 a las 8 y 48 horas respectivamente.



Se logró observar la infección de monocitos humanos, ya que al detectar la proteína E del virus expresada tanto en la membrana celular (ensayos mediante citometría), como dentro de la célula (ensayos de inmunohistoquímica), se puede deducir que el virus si se internaliza en monocitos humanos y además se replica de manera *in vitro*. Se obtuvo una respuesta dosis dependiente, así como dependiente del tiempo de infección.

Por lo que para observar el efecto que la infección por el virus pueda tener en los glicanos de la superficie de los monocitos, se evaluaron células infectadas a 48 horas pos-inoculo y a una multiplicidad de infección de 10.

3- Evaluación comparativa de glicanos de superficie

A. Evaluación por microscopia electrónica con tinción de Rojo de Rutenio

Se compararon los monocitos no infectados con los infectados al teñir los carbohidratos de superficie con rojo de rutenio, colorante positivo con afinidad a cargas negativas, específicamente al ácido siálico en la membrana plasmática. En la figura 25 se muestra el análisis de las muestras a 10 000, 25 000 y 120 000 aumentos.

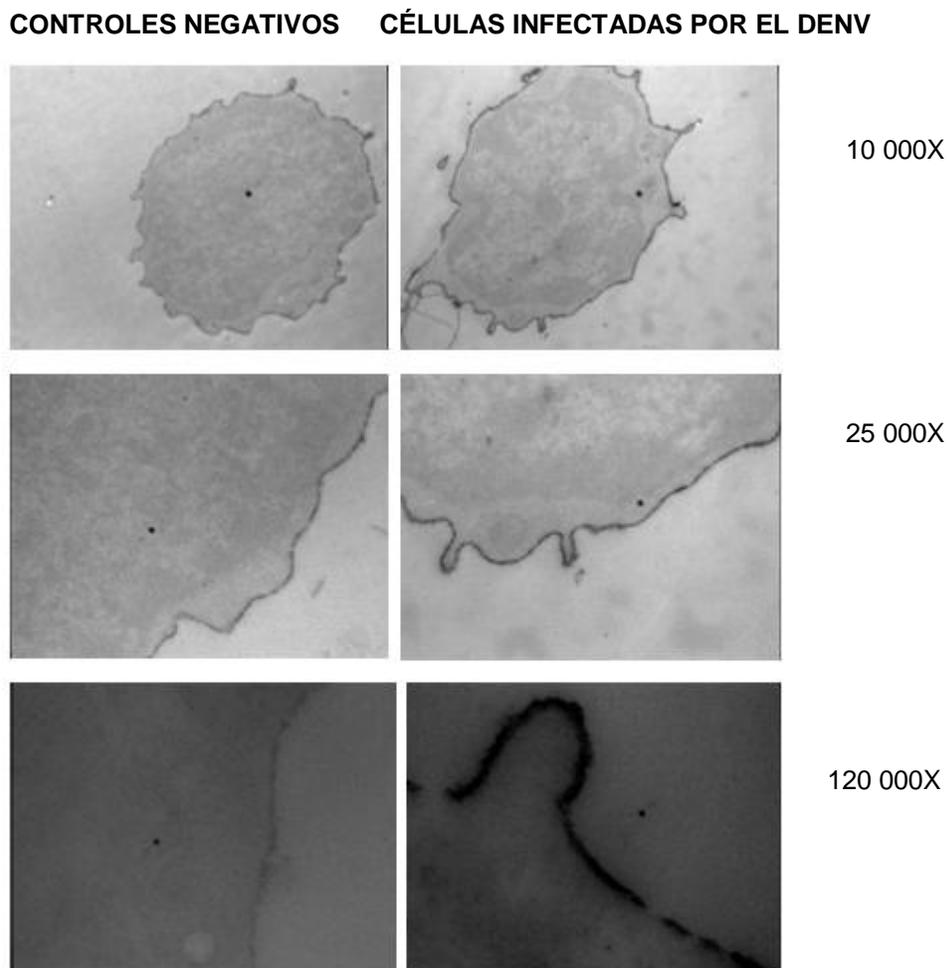


Figura 25. Evaluación comparativa de los glicanos de superficie. Micrografías de células infectadas con el DENV m.o.i 10 y 48 horas postinoculo, (derecha), y controles negativos de infección (izquierda). A 10000, 25 000 y 120 000 aumentos.

Observamos que la tinción se intensificó en las células infectadas con el virus dengue, lo cual nos habla de un incremento en la expresión de los glicanos de superficie al estimular las células con el virus, específicamente de glicanos con carga neta negativa, es decir, del ácido siálico.

Las imágenes nos muestran que el colorante utilizado es específico, ya que en las muestras analizadas no se observa ninguna de clase de acúmulos, ni ninguna otra estructura teñida. El colorante se distingue claramente por resaltar en la membrana celular, que es donde se localizan las cadenas de oligosacáridos ancladas a proteínas o



lípidos. Las muestras observadas a un aumento de 10 000X nos permiten observar la integridad de las células analizadas y la morfología ovalada de las mismas, por lo que podemos decir que la técnica utilizada nos las dañó. Se pueden distinguir algunas mitocondrias y el núcleo que ocupa una gran proporción del citoplasma celular.

En un aumento 25 000X se ve más claro como aumenta la intensidad del colorante en la membrana, además de que se logra observar como se delimita el núcleo muy cerca de la membrana. Sin embargo el aumento que nos permitió confirmar el aumento del ácido siálico en la membrana celular mas claramente, fue el de 120 000X, incluso podemos hablar de que el grosor de la capa de glicanos aumenta, ya que no sólo se distingue el aumento en la intensidad del colorante, si no también el aumento en el grosor de la estructura teñida.

Posteriormente se evaluaron glicanos específicos con ensayos de unión a lectinas.

B. Evaluación por citometría de flujo con lectinas de unión a glicanos.

Las lectinas utilizadas para evaluar epítopes glicosiladas son:

- Lectina de cacahuate (*Arachis hypogaeae*) PNA, la cual reconoce uniones galactosa β 1-3 N-acetilgalactosamina , este disacárido usualmente se encuentra en la unidad *core* de los O-glicanos
- Concanavalina A, la cual reconoce N-glicanos con gran cantidad de manosas terminales.
- UEA (*Ulex europaeus*), la cual reconoce fucosas expuestas.
- SNA (*Sambucus nigra*), que reconoce ácido siálico en su conformación α 2-6
- MMA (*Maackia amurensis*), que reconoce ácido siálico en su conformación α 2-3.

Se determinó la concentración a utilizar para cada una de las lectinas, utilizando diluciones 1:100 y 1:300, mediante citometría de flujo, en monocitos primarios. En la figura 26 se muestran los histogramas obtenidos para cada lectina en las dos diluciones utilizadas.

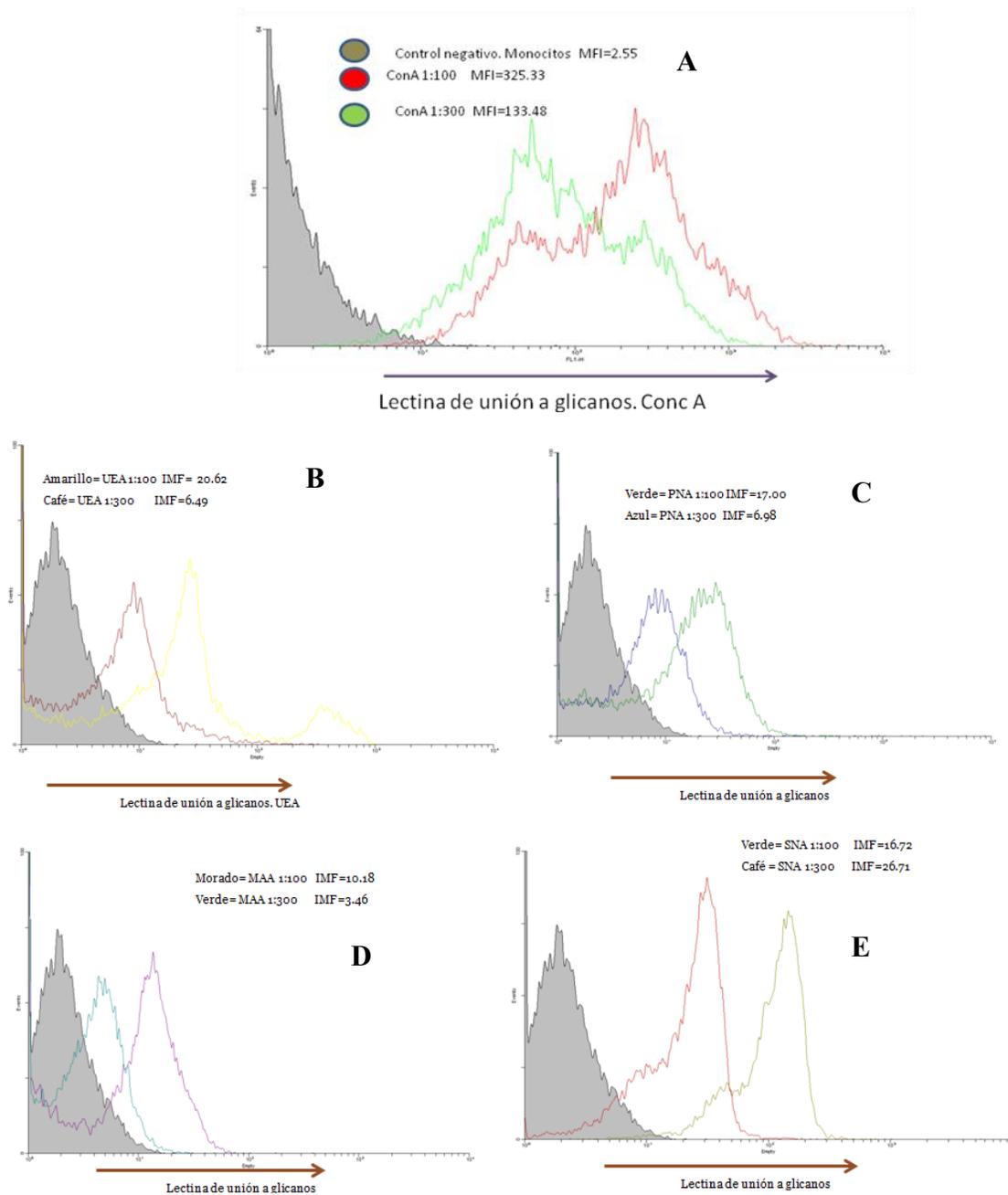


Figura 26. Lectinas de unión a glicanos. Evaluación de dos diferentes diluciones de cada una de las lectinas A)Concanavalina A, B)UEA, C)PNA, D)MAA, E)SNA.



Se evaluaron dos diferentes diluciones para el de cada lectina 1:100 y 1:300, se observó que al diluir más la lectina, ésta perdía su capacidad de reconocer glicanos superficiales, por lo que se decidió utilizar las lectinas en una dilución 1:100 (10 mg/mL).

Se evaluó la expresión de glicanos superficiales mediante el uso de lectinas acopladas a FIT-C, por lo que fue posible evaluarlas por citometría de flujo, se observó que los monocitos humanos expresan superficialmente manosas terminales (ConA), O-glicanos (PNA), fucosas terminales (UEA), y ácido siálico α 2-6 y α 2-3 (MAA y SNA). Lo cual nos habla de la gran variedad de glicanos superficiales que presentan estas células. También se puede observar que los monocitos humanos presentan manosa en gran cantidad y más ácido siálico α 2-6 que α 2-3, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura.

Ya teniendo las condiciones adecuadas, se comparó la expresión superficial de glicanos de las células infectadas con el virus dengue (48 h pos-inoculo m.o.i= 10) con las no infectadas de donadores sanos.

Se determinó la expresión de glicanos superficiales sólo de las células en las que se determinó la infección por citometría de flujo, ya que no se logró determinar la infección en las células de todos los donadores. Tabla 3.

Tabla 3. Determinación de la infección de monocitos primarios de donadores por el virus dengue. Se muestran los valores encontrados de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF). En amarillo se señalan las muestras positivas para infección.

DONADOR	BLANCO (IMF)	CONTROL NEGATIVO	
		(IMF)	INFECCIÓN (IMF)
119073	4.82	7.83	66.81
117586	2.28	7.41	20.82
X	2.71	7.91	11.76
Y	1.75	9.78	3.45
120712	1.86	12.98	8.82
120867	1.66	5.42	7.43
121130	2.29	11.6	28.87
121273	2.15	42.07	33.6
121431	1.97	46.77	17.17
Z	1.25	12.32	24.99
121762	1.11	5.3	10.46

121919	2.44	28.84	24.83
122219	1.35	1.91	1.88
122220	1.35	3.52	3.57
122294	1.15	5.55	6.77
I	1.78	2.13	2.62
122576	2.68	27.62	41.49
123522	2.35	7.54	7.29
123526	2.86	6	5.35
123729	3.52	2.28	2.52
J	2.98	6.75	11.49
124276	3.31	3.88	4.85

De los 22 donadores evaluados, sólo en 8 de ellos se logró encontrar infección por el virus dengue, es decir, sólo el 36% de los donadores fueron susceptibles ó permisibles a la infección por el virus dengue serotipo 2. Además, los niveles de infección en cada uno de los donadores difieren, como puede observarse en la intensidad media de fluorescencia y en la siguiente gráfica, figura 27. Las barras en rojo indican el valor de la intensidad media de fluorescencia dada por el marcaje de la proteína E en los monocitos infectados por el virus dengue.

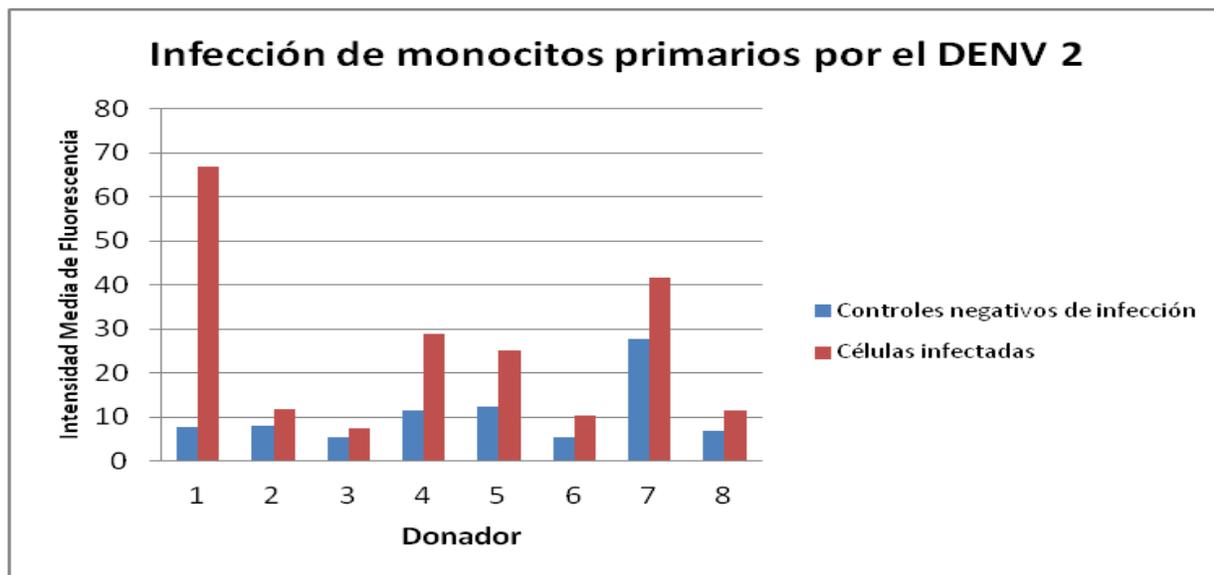


Figura 27. Infección de monocitos humanos de diferentes donadores por el DENV2. Niveles de infección de los ocho diferentes donadores donde se logró determinar la infección por el virus dengue

mediante citometría de flujo. La serie 1 (azul) muestra la IMF del control negativo, mientras que la serie 2 (rojo) muestra la IMF de infección.

A continuación se muestra la modulación de glicanos encontrada para uno de los donadores cuyos monocitos se infectaron con el virus dengue, como ejemplo de los histogramas encontrados para la determinación con el uso de lectinas por citometría de flujo.

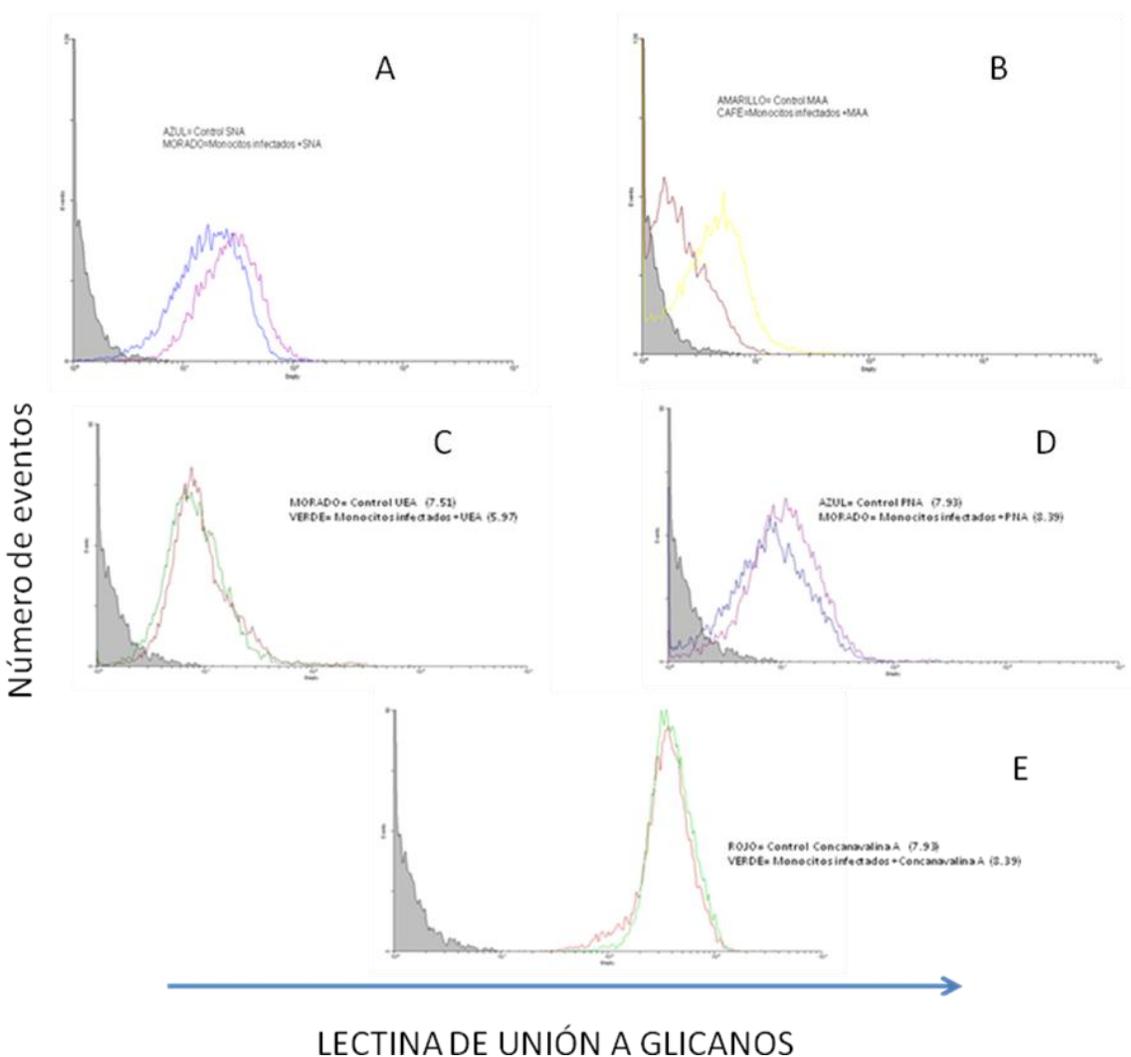


Figura 28. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue del donador 121762. Evaluación comparativa de Lectinas de unión a glicanos .A) SNA, lectina de unión a ácido siálico α 2-6. B) MAA, lectina de unión a ácido siálico α 2-3 .C). UEA lectina de unión a fucosa. D). PNA, lectina de unión a O-glicanos, E) Concanavalina A, lectina de unión a manosa.



Al evaluar los cambios en la expresión superficial de glicanos, se observa que las células infectadas tienden a aumentar los niveles de ácido siálico α 2-6, mientras que los niveles de ácido siálico α 2-3 disminuyen, además los niveles de fucosa, al igual que los niveles de expresión de O-glicanos y de manosa no se observa mucha diferencia entre las células infectadas y las no infectadas. En la Tabla 4 se muestran los resultados de la intensidad media de fluorescencia encontrada para cada lectina en las dos condiciones.

Tabla 4. Modulación de glicanos superficiales por la infección con el virus dengue. Se muestran los resultados de la intensidad media de fluorescencia para los controles (C) y las células incubadas con el virus 48 horas (48). En amarillo se señalan las muestras positivas a la infección.

DONADOR	CONTROL	SNA C	SNA 48	MAA C	MAA48	UEA C	UEA 48	PNA C	PNA 48	CONA C	CONA 48
121762	1.11	17.56	27.74	4.27	2.11						
121919	2.44	32.29	32.72	4.84	6.45	38.01	36.65	45.62	24.15	465.36	572.55
122219	1.35	7.6	11.23	1.63	1.58	6.33	3.07	3.02	3.99	240.44	367.9
122220	1.35	9.61	10.85	2.53	2.07	7.51	5.97	7.93	8.39	276.45	287.22
I	1.15	22.44	21.29	7.12	7.14	23.31	28.52	21.55	13.58	223.83	432.46
122576	2.68	17.42	29.26	19.3	21.44	90.58	43.69	24.54	23.66	620.07	485.09
123526	2.35	29.99	36.47	15.11	19.75	42.74	22.89	30.01	23.83	331.4	188.23
123729	3.52	44.86	30.94	7.05	5.21	21.59	9.42	10.81	7.66	259.98	210.41
J	2.98	19.6	26.83	8.55	13.64	11.63	15.24	44.81	49.1	207.38	340.64
124276	3.31	21.47	15	7.82	6.83	18.01	14.01	14.26	10.61	208.07	168.57

Los valores de intensidad media de fluorescencia encontrados para cada donador en los controles de células sin infectar, nos indican que las cantidades de glicanos superficiales varía en cada donador, podemos destacar que los valores para ácido siálico α 2-6 fluctúan entre 7 y 44, mientras que los de ácido siálico α 2-3 para todos los donadores son menores y fluctúan entre 1 y 19. Los valores de fucosa, sin embargo, son más variados desde 3 a 43, mientras que los de O-glicans desde 3 a 45. Es importante señalar que los valores de manosa son mucho más variados, tomando en cuenta que la escala utilizada es logarítmica, obteniendo valores desde 207 hasta 620.

De las muestras analizadas, sólo 3 se encontraron positivas para la infección por el virus dengue. En las figuras 29 a 33 se muestran los cambios ocurridos en los glicanos

de superficie cuando las células son infectadas. Las barras rojas muestran los valores de intensidad media de fluorescencia del marcaje de cada lectinas en los monocitos infectados.

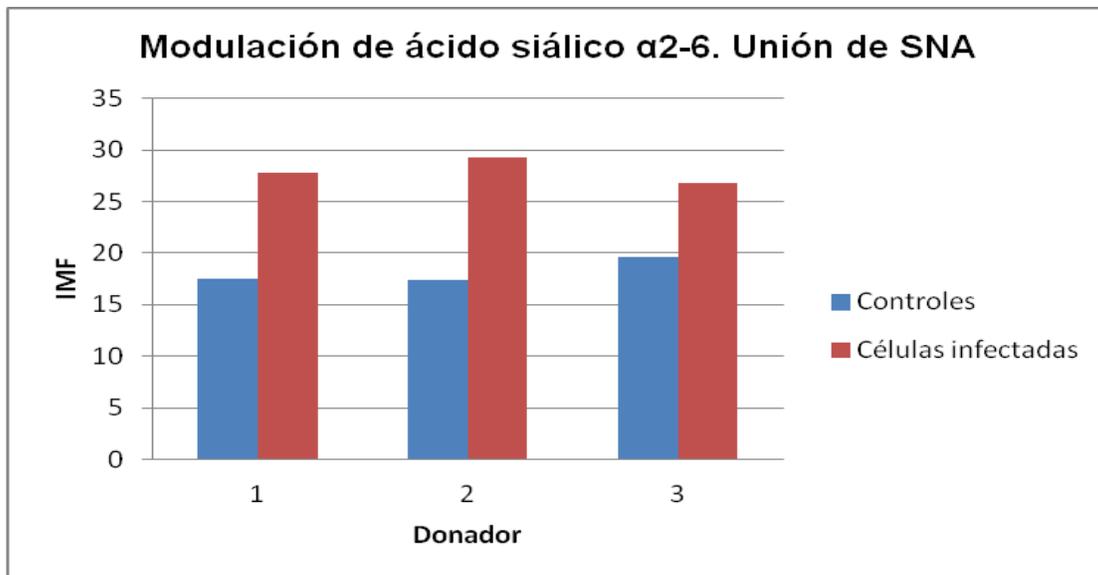


Figura 29. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue de tres donadores. Evaluación comparativa de la lectina SNA, lectina de unión a ácido siálico α 2-6.

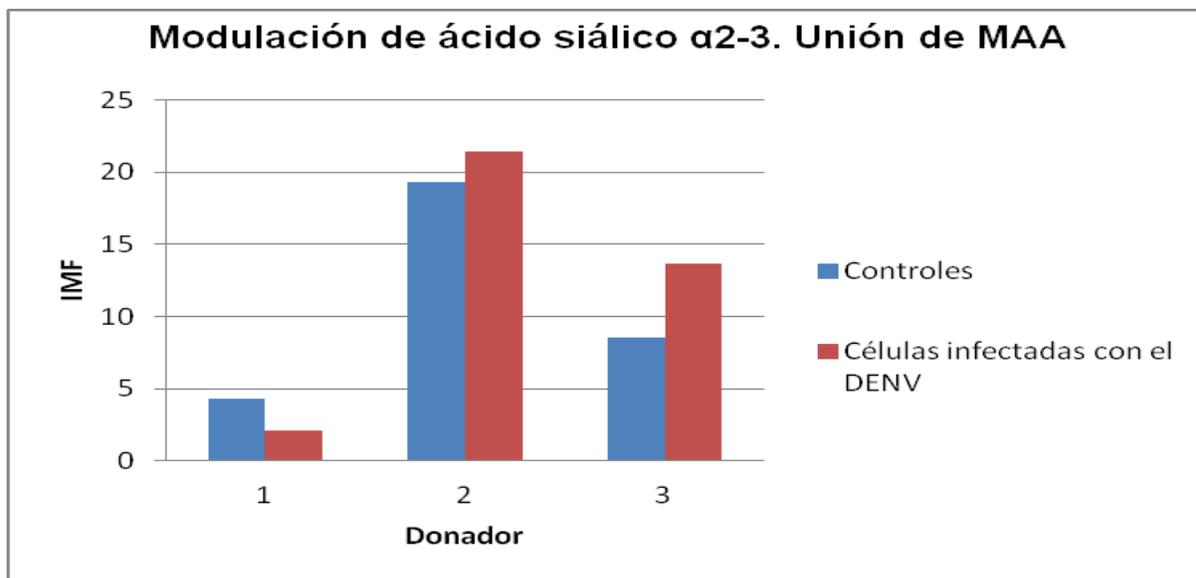


Figura 30. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue de tres donadores. Evaluación comparativa de la lectina MAA, lectina de unión a ácido siálico α 2-3.

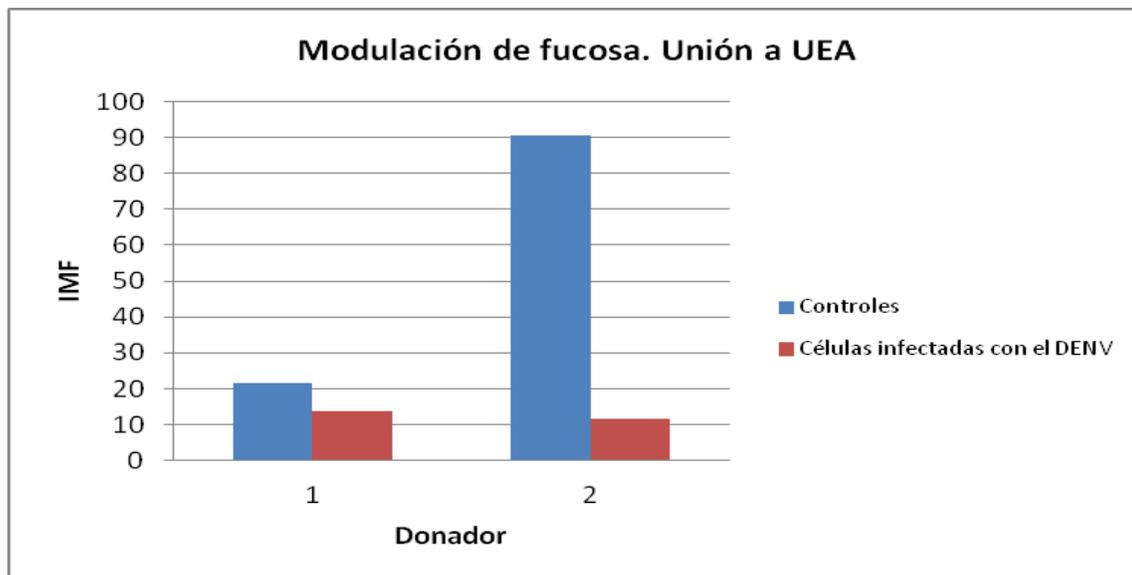


Figura 31. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue de dos donadores. Evaluación comparativa de la lectina UEA, lectina de unión a fucosa.

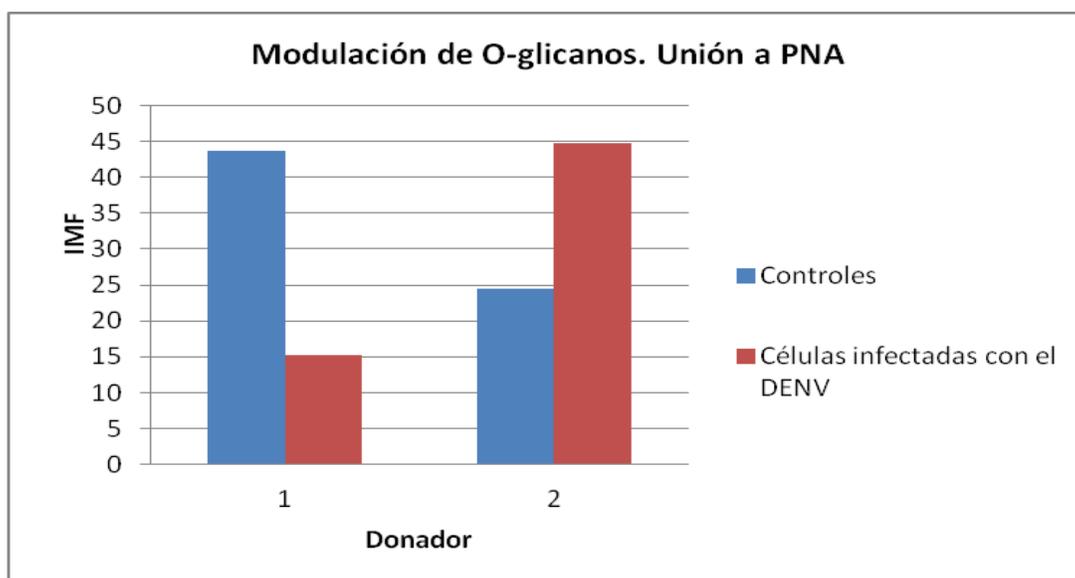


Figura 32. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue de dos donadores. Evaluación comparativa de la lectina PNA, lectina de unión a O-glicanos.

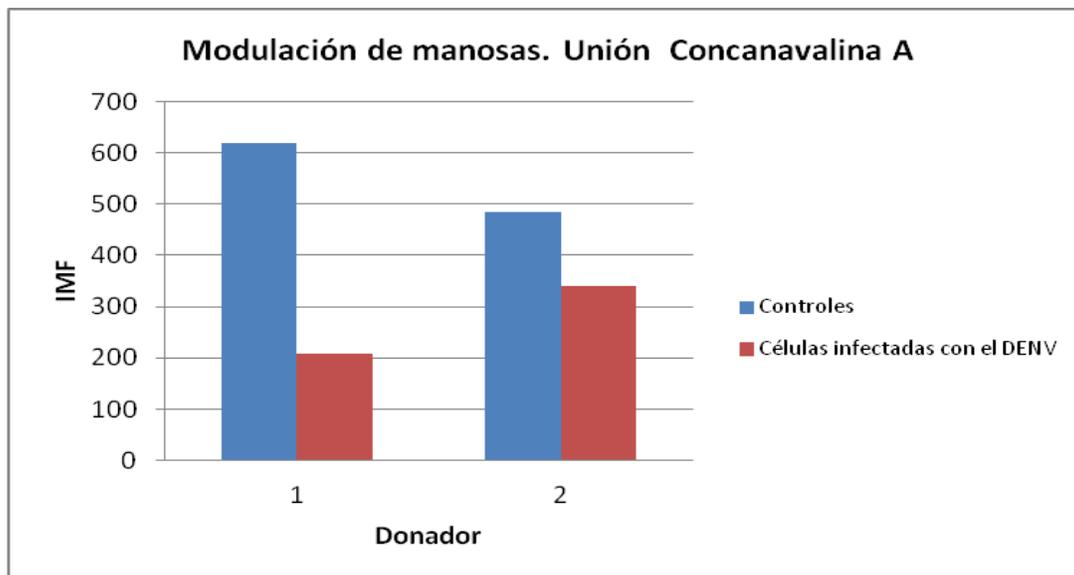


Figura 33. Evaluación diferencial de monocitos infectados y no infectados con el virus dengue de dos donadores. Evaluación comparativa de la lectina Concanavalina A, lectina de unión a manosas.

Se logra observar una clara tendencia de las células infectadas a incrementar los niveles de ácido siálico α 2-6. En cuanto a ácidos siálicos α 2-3, fucosa y manosa, se observa una tendencia a disminuir los niveles en las células infectadas y en cuanto a los niveles de los O-glicanos no se observa una tendencia clara.

4- Evaluación comparativa de glicanos superficiales de monocitos estimulados con IL8 y TNF α .

Finalmente se evaluó la modulación de glicanos de superficie por efecto de citocinas pro-inflamatorias, IL-8 y TNF- α , ya se ha reportado que las citocinas proinflamatorias modulan los glicanos de superficie (Videira 2008, Delannoy 2009). Por lo que nos dimos a la tarea de evaluar el efecto de estas dos citocinas en los glicanos de los monocitos primarios para comparar si el efecto observado en la infección está dado por el virus o por el contexto de la respuesta de secreción de citocinas.

Tabla 5. Modulación de glicanos superficiales por la estimulación con TNF α . Se muestran los resultados de la intensidad media de fluorescencia para los controles (C) y las células incubadas TNF α (48h).

DONADOR	CONTROL SNA	TNF α +SNA	CONTROL MAA	TNF α +MAA
123722	17.48	30.85	16.14	9.26
123726	17.07	30.57	7.91	7.47

Tabla 6. Modulación de glicanos superficiales por la estimulación con IL-8. Se muestran los resultados de la intensidad media de fluorescencia para los controles (C) y las células incubadas con IL-8 (48h).

DONADOR	CONTROL SNA	IL8+SNA	CONTROL MAA	IL8+MAA
125839	7.47	16.41		
126643	6.94	8.78	5.58	6.12
126653	7.79	10.33	4.64	6.31

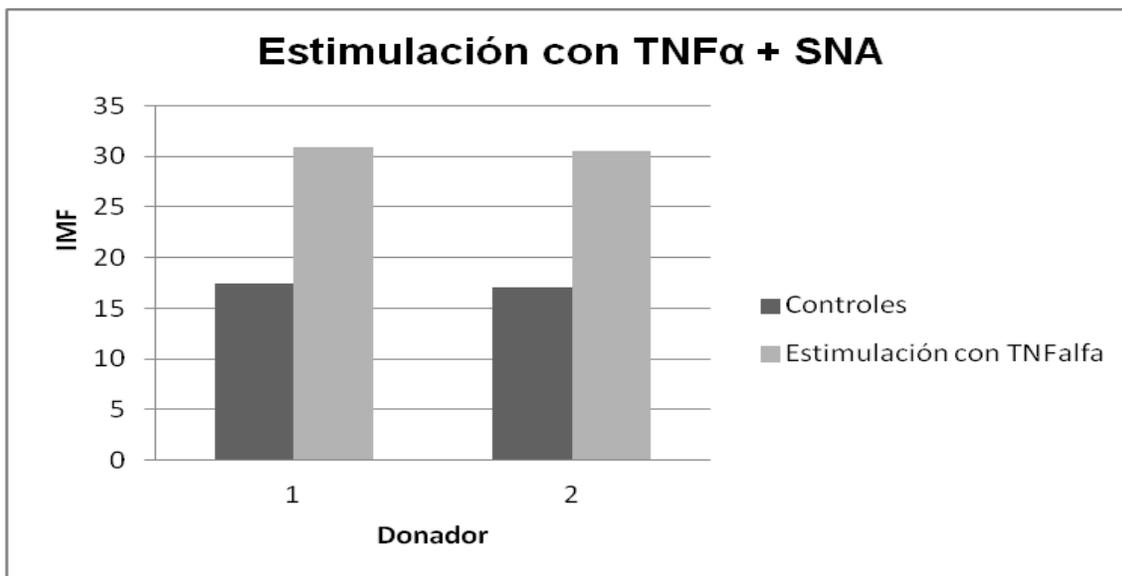


Figura 34. Evaluación diferencial de monocitos estimulados y no estimulados con TNF α . Evaluación comparativa de la lectina SNA, lectina de unión a ácido siálico α 2-6.

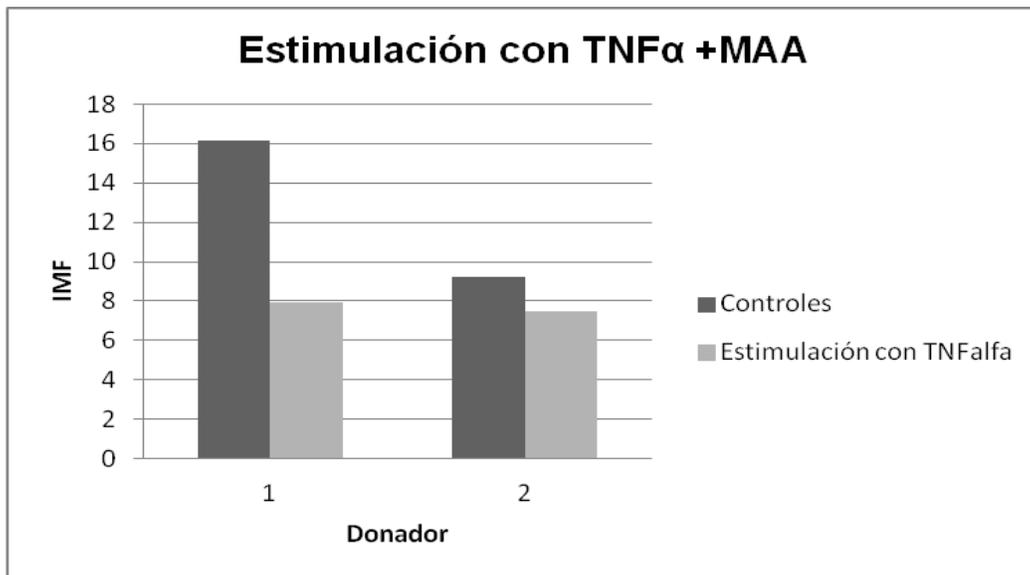


Figura 35. Evaluación diferencial de monocitos estimulados y no estimulados con TNF α . Evaluación comparativa de la lectina MAA, lectina de unión a ácido siálico α 2-3.

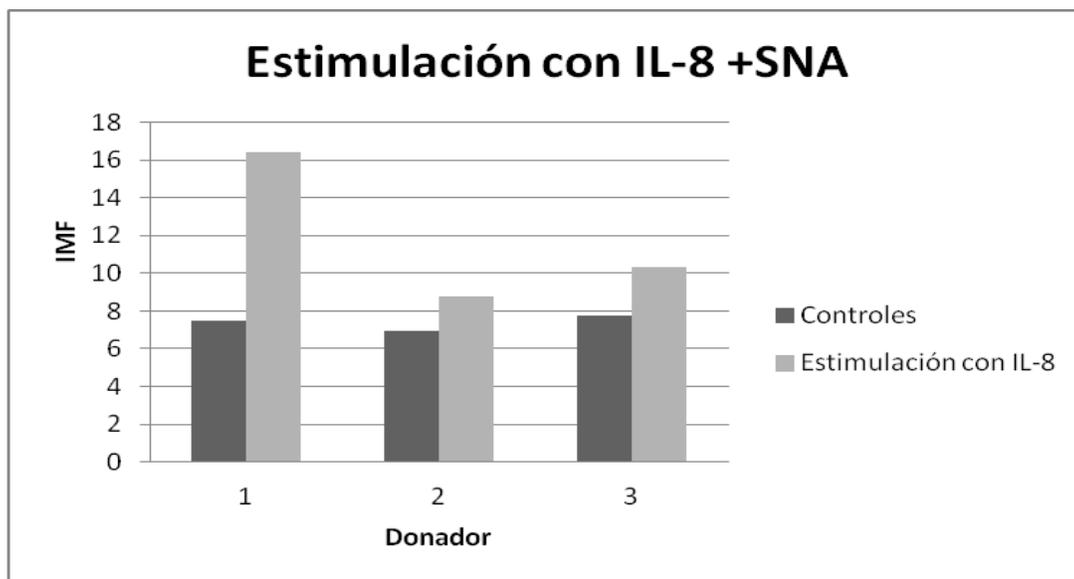


Figura 36. Evaluación diferencial de monocitos estimulados y no estimulados con IL-8. Evaluación comparativa de la lectina SNA, lectina de unión a ácido siálico α 2-6.

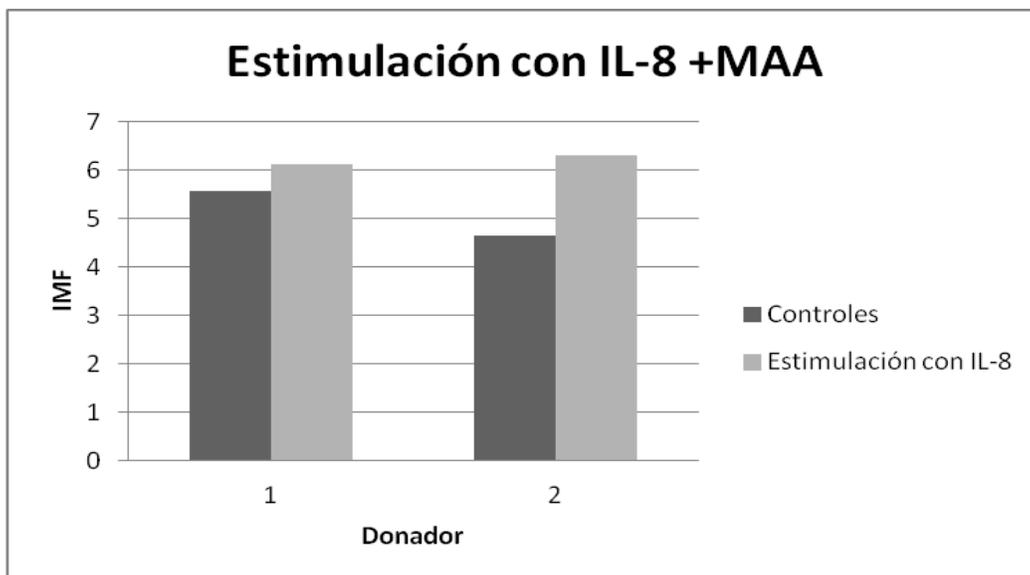


Figura 37. Evaluación diferencial de monocitos estimulados y no estimulados con IL-8. Evaluación comparativa de la lectina MAA, lectina de unión a ácido siálico α 2-3.

La estimulación con las lectinas TNF α e IL-8 mostró como resultado la modulación superficial del ácido siálico. Las cantidades de interleucina agregadas son similares a las cantidades reportadas a las secretadas durante la infección *in vitro* de monocitos humanos.

Como resultado de la estimulación con TNF α , se observan niveles incrementados de ácido siálico α 2-6, como lo muestra el incremento en la intensidad media de fluorescencia dada por la unión de la lectinas SNA a la membrana de los monocitos. Además se observa una reducción en los niveles de ácido siálico α 2-3, evaluada por la unión a la lectinas MAA.

En cuanto a la estimulación con la IL-8, se observó que también aumenta la cantidad de ácido siálico α 2-6 superficial, sin embargo, la cantidad de ácido siálico α 2-3 se vio aumentada, a diferencia de lo observado con TNF α y con el estímulo del virus dengue. Sin embargo los niveles de ácido siálico α 2-3 con todos los estímulos siguen siendo inferiores que los niveles de α 2-6.



DISCUSIÓN

1. Aislamiento de monocitos humanos de sangre periférica

En estudios *in vitro* se han intentado identificar las células blanco de sangre periférica para el virus dengue. Recientemente Durbin y colaboradores (2008) llevaron a cabo la caracterización fenotípica de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con dengue, encontrando que los monocitos son las células blanco predominantes en pacientes con dengue. Por lo que evaluamos la infección *in vitro* por el virus dengue de monocitos asilados de sangre periférica de donadores sanos.

Inicialmente establecimos las condiciones necesarias para obtener monocitos a partir de sangre periférica, mediante la separación por densidad de gradientes con ficoll.

Con base en la característica de adherencia de los monocitos logramos separarlos de las PBMCs totales, obteniendo una pureza del 95%. Los monocitos se activan al estar en cultivo por varios días, diferenciándose a macrófagos, por lo que determinamos el fenotipo de las células en cultivo hasta 48 horas post-separación mediante la expresión del marcador CD14.

Encontramos que 48 post-separación más del 93% de las células eran monocitos, por lo que se decidió utilizar monocitos de 24 horas de cultivo posterior a su separación para evaluar la infección por el virus dengue.



2. Evaluación de la infección de monocitos primarios por el virus dengue.

Como ya se mencionó anteriormente, el DENV es un virus de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva que pertenece a la familia *Flaviviridae*. Existen cuatro serotipos que se transmiten al humano vía la picadura del mosquito *Aedes*. La infección por el virus dengue es asintomática en la mayoría de los casos, pero también puede causar fiebre por dengue; y en casos raros la infección puede resultar en Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) o Síndrome de Choque por Dengue (SCD), manifestaciones severas de la enfermedad caracterizadas por fiebre alta, extravasación plasmática y hemorragia. La incidencia de Dengue ha aumentado considerablemente en las últimas décadas siendo actualmente uno de los mayores problemas de salud pública.

Se ha reportado que el virus dengue es capaz de infectar varios tipos celulares. *In vitro* se ha mostrado que el DENV infecta diferentes células humanas incluidas las células dendríticas, monocitos/macrófagos, células B, células T, células endoteliales, hepatocitos, células neuronales y recientemente células del músculo esquelético y cardiaco (*in vivo*) (13); así como varias líneas celulares utilizadas para su propagación (14), incluidas las líneas celulares humanas (K562, U937, THP-1, HepG2, HUVEC, ECV304, Raji, HSB-2, Jurkat, LoVo, KU812), de mosquito (C6/36), de mono (Vero, BS-C-1, CV-1, LLC-MK2), de hámster (BHK), así como de macrófagos de murino (Raw, P388D1, J774). El amplio rango de células permisivas para el DENV indica que el virus debe unirse a una molécula de superficie celular ubicua, o aprovecharse de múltiples receptores para favorecer la infección (15).

Sin embargo, no se ha caracterizado un receptor específico. Recientemente se han hecho diferentes esfuerzos significativos por caracterizar los receptores celulares utilizados por el DENV. Se han propuesto diferentes receptores celulares en mamíferos, incluido el heparán sulfato, la proteína del choque térmico 70 (Hsp 70, por sus siglas en inglés) y Hsp90; CD14, así como, la mejor caracterizada, DC-SIGN entre otros.



Los monocitos son hospederos naturales para el virus dengue **(22)**, se han implicado tanto en la patogénesis como en la protección del dengue. Los monocitos son productores de citocinas como $INF\alpha$ en respuesta al virus dengue **(21)**.

Los monocitos pueden participar en la patogénesis del dengue siendo las primeras células sanguíneas en propagar el virus **(23)**. Durante una respuesta inmune secundaria la infección de monocitos puede ser facilitada a través de la facilitación mediada por anticuerpos (ADE), permitiendo un incremento en el número de células infectadas y un aumento en el título viral. Los monocitos pueden producir citocinas y quimiocinas que comprometen la integridad del endotelio vascular, posiblemente dando lugar a la extravasación plasmática, la principal manifestación del dengue severo.

Evidencias clínicas sugieren que las manifestaciones severas del Dengue pueden ser causadas por una inapropiada respuesta inmune Th2. Por ejemplo se ha encontrado que el perfil de expresión génica de pacientes con SCD muestra transcritos incrementados de genes anti-inflamatorios **(36)**, lo que sucede a través de la activación “alternativa” de monocitos con citocinas Th2.

In vivo se ha reportado que las células infectadas de la circulación sanguínea son predominantemente monocitos (Durbin y col. 2008), y que un alto porcentaje de células positivas a la infección en pacientes con dengue severo expresan CD32, el receptor Fc γ II de los monocitos, en comparación con los pacientes de dengue no grave. Por otro lado, se sabe que la presencia de anticuerpos no neutralizantes incrementa la infección (Halstead 1973, O’rourke 1977) formando complejos inmunes con el virus, facilitando la entrada mediante el receptor Fc γ II.

La infección en monocitos humanos *in vitro* en el contexto de una primo-infección, en ausencia de anticuerpos heterotípicos no neutralizantes, ha sido controversial. Por lo que es necesario confirmar si el monocito humano permite tanto la internalización del DENV *in vitro* como su replicación. La evaluación de la infección en monocitos humanos se ha realizado mediante diferentes métodos.

Chen et al describieron en 1999 que el LPS inhibía la entrada del virus en monocitos primarios, cuantificando el título viral en los sobrenadante mediante ensayo de placa lítica, por lo que proponen al CD14 como posible receptor de entrada del virus a los



monocitos. Sin embargo, no se ha confirmado que sea éste el receptor del virus en los monocitos.

Boch y colaboradores (2002) reportaron que el 33 % de los monocitos se infectan con el virus dengue *in vitro* en el contexto de primo-infección al evaluar la infección utilizando Citometría de Flujo.

Recientemente, Wong y colaboradores (2011) reportaron que sólo el 10% de los monocitos son positivos para la proteína NS1 *in vitro*, al analizar la infección por citometría de flujo, y sólo el 3% son positivos para la proteína E a las 48 horas post-infección y una multiplicidad de infección de 10.

Realizando el marcaje de la proteína E del virus dengue, logramos determinar la infección en monocitos humanos primarios mediante microscopia de fluorescencia y citometría de flujo.

Las imágenes obtenidas mediante microscopia de fluorescencia muestran que el virus es capaz de internalizarse en lo monocitos y que además es capaz de replicarse, ya que se observa marca en las membranas celulares (Figura 22), lo cual no se observa en las células sin infectar.

La cuantificación de la infección por citometría de flujo, sólo se realizó marcando en las membranas la proteína E del virus, con la finalidad de cuantificar la replicación viral, no se permeabilizaron la células.

Determinamos que la infección por el virus dengue tiene un comportamiento dosis-respuesta dependiente. Encontrado la mayor respuesta a la dosis más alta, m.o.i de 10. A esta multiplicidad de infección, observamos que un 65% de las células eran positivas a la proteína E y que la intensidad media de fluorescencia también se ve incrementada. El porcentaje de células positivas a la infección encontrado nos habla posiblemente de la virulencia de la cepa viral utilizada, o de la susceptibilidad del donador a la infección



por el virus dengue. Ya que encontramos en porcentaje mayor de células infectadas que en reportes previos de infección de monocitos primarios *in vitro*.

Determinamos también que la respuesta era dependiente del tiempo, encontrado la mayor replicación viral a las 48 horas. No evaluamos tiempos más prolongados de infección, ya que después de 48 horas observábamos cambios en la morfología de las células característicos de la diferenciación a macrófagos, por lo que no era de nuestro interés analizar macrófagos sino monocitos.

Por lo anterior, se decidió evaluar la infección del virus dengue a una multiplicidad de infección de 10 y a 48 horas pos-inoculo para determinar el efecto que la infección por el virus pueda tener en la glicosilación superficial de los monocitos primarios.

Sin embargo, no todos los donadores fueron susceptibles a la infección por el virus dengue (tabla x), de los 22 donadores evaluados, sólo en 8 se pudo evaluar infección mediante citometría de flujo marcando la proteína de envoltura del virus.

Esto nos habla posiblemente de una cierta predisposición genética a la infección, además cabe mencionar que los niveles de infección encontrados son diferentes entre cada donador.

3. Evaluación comparativa de glicanos de superficie

Estudios previos en el grupo han sugerido la interacción del virus dengue con el ácido siálico, un importante azúcar terminal añadido en las cadenas de los oligosacáridos ya sean secretados o unidos a glicoproteínas y glicolipidos. Debido a su carga negativa y su tamaño relativo, el ácido siálico puede enmascarar importantes dominios funcionales en la superficie de las glicoproteínas y también protege a la célula de posibles ataques. Sin embargo, hay evidencia de que el ácido siálico puede participar en la interacción específica a nivel celulares y/o molecular **(37)**.



No sólo se ha evaluado la participación del ácido siálico en diversas interacciones moleculares, actualmente se sabe que los cambios en la glicosilación representan una característica de varios procesos patológicos y fisiológicos incluyendo aquellos ocurridos durante la respuesta inmune. La activación, diferenciación y migración de las células del sistema inmune está acompañada por cambios en la expresión de glicosiltransferasas y glicosidasas, las cuales modulan el perfil de glicosilación de los glicoconjugados de la superficie celular **(25,26,33)**.

Durante la infección por el virus dengue se ha reportado la secreción exacerbada de citocinas proinflamatorias como IL-8 y TNF α . Por otro lado, se ha reportado que la presencia de citocinas proinflamatorias modula la glicosilación superficial de las células, como es el caso de un modelo de estudio de fibrosis quística, en el cual se observó que la presencia de citocinas como IL-8 e IL-6 resultaban en un aumento de los niveles de ácido siálico, específicamente del antígeno sialilLewis X, este motivo sialilado es el receptor principal para la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno relacionado con el incremento de la gravedad y mortalidad de dicha enfermedad **(28)**.

Por lo anterior, evaluamos la modulación de glicanos superficiales en monocitos primarios durante la infección por el virus dengue.

Observamos inicialmente mediante microscopía electrónica la expresión de glicanos de superficie para lo cual, utilizamos un colorante positivo afín a las cargas negativas de la superficie celular, dadas por el ácido siálico.

Martínez Palomo y colaboradores (1972) mostraron que las células cancerosas eran más afines al rojo de rutenio en comparación con las células normales, lo cual se observaba al microscopio electrónico como un aumento en la densidad de la capa superficial teñida en un aumento de 120 000 x.

Nosotros observamos que los monocitos infectados por el virus dengue mostraban más afinidad al rojo de rutenio que se observa con un aumento en la intensidad de contraste de la membrana teñida. Desde un aumento de 10 000x se observa un aumento en la



intensidad del colorante, además de que a este aumento podemos observar la célula completa, se observa que la célula se encuentra íntegra, también puede observarse el núcleo que abarca gran proporción de la célula.

A un aumento de 120 000x se observa claramente el aumento en la intensidad del colorante, así como un engrosamiento de la capa teñida, lo cual nos habla de un aumento en las cadenas de oligosacáridos que contienen ácido siálico.

Lo anterior lo confirmamos también con un aumento en la unión de la lectina SNA en las células infectadas.

Nos interesamos en evaluar diferentes glicanos de la superficie celular no sólo ácido siálico, por lo que elegimos lectinas que nos ayudarían a evaluar glicanos simples y complejos. Elegimos la lectina Concanavalina A ya que se une a glicanos ricos en manosas, característica de los glicanos simples. Las lectinas de unión a fucosa (UEA) y ácido siálico (SNA y MAA) nos indican la presencia de glicanos complejos, y la lectina de cacahuete (PNA) nos indica la presencia del disacárido N-acetilactosamina, el core 1 de los O-glicanos.

Al determinar las concentraciones a usar de cada lectina, pudimos también determinar que los monocitos contienen una gran variedad de glicanos superficiales tanto N como O-glicanos, así como complejos y simples.

Notamos que expresan gran cantidad de manosas, y que expresan más ácido siálico α 2-6 que α 2-3. También notamos la presencia de fucosa y de O-glicanos. Lo cual coincide con lo reportado en la base de datos Funcional Glycomics. Esta base de datos disponible en la red recopila los estudios que se han hecho de espectrometría de masas, en los cuales se determina el tipo de glicanos expresados en cada tipo celular, sobre todo en células humanas **(38)**.

Asimismo, llevamos a cabo un análisis comparativo de la expresión de glicanos superficiales mediante Citometría de Fluorescencia mediante Lectinas de unión a glicanos acopladas a fluorofóros.



Destacamos sólo los resultados que obtuvimos con las células que si fueron permisivas a la infección. Posiblemente la modulación observada en células no infectadas se deba a la estimulación que el virus pueda provocar en los monocitos, trayendo como consecuencia la secreción de mediadores que a su vez puedan mediar la glicosilación superficial de las células.

No se observaron cambios constantes en los niveles de fucosa ni de O-glicanos. Sin embargo se observa un claro aumento en los niveles de ácido sialico α 2-6, una tendencia a la disminución de ácido siálico α 2-3 y una disminución en los niveles de manosa.

Estudios previos en el grupo muestran la interacción del virus con el ácido siálico α 2-6, incluso evalúan su participación, encontrando que es importante para la entrada del virus a la célula blanco.

Con los resultados obtenidos en este trabajo podríamos sospechar que la entrada del virus a la célula promueve que incrementen los niveles de éste glicano, permitiendo, de esta manera, que la célula se vuelva más susceptible a la infección por nuevas partículas virales.

Por otro lado, se han observado niveles incrementados de ácido siálico en células dendríticas y T reguladoras con fenotipo tolerogénico, ya que el aumento en ácido siálico hace a las células más afines al reconocimiento por Siglets, lectinas endógenas son capacidad de reconocer ácido siálico en las mismas células que las expresan como de células circundantes. Estas lectinas de reconocimiento a ácido siálico contienen dominios intracelulares inhibitorios ITIMs. El aumento en ácido siálico no se observa en células efectoras **(39)**. Además cuando se remueve el ácido sialico con neuraminidasa de las células dendríticas, éstas aumentan la expresión de moléculas de coestimulación, de HLAs, así como de citocinas proinflamatorias, lo cual coincide con lo reportado anteriormente **(40)**.



Lo anterior nos sugiere que el aumento en ácido siálico α 2-6 en el contexto de infección podría ser una forma en la que el virus evada la respuesta inmune, ya que probablemente promovería el reconocimiento de las células de siglecs inhibitorias, resultando en un fenotipo tolerogénico no efector.

La disminución de ácido siálico α 2-3 se ha correlacionado con el aumento de ácido siálico α 2-6 y viceversa en modelos sobre todo de cáncer. Por lo que, lo que encontramos coincide con modelos de inflamación.

Posiblemente la modulación de los niveles de ácido siálico esté relacionada con los niveles de transcritos de los genes de sialiltransferasas (STs) que expresen las células en las distintas condiciones, por lo que podría realizarse la evaluación de los niveles de transcritos para correlacionar este hecho.

Cabe mencionar que poco se conoce acerca de la regulación de glicosiltransferasas, hasta el momento sólo se ha reportado que las glicosiltransferasas en el aparato de golgi compiten por los sustratos, por lo que posiblemente en el contexto de infección las STs α 2-6 tengan mayor actividad al pegar ácido siálico que las α 2-3.

En cuanto a la disminución de los niveles de manosa, coincide con el hecho de que se haya encontrado un aumento en glicanos complejos caracterizados por la presencia de ácido siálico. Nuevamente se deba posiblemente a la competencia por sustratos. Si las STs se encuentran más activas, unirán más ácido siálico dando lugar a glicanos con estructuras terminales más elaboradas.



4. Evaluación comparativa de glicanos superficiales de monocitos estimulados con IL8 y TNF α .

Con el objetivo de evaluar el papel que pueden estar jugando las citocinas pro-inflamatorias secretadas durante la infección por el virus dengue en la modulación de glicanos de superficie. Estimulamos los monocitos primarios con TNF α e IL-8.

Observamos que los niveles de ácido siálico α 2-6 aumentan mientras que los niveles de expresión de α 2-3 disminuyen en la estimulación con TNF α . Esto difiere a lo encontrado por Videira y colaboradores (2008), en donde observan que la estimulación de células dendríticas con TNF α no conlleva a cambios en los niveles de ácido siálico. Podemos concluir entonces que el efecto del TNF α en cuanto a la modulación de glicanos depende del tipo celular.

En cuanto a la estimulación con IL-8, en el modelo de fibrosis quística, se encontraron niveles elevados de ácido siálico α 2-3, que es la conformación en la que se encuentra este azúcar en el antígeno sialilLewis X, nosotros encontramos también un ligero aumento de la unión de la lectina MAA, así como de la lectina SNA.

Con lo anterior podemos concluir que durante la modulación de glicanos superficiales pueden participar también factores del huésped no únicamente del patógeno por sí sólo sino también del contexto de intermediarios secretados como respuesta a la infección, posiblemente la suma de ambos estímulos es la que da como resultado la modulación neta de los glicanos de superficie de las células.



CONCLUSIONES

- Los monocitos obtenidos de sangre periférica pueden aislarse utilizando su propiedad de adherencia, obteniendo 95% de pureza.
- A las 48 horas post separación celular, aún se obtienen células adheridas las cuales son mayoritariamente monocitos.
- El virus dengue es capaz de infectar monocitos primarios *in vitro*, siendo posible evaluar la infección viral mediante Citometría de Flujo.
- La infección de monocitos primarios presenta una respuesta dosis-dependiente, que es también dependiente del tiempo de infección.
- La infección de monocitos humanos por el virus dengue favorece una modulación de los glicanos de superficie celular, especialmente de ácido siálico.
- La estimulación de monocitos con citocinas pro-inflamatorias resulta en modulación de los niveles de ácido siálico.
- La modulación de glicanos durante una infección depende no sólo del patógeno sino también en el contexto de las citosinas pro-inflamatorias secretadas en respuesta a la infección.



BIBLIOGRAFÍA

1. *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. World Health Organization (WHO) 2009.
2. Cameron P. Simmons, Jeremy J. Farrar, Nguyen van Vinh Chau y Bridget Will. *Current Concepts Dengue*. National England Journal of Medicine (2012) 336; 1423-32
3. *Boletín Epidemiológico 2012*. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2012. Secretaria de Salud
4. Guzmán M., García G. y Kour G. *El Dengue y el Dengue Hemorrágico: Prioridades de Investigación*. Revista Panamericana de Salud Pública. (2006) 19;3
5. A. Guzman, R.E. Istúriz. *Update on the global spread of dengue*. International Journal of Antimicrobial Agents (2010) 36 S;S40–S42
6. Duane J Gubler. *Dengue Fever Viruses*. Encyclopedia of life sciences & 2001 Nature Publishing Group (www.els.net)
7. Data base virus pathogen resource (<http://www.viprbrc.org/>)
8. Rodenhuis-Zybert, Izabela A. *Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity*. Cellular and Molecular Life Science (2010) 67:2773–86
9. J G Rigau-Pérez. *Severe dengue: the need for new case definitions*. Lancet Infectious Disease (2006) 297-302
10. Rushika Perera y Richard J. Kuhn . *Structural Proteomics of Dengue Virus*. Current Opinion in Microbiology. (2008). 11(4); 369–377.
11. Tomlinson SM, Malmstrom RD y Watowich SJ. *New approaches to structure based discovery of dengue protease inhibitors*. Infectious Disorders- Drug Targets. (2009) 9(3):327-43.
12. Clyde K, Kyle JL y Harris E. *Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis*. Journal of virology, (2006) 23;11418–31
13. Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, Xhaja K, Schmidt D, Martin KJ, Allen PD, Rodriguez JA, Dinsmore JH, López JR y



- Bosch I.. *Heart and Skeletal Muscle Are Targets of Dengue Virus Infection*. The Pediatric Infectious Disease Journal. (2010) 29(3): 238–24
14. Cabrera-Hernandez A y Smith DR. *Mammalian Dengue Virus Receptors*. Dengue Bulletin. (2005) 29,
15. Yun-Chi Chen, Sheng-Yuan Wang y Chwan-Chuen King. *Bacterial Lipopolysaccharide Inhibits Dengue Virus Infection of Primary Human Monocytes/Macrophages by Blockade of Virus Entry via a CD14-Dependent mechanism*. Journal of Virology. (1999), 73(4):2650.
16. Central Disease Control. <http://www.cdc.gov/Dengue/epidemiology/index.html>
17. Martina BE, Koraka P y Osterhaus AD. *Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View*. Clinical Microbiology Reviews. (2009) 22(4); 564–581
18. Chaturvedi UC, Nagar R y Shrivastava R. *Macrophage & dengue virus: Friend or foe?* Indian Journal of Medical Research. (2006) 124; 23-40
19. Bosch I, Xhaja k, Estevez L y Raines G. *Increased Production of Interleukin-8 in Primary Human Monocytes and in Human Epithelial and Endothelial Cell Lines after Dengue Virus Challenge*. Journal of Virology. (2002), 76(11):5588-97
20. Anderson R, Wang S, Osiowy C y Issekutz AC. *Activation of Endothelial Cells via Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection of Peripheral Blood Monocytes*. Journal of Virology, (1997), 71 (6); 4226–4232
21. Rothman AL. *Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms*. Nature Reviews Immunology, (2011), 11(8); 533-543
22. Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordond A, Rocha C, Balmaseda A y Harris E. *Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever*. Virology. (2008), 376(2): 429–435.
23. Kok Loon Wong, Weiqiang Chen, Thavamalar Balakrishnan, Ying Xiu Toh, Katja Fink y Siew- Cheng Wong. *Susceptibility and Response of Human Blood Monocyte Subsets to Primary Dengue Virus Infection*. Plos One. (2012), 7 (5); 36435
24. Mosquera J, Hernandez JP, Valero N, Espina LM y Añez GJ. *Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes*. Virology Journal (2005), 2:26



25. Trottein F, Schaffer L, Ivanov S, Paget C, Vendeville C, Cazet A, Groux-Degroote S, Lee S, Krzewinski-Recchi MA, Faveeuw C, Head SR, Gosset P y Delannoy P.. *Glycosyltransferase and sulfotransferase gene expression profiles in human monocytes, dendritic cells and macrophages* Glycoconjugate Journal. (2009), 26(9): 1259–1274
26. Videira PA, Amado IF, Crespo HJ, Algueró MC, Dall'Olio F, Cabral MG y Trindade H. *Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis.* Glycoconjugate Journal. (2008), 25(3):259-68.
27. Carnoy C, Ramphal R, Scharfman A, Lo-Guidice JM, Houdret N, Klein A, Galabert C, Lamblin G y Roussel P.. *Altered carbohydrate composition of salivary mucines from patients with cystic fibrosis and the adhesion of Pseudomonas aeruginosa.* American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. (1993), 9; 323-334.
28. Groux-Degroote S, Krzewinski-Recchi MA, Cazet AE, Vincent A, Lehoux S, Lafitte JJ, Van Seuningem I y Delannoy P. *IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewisx epitopes in the human bronchial mucosa.* The Biochemical Journal. (2008) 410; 213–223
29. Martinez-Palomo A, Braislovsky C y Bernhard W. *Ultrastructural Modifications of the Cell Surface and Intercellular Contacts of Some Transformed Cell Strains.* Cancer Research, (1969), 29:925-937
30. Rey FA. *Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry.* Proceedings of the National Academy of Science. (2003), 1000:6899-901
31. Fukuda M, Hiraoka N y Yeh JC. *C-Type Lectins and Sialyl Lewis X Oligosaccharides: Versatile Roles in Cell–Cell Interaction.* The Journal of Cell Biology, (1999) 17; 467–470
32. Miller JL, Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM y Gordon S. *The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages.* PLoS Pathogens (2008). 4 (2); 17
33. Markus S, Gleissner CA y Ley K. *Glycosylation in immune cell trafficking* Immunological Reviews. (2009) 230(1): 97–113
34. Buschiazzo A y Alzari PM. *Structural insights into sialic acid enzymology.* Current Opinion in Chemical Biology (2008), 12:565–572



35. Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. *The human sialyltransferase family*. *Biochimie* (2001), 83; 727–737
36. Becerra A, Warke RV, Martin K, Xhaja K, de Bosch N, Rothman AL y Bosch I. *Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo*. *Journal of Medical Virology*. (2009) 81(8): 1403–1411
37. Jamey D, Marth y Prabhjit K, Grewal. *Mammalian glycosylation in immunity*. *Nature Reviews* (2008), 8; 874-87
38. Focional Glycomics. (www.focionalglycomics.org)
39. Bax M, García-Vallejo JJ, Jang-Lee J. *Dendritic Cell Maturation Results in Pronounced Changes in Glycan Expression Affecting Recognition by Siglecs and Galectins*. *Journal of Immunology* (2007), 179; 8216-8224
40. Crespo HJ, Cabral MG, Teixeira AV, Lau JT, Trindade H, Videira PA. *Effect of sialic acid loss on dendritic cell maturation*. *Immunology*. (2009), 128; 621-31