



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SIÁLICO EN LAS INTERACCIONES TEMPRANAS
DEL VIRUS DENGUE CON CÉLULAS DIANA (MONOCITOS Y HEPATOCITOS)

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIOL. GABRIELA FUENTES GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. BLANCA HAYDÉ RUIZ ORDAZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D. F. ABRIL 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz en el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Blanca Haydé Ruiz Ordaz	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Alejandro García Carrancá	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Edgar Zenteno Galindo	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Verónica Monroy Martínez en todos los experimentos realizados durante esta tesis.

Se reconoce la asesoría técnica del cDr. Miguel Tapia Rodríguez en los experimentos de microscopía y co-localización realizados en la unidad de microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Se reconoce la asesoría técnica de la Mtra. En Ciencias Janet García Pillado en los experimentos de infección y citometría realizados en esta tesis.

Se reconoce la asesoría técnica de Dania Colin Castelan en los experimentos de inmunofluorescencia realizados en esta tesis.

Se reconoce la donación de la sangre de donadores sanos a la Dra. Monica Vivero Rogel Del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal: Dra. Gohar Gevorgyan Markosian UNAM	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal: Dra Gloria Soldevila Melgarejo UNAM	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal: Dr. Luis Padilla Noriega UNAM	Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario: Dra Leticia Rocha Zavaleta UNAM	Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM

RESUMEN
PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SIÁLICO EN LAS INTERACCIONES
TEMPRANAS DEL VIRUS DENGUE CON CELULAS DIANA (MONOCITOS Y
HEPATOCITOS)

El Dengue es un problema de salud pública que anteriormente se limitaba a las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Sin embargo, debido a la elevada expansión demográfica humana y al cambio en la ecología del mosquito vector *Aedes aegypti*, su distribución se ha expandido. Anualmente se registran entre 50 y 100 millones de casos de fiebre por Dengue a nivel mundial, de los cuales entre 200,000 y 500,000 presentan las formas severas de la enfermedad como son síndrome de choque por Dengue o fiebre hemorrágica por Dengue con una tasa de mortalidad del 2.5%. La infección por Dengue es causada por cualquiera de los 4 serotipos del Virus Dengue (DENV). Este virus es capaz de infectar varios tipos celulares, sin embargo, el receptor no está definido claramente. En nuestro laboratorio se encontró que el Ácido Siálico (Sia) participa durante la infección del DENV en células de mosquito, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la participación de Sia en las interacciones tempranas del DENV en las principales células humanas dianas como son los monocitos y hepatocitos. Se encontró a través de ensayo de co-localización, que Sia de la superficie de monocitos humanos interacciona de manera importante con el DENV pero muy pobremente en la superficie de hepatocitos. Mediante ensayos de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) se encontró que al retirar al Sia con neuraminidasa de superficie celular de los monocitos humanos, la internalización del DENV se redujo casi completamente, mientras que en hepatocitos el efecto fue inverso.

ÍNDICE

Página:

1. INTRODUCCIÓN.	
1.1. Epidemiología.....	9
1.2. El virus Dengue.....	12
1.3. Cuadro Clínico.....	15
1.3.1. Fase febril, Dengue clásico (DC) o fiebre por Dengue (FD).....	16
1.3.2. Fase Crítica.....	17
1.3.3. Fase de Recuperación.....	18
1.3.4. Dengue grave o Síndrome Hemorrágico por Dengue/ Síndrome de choque por Dengue (FHD/SCHD).....	18
1.4 Fisiopatología del Dengue Severo (FHD/SCHD).....	21
1.5. Factores de Riesgo.....	23
1.6 Patogénesis de la FHD.....	25
1.7 Ciclo replicativo del DENV.....	33
1.8 Tropismo celular del DENV.....	37
2. ANTECEDENTES	
2.1 Interacción virus-receptor.....	39
2.2 Receptores descritos para el DENV en hepatocitos y monocitos.....	41
2.3 Glicoconjugados como receptores.....	44
2.4 El ácido Siálico	
2.4.1 El ácido Siálico como receptor viral.....	45
2.4.2 Estructura y función del ácido siálico.....	47
2.4.3 Metabolismo del ácido siálico.....	52
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	55
4. JUSTIFICACIÓN.....	56
5. HIPÓTESIS.....	57

6. OBJETIVO GENERAL	58
6.1. Objetivos Particulares	58
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	59
8. MATERIAL Y MÉTODOS	
8.1. Cultivo, amplificación y titulación del virus Dengue en células LLC-MK2.....	60
8.2 Aislamiento de monocitos de sangre periférica.....	61
8.2.1 Determinación de monocitos mediante Citometría de Flujo.....	63
8.3 Evaluación de la presencia de Ácido Siálico en la superficie celular mediante marcaje fluorescente con lectina SNA (<i>Sambucus Nigra</i> Agglutinin).....	63
8.4 Evaluación de la presencia Ácido Siálico en superficie celular mediante Citometría de Flujo con lectina SNA.....	65
8.5 Evaluación de la interacción del DENV con Sia en la superficie celular mediante ensayos de co-localización.....	66
8.6 Evaluación de la internalización del DENV en presencia o ausencia de Sia mediante retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real)	
8.6.1 Ensayo de internalización viral.....	68
8.6.2 Purificación del RNA viral y RT-PCR en tiempo real.....	69
8.6.3 RT-PCR e tiempo real.....	69
9. RESULTADOS	
9.1 Amplificación y titulación del DENV-2 en células LLC-MK2.....	71
9.2 Aislamiento de monocitos de sangre periférica.....	72
9.3 Evaluación la presencia de Ácido Siálico en superficie celular mediante marcaje fluorescente con lectina SNA (<i>Sambucus Nigra</i> Agglutinin).....	75
9.4 Evaluación la presencia de Ácido Siálico en la superficie celular mediante Citometría de Flujo con la lectina SNA.....	78
9.5 Evaluación de la interacción del DENV con Sia a nivel de la superficie de monocitos y hepatocitos humanos mediante ensayos de co-localización.....	81

9.6 Evaluación de la internalización del DENV en presencia o ausencia de Sia mediante RT-PCR en tiempo real o RT-qPCR.....	90
--	----

10. DISCUSIÓN

10.1 Presencia de ácido siálico en la superficie de monocitos humanos de sangre periférica y hepatocitos de la línea celular HepG2.....	96
---	----

10.2 Interacción DENV-Sia en la superficie de monocitos humanos de sangre periférica y hepatocitos humanos (HepG2).....	98
---	----

10.3 Ensayos de internalización del DENV en ausencia y presencia de Sia en monocitos y hepatocitos humanos (HepG2).....	100
---	-----

11. CONCLUSIONES.....	106
------------------------------	------------

12. PERSPECTIVAS.....	107
------------------------------	------------

13. BIBLIOGRAFÍA.....	108
------------------------------	------------

ABREVIATURAS

AAV*. Virus adenoasociados
ADE*. Facilitación mediada por anticuerpos
AJ*. Uniones adherentes
APTT*. Tiempo de tromboplastina parcial activado
Asn. Asparagina
CE. Células endoteliales
CF*. Factor citotóxico
CID. Coagulación intravascular diseminada
CMP*. Citidina monofosfato
CTLA-4*. Antígeno citotóxicos de linfocitos T 4
CTP*. Citidina trifosfato
DAPI*. 4',6-diamidino-2-fenilindol
DC. Dengue clasico
DC-SIGN*. Molécula de adhesión intercelular especifica de células dendríticas no integrina 3
DENV. Virus Dengue
DENV-2 NGC*. Virus Dengue serotipo 2 Nueva Guinea C
ECP. Efecto citopático
ET-1. Endotelina 1
FcγR*. Receptor de la fracción cristalizable de inmunoglobulinas tipo G
FD. Fiebre por Dengue
FHD. Fiebre Hemorrágica por Dengue
FITC*. Isotiocianato de fluoresceína
FSC-H. Forward light scatter, dispersión frontal de la luz
G6PD*. Deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato
GRP78/BiP*. Proteína relacionada con la glucosa
HLA*. Sistema del antígeno leucocitario humano
Hsp*. Proteína de Choque Térmico
HUVEC*. Células endoteliales derivadas de cordón umbilical humano
ICAM-1*. Molécula de Adhesión Intercelular 1
IFNγ. Interferón gamma
IL. Interleucina
IMC*. Inmunohistoquímica
ISH*. Hibridación *in situ*
Kb. Kilobases
kDa. KiloDaltons
LPS. Lipopolisacárido
MBL*. Lecitina que une manosa
MCP-1*. Proteína quimio atrayente de monocitos 1
MHC*. Complejo mayor de histocompatibilidad
MIF*. Media de intensidad de fluorescencia
MOI. Multiplicidad de Infección
NS. No estructural (proteína)
OMS. Organización Mundial de la Salud
PAI-1*. Inhibidor del activador del plasminógeno 1
Pfu. Unidades formadoras de placa lítica
PGI2. Prostaciclina 2

RANTES*. Quimiocina expresada y secretada por células T normales, regulada por activación

RE. Retículo endoplásmico

RNA*. Ácido Ribonucleico

Rpm. Revoluciones por minuto

SCHD. Síndrome de Choque por Dengue

Sia. Ácido Siálico

Sn. Sobrenadantes

SNA. Lectina *Sambucus Nigra*

SSC-H. Side light scatter, dispersión lateral de la luz

TCR*. Receptor de células T

TF*. Factor tisular

TNF α *. Factor de necrosis tumoral alfa

tPA*. Activador del plasminógeno tisular

VCAM-1*. Molécula de adhesión vascular 1

VEGF*. Factor de crecimiento endotelial vascular

*Por sus siglas en inglés

PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SIÁLICO EN LAS INTERACCIONES TEMPRANAS DEL VIRUS DENGUE CON CELULAS DIANA (MONOCITOS Y HEPATOCITOS)

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología

El Dengue es un problema de salud pública en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Anualmente se registran entre 50 y 100 millones de casos de Fiebre por Dengue (FD) a nivel mundial, de los cuales entre 200,000 y 500,000 presentan las formas severas de la enfermedad como son el Síndrome de Choque por Dengue (SCHD) y la Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) con una tasa de mortalidad del 2.5 %. Sin embargo, en ausencia de un tratamiento oportuno, la letalidad puede elevarse al 20% (OMS, 2009; Guha-Sapir y Schimmer, 2005). El Dengue se ha reportado en más de 100 países. Sin embargo, actualmente se está expandiendo a nuevas áreas debido entre otros, a cambios en la ecología del mosquito, el cambio climático, el incremento en la demografía humana, incluyendo la expansión urbana, el incremento en la densidad del vector, el crecimiento de las poblaciones y el incremento en los viajes. Se estima que 2500 millones de personas viven en áreas en riesgo para el Dengue (Figura 1.1) (Coffey et al., 2009).



Figura 1.1. Las líneas de contorno de los isotermas de enero y julio indican los posibles límites geográficos de los hemisferios norte y sur para la supervivencia durante todo el año del mosquito *Aedes aegypti*, principal vector de los virus del Dengue. Se muestra en amarillos los países o áreas donde se han reportado casos de Dengue. Tomado de la OMS, 2009.

La infección sintomática por el virus Dengue (DENV), inicialmente se agrupó en tres categorías: Fiebre Indiferenciada, Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue. Asimismo, la FHD se clasificó en cuatro grados, según su gravedad, en donde los grados III y IV corresponden al SCHD. Recientemente se han observado diferentes inconvenientes con el uso de esta clasificación, principalmente en la aplicación de los criterios clínicos para el diagnóstico preciso de la FHD, aunado al aumento en los casos graves que no cumplen con los estrictos criterios diagnósticos, favoreció la reconsideración de esta clasificación. La OMS, recientemente reclasificó a la FHD en Dengue Severo y Dengue No Severo. Sin embargo, la anterior nomenclatura (FD, FHD/SCHD) continúa utilizándose ampliamente (OMS, 2009).

La FD es una de las enfermedades transmitidas por vector más importante a nivel mundial la cual se ocasiona por cualquiera de los cuatro serotipos del DENV (DENV 1-4) que son transmitidos al humano por mosquitos del género *Aedes* (*aegypti* y *albopictus*) (Figura 1.2). La hembra del mosquito adquiere al virus cuando se alimenta de una persona infectada, el DENV se replica en el vector y llega a ser infectivo después de un período de incubación de aproximadamente 7-14 días. Posteriormente, el mosquito es capaz de transmitir al virus por el resto de su vida en cada alimentación. *A. aegypti* es un mosquito doméstico que se reproduce en contenedores artificiales como tanques de agua, llantas, tinajas, charcos, etc. El comportamiento de alimentación repetida de *A. aegypti* y su preferencia por el hospedero humano, contribuyen a la dispersión y extensión del DENV aún en presencia de una población pequeña de vectores (Teo et al., 2009).



Figura 1.2. *Aedes Aegypti*, mosquito transmisor del virus dengue.

En la actualidad, no existe un tratamiento antiviral específico para el Dengue. El manejo apropiado de los fluidos para corregir la hipovolemia en los casos de SCHD, ha tenido éxito para reducir la tasa de mortalidad; aunque el acceso a los

servicios médicos representa un problema en ciudades subdesarrolladas. En ausencia de un diagnóstico temprano y un tratamiento oportuno de los casos severos del Dengue, la tasa de letalidad puede exceder el 20% (OMS, 2009). El control del mosquito, el cual es costoso y a veces inefectivo, es hasta ahora el único método disponible de prevenir la enfermedad. Por lo que el desarrollo de una vacuna efectiva y segura contra el DENV ha sido prioritario para la OMS

1.2 El virus del Dengue

El DENV pertenece a la familia *Flaviviridae* que incluye un número importante de patógenos humanos como los virus de la Fiebre amarilla, West Nile, el virus de la Encefalitis japonesa y el virus de la Hepatitis C, entre otros. Esta familia contiene más de 70 miembros que están organizados en tres géneros: los Flavivirus (virus transmitidos por artrópodos), los Pestivirus y los Hepacivirus, que incluyen a los virus de la Hepatitis C y Hepatitis G (Tomlinson et al., 2009). El DENV presenta 4 serotipos diferentes pero genéticamente relacionados denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (Guzman and Kouri, 2002). El virión tiene un genoma de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva (ya que funciona como mensajero) de 11 kb que codifica para 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales. Los DENV son partículas icosaédricas que tienen un diámetro aproximado de 50 nm. Están conformados por una envoltura constituida por la proteína de envoltura ó E; una bicapa lipídica procedente del hospedero en la que se encuentran la proteína de membrana ó M y la proteína de la cápside ó C, que junto con el RNA forman la nucleocápside viral (Figura 1.3). El genoma de los

Flavivirus presenta en el extremo 5' una 7-metilguanosa (cap), una región no traducible (5'UTR), un marco abierto de lectura y una región 3'UTR; Sin embargo, el RNA no está poli-adenilado. El genoma viral, codifica para 7 proteínas no estructurales llamadas; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 cuya síntesis ocurre en el citoplasma de la célula hospedera y entre las que se encuentran las enzimas necesarias para la replicación viral (Gubler, 1998; Kurane, 2007; Noisakran y Perng, 2008).

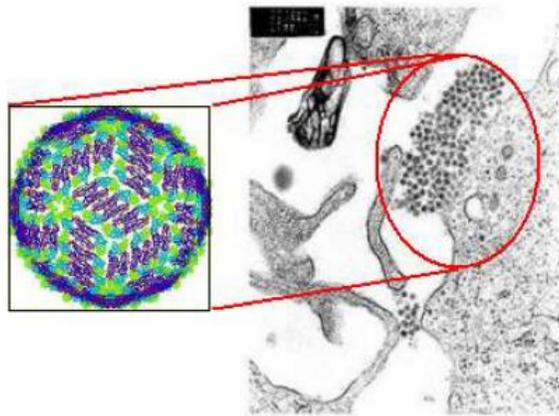


Figura 1.3. Partículas virales maduras detectadas por Microscopía Electrónica. El cuadro resalta una partícula viral con el arreglo icosaédrico de la proteína E o de la envoltura. Tomado del Centro de Control de Enfermedades, CDC.

Cada uno de los cuatro serotipos del DENV es capaz de causar un espectro clínico muy amplio que va desde la infección moderada autolimitante (FD) hasta la enfermedad potencialmente letal (FHD/SCHD). La infección con uno de los serotipos induce inmunidad protectora a lo largo de la vida para ese serotipo pero solo inmunidad parcial o temporal para los otros serotipos (Gubler, 2006). La circulación de más de un serotipo en áreas endémicas (hiperendemicidad regional) puede aumentar el riesgo de presentar las formas severas de la

enfermedad. Sin embargo, no hay estrategias efectivas para prevenir el progreso de FHD/SCHD, ya que los mecanismos patogénicos aún son poco conocidos (Lin et al., 2006).

El ser humano es el principal huésped del DENV. El ciclo de transmisión viral inicia cuando el virus es ingerido por mosquitos hembra durante su alimentación a través de la picadura a un humano en periodo de viremia. El virus inicialmente infecta el intestino medio del mosquito y, posteriormente, se propaga en los diferentes tejidos, llegando finalmente a las glándulas salivales en un período aproximado de 8 a 12 días, este periodo se conoce como periodo de incubación extrínseca. Posteriormente el virus se puede transmitir a otros seres humanos durante la picadura y alimentación subsiguiente del mosquito. El período de incubación extrínseco está en parte influenciado por las condiciones ambientales, especialmente la temperatura. Posteriormente, el mosquito permanece infeccioso durante el resto de su vida. El *A. aegypti* es uno de los vectores más eficientes para los arbovirus, debido a que es muy antropofílico, frecuentemente pica varias veces antes de completar la oogénesis y prolifera en estrecha proximidad a los seres humanos. Cuando el mosquito se realimenta transmite el virus a una persona no infectada, el virus infecta sus células hospederas, se replica y se propaga causando una viremia detectable aproximadamente de 7 u 8 después de la picadura del mosquito. Este periodo se conoce como periodo de incubación intrínseca (Figura 1.4) (OMS, 2009).

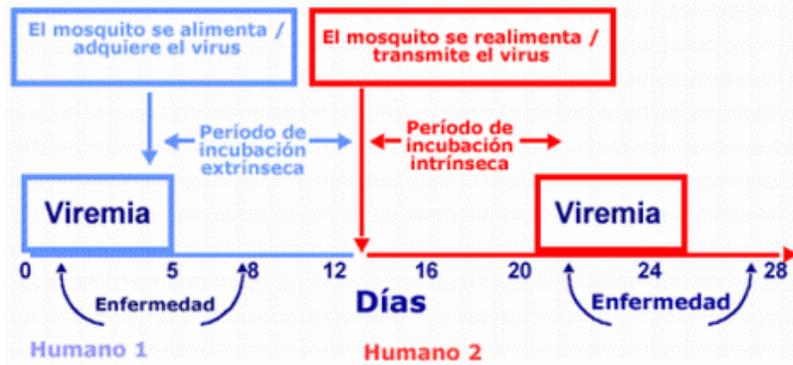


Figura 1.4. Periodos de incubación intrínseca y extrínseca del virus del Dengue.

1.3 Cuadro clínico

El Dengue tiene un amplio espectro de manifestaciones clínicas, a menudo con una evolución y desenlace clínico impredecible. Mientras que el 95% de los pacientes se recuperan después de un cuadro moderado y auto limitante, el 5% restante progresa a la enfermedad severa, caracterizada principalmente por fuga de plasma con o sin hemorragia. La rehidratación intravenosa es la terapia de elección, esta intervención puede reducir los casos fatales a menos del 1%. La progresión del Dengue no severo al Severo es difícil de predecir (OMS, 2009).

La infección por dengue es una enfermedad sistémica y aguda. Después del período de incubación, la enfermedad inicia abruptamente, presentando tres fases de evolución: la etapa febril, la fase crítica y la de convalecencia (Figura 1.5).

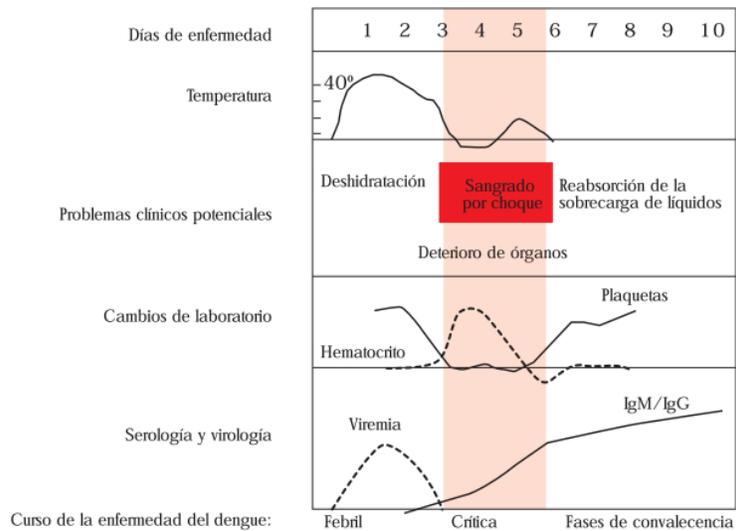


Figura 1.5. Fases de evolución de la infección por Dengue (OMS, 2009).

1.3.1 Fase febril, Dengue clásico (DC) o fiebre por Dengue (FD)

La fase febril, Dengue clásico (DC) o FD, es un síndrome que está asociado con la aparición de fiebre elevada, abrupta que dura de 2 a 7 días y a menudo está acompañada de rubor facial, cefalea, mialgias, artralgias y salpullido, con presencia de leucopenia (Rigau-Perez et al., 1998). También es común la anorexia, náuseas y/o vómito. En la fase febril temprana, es difícil distinguir clínicamente el Dengue de otras enfermedades febriles. Si la prueba del torniquete resulta positiva en esta fase, aumentan las probabilidades del Dengue Severo. Pueden presentarse grados variables de trombocitopenia y hemorragia cutánea. Los casos severos con artralgia incapacitante (fiebre rompe-huesos) son comunes en adultos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Fase febril, clínica y de convalecencia del dengue

1	Fase febril	Deshidratación; la fiebre alta puede causar trastornos neurológicos y convulsiones febriles en niños pequeños.
2	Fase crítica	Choque a causa de la extravasación de plasma; hemorragia importante; deterioro de órganos.
3	Fase de convalecencia	Hipovolemia (sólo si la terapia de líquidos intravenosos ha sido excesiva o se ha extendido a esta fase)

1.3.2 Fase Crítica

La fase crítica se inicia cuando se presenta la disminución de la fiebre, la temperatura disminuye a 37.5°C o 38°C y permanece por debajo de este valor, usualmente en los días 3 a 7 de la enfermedad, se puede presentar un aumento en la permeabilidad capilar junto con el incremento en los valores del hematocrito. El periodo de extravasación de plasma dura generalmente entre 24 y 48 horas. La leucopenia progresiva seguida de una rápida disminución del número de plaquetas precede usualmente a la extravasación del plasma. En este momento, los pacientes que no presentan un aumento en la permeabilidad capilar, mejoran o de lo contrario, pueden agravar como resultado de la pérdida del volumen plasmático, presentando choque hipovolémico. El derrame pleural y la ascitis se pueden detectar clínicamente dependiendo del grado de extravasación de plasma. La temperatura corporal puede estar debajo de lo normal cuando el paciente entra en choque, la hipoperfusión orgánica (disminución del flujo de sangre que pasa por un órgano) consecuente puede generar daño orgánico progresivo, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada (CID). Esto favorece un cuadro de hemorragia ocasionando el decremento del hematocrito presente en el síndrome de choque. Asimismo, puede presentarse daño en diferentes órganos causando hepatitis, encefalitis, miocarditis. La hemorragia severa se puede desarrollar de forma independiente al síndrome de choque. Cabe mencionar que los pacientes que mejoran después de la defervescencia (60% de los casos) no cursan con Dengue Severo.

1.3.3 Fase de recuperación

Durante la fase de recuperación, si el paciente sobrevive a la fase crítica, en las siguientes 48 a 72 horas tiene lugar una reabsorción gradual de los líquidos del compartimiento. El hematocrito se estabiliza o puede ser menor debido al efecto de dilución de los líquidos reabsorbidos. El conteo de leucocitos generalmente sube inmediatamente después de la disminución de la fiebre, aunque la recuperación del número de plaquetas generalmente es posterior al del número de leucocitos.

1.3.4 Dengue grave o Síndrome Hemorrágico por Dengue/ Síndrome de choque por Dengue (SHD/SCHD)

El Dengue grave o también denominado SHD/SCHD se define por una o más de las siguientes condiciones: (i) extravasación de plasma que puede conducir a choque hipovolémico (choque por dengue) o acumulación de líquidos, con insuficiencia respiratoria o sin ella, o ambas (ii) sangrado grave o deterioro de órganos grave, o ambos.

Las características clínicas de la FHD/SCHD son similares en muchos aspectos a las de FD durante la fase febril temprana. Sin embargo, puede presentarse daño al endotelio vascular con pérdida del plasma como resultado de un incremento en la permeabilidad vascular con alteraciones de la hemostasia, que ocurren en algunos pacientes que cursen tanto con primo-infección como durante una infección secundaria. Los mecanismos causantes de FHD/SCHD aún se desconocen. La

sintomatología clínica de FHD incluye: Fiebre, dolor de cabeza, mialgias, artalgias, leucopenia, trombocitopenia severa y manifestaciones hemorrágicas. Se sugiere que la hemorragia sea resultado de múltiples factores, incluyendo trombocitopenia, coagulopatía y vasculopatía. La disfunción endotelial, la trombocitopenia severa y el desequilibrio de los factores coagulantes y anticoagulantes están involucrados en el desarrollo de FHD. La extravasación del plasma en FHD es el resultado de la disfunción del endotelio vascular causada tanto por efectos directos del virus como por mediadores inflamatorios y/o el sistema inmune (Lin et al, 2006). La efusión pleural, ascitis y la hemoconcentración son indicadores de la pérdida del volumen intravascular. Las manifestaciones hemorrágicas oscilan desde un torniquete positivo hasta el sangrado espontáneo de la nariz y el tracto gastrointestinal (Lei et al., 2001).

A medida que progresa la permeabilidad vascular en el Dengue Severo, la hipovolemia empeora y termina en choque. Generalmente tiene lugar cuando baja la fiebre, en el día 4 ó 5 de la enfermedad. En la etapa inicial del choque, el mecanismo de compensación que mantiene normal la presión sistólica también produce taquicardia y vasoconstricción periférica con reducción de la perfusión de la piel (llevar oxígeno y nutrientes a un tejido por medio de la sangre), lo que favorece la presencia de extremidades frías y llenado capilar lento. El choque hipotensor prolongado y la hipoxia pueden conducir a falla multiorgánica y a un curso clínico extremadamente difícil. El paciente presenta compromiso circulatorio o choque (pulso débil o indetectable). Se considera que el paciente presenta

choque si la presión arterial es de ≤ 20 mm de mercurio Hg. También puede presentarse compromiso gastrointestinal que se manifiesta por vomito persistente, dolor abdominal intenso, hepatomegalia e ictericia.

Los pacientes con Dengue severo pueden presentar alteraciones importantes en el sistema de la coagulación. Cuando se presentan hemorragias severas casi siempre se asocia con un choque profundo lo que en combinación con la trombocitopenia, hipoxia y acidosis puede llevar un falla orgánica múltiple (falla hepática y renal agudas, cardiopatías, entre otras menos usuales) y CID (Figura 1.6).

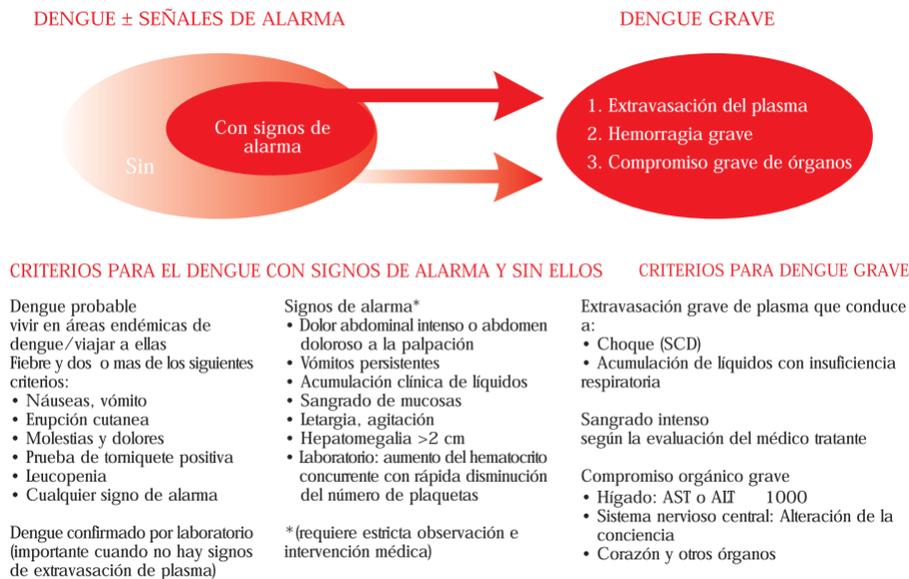


Figura 1.6. Clasificación de los casos de Dengue y niveles de gravedad.

1.4 Fisiopatología del Dengue Severo (FHD/SCHD)

Para explicar las formas severas de la enfermedad se han propuesto dos hipótesis principales. La primera en donde Scott Halstead (1970) propone que la infección subsecuente de individuos preinfectados con un serotipo diferente de DENV podría exacerbar la enfermedad, un fenómeno que se denominó facilitación mediada por anticuerpos (ADE). En una infección secundaria, el DENV y anticuerpos heterotípicos no-neutralizantes forman complejos virus-anticuerpo y facilitan su entrada a las células portadoras del receptor Fc γ (Fc γ R). Se espera que el aumento en el número de células infectadas resulte en una mayor carga viral y la inducción de una sólida respuesta inmunitaria del huésped, que incluye citocinas y mediadores inflamatorios, algunos de los cuales pueden contribuir a la extravasación de plasma (Figura 1.7). La participación de los receptores que reconocen la región constante de IgG, Fc γ RI y Fc γ RII, fueron identificados como actores clave durante el proceso de ADE a través de la internalización del complejo formado entre el anticuerpo anti-dengue, el DENV y el receptor Fc, cuando los anticuerpos son de reacción cruzada pero no neutralizantes o cuando están presentes en concentraciones sub-neutralizantes (Halstead y O'Rourke, 1977). Además, existen reportes que proponen que la entrada por los receptores Fc γ suprime la respuesta inmune antiviral. Se ha demostrado que la infección con DENV de células THP-1 por la vía Fc γ R suprime la transcripción y la producción de IL-12, IFN γ , TNF α y óxido nítrico pero estimula la expresión de citocinas anti-inflamatorias IL-6 e IL10 (Chareonsirisuthigul et al., 2007).

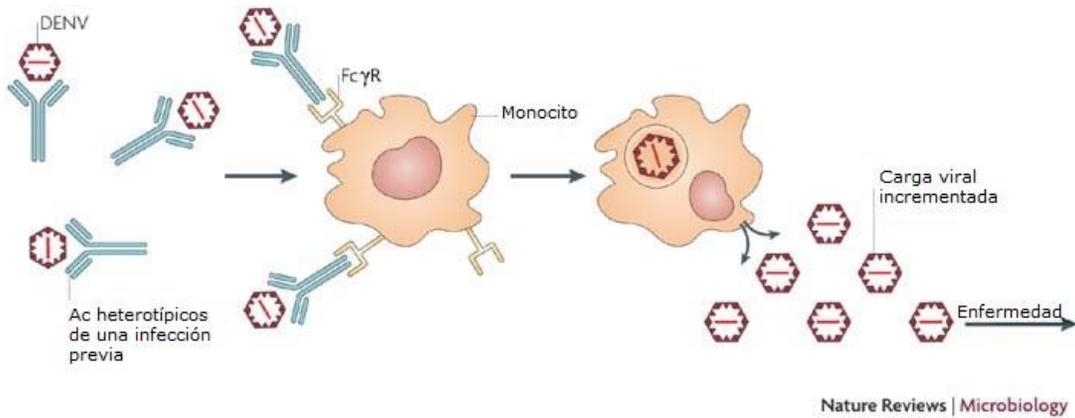


Figura 1.7. Facilitación mediada por anticuerpos durante la infección del DENV. Tomada de Whitehead et. al, 2007.

De acuerdo con la hipótesis de la variación antigénica viral, propuesta por Leon Rosen (1986), las variantes del DENV son responsables de los casos severos. Los serotipos de DENV pueden ser clasificados en diferentes genotipos con base en las variaciones de nucleótidos, las diferencias genéticas virales han sido asociadas con diferencias en la virulencia (Leitmeyer et al., 1999). Se ha demostrado que las cepas de DENV de diferentes zonas geográficas o diferentes serotipos pueden variar en su habilidad para infectar diferentes tipos celulares o causar enfermedades severas (Vaughn et al., 2000). La introducción del genotipo Asiático coincide con la aparición de FHD en diferentes países en América, mientras que el genotipo Americano solo se asoció con FD (Rico-Hesse et al., 1997). La observación de que ciertos genotipos de DENV asiático son más virulentos que las cepas americanas puede ser debido a las diferencias en el genoma del virus que afectan la habilidad de DENV para replicarse en células dendríticas y macrófagos (Cologna et al., 2005). Se reportó que los determinantes de virulencia residían en el aminoácido 390 de la proteína E, en la región no

traducible 5' y 300 nucleótidos río arriba de la región no traducible 3' (Leitmeyer et al., 1999).

1.5 Factores de Riesgo

Diferentes estudios epidemiológicos indican que los factores genéticos constituyen componentes importantes en la susceptibilidad a la enfermedad. El sistema del antígeno leucocitario humano (HLA) comprende al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que es el primer paso en el reconocimiento celular y la presentación de virus a células inmunes. DENV se presenta en células infectadas por la vía del MHC clase I que procesa proteínas virales intracelulares y los presentan en la superficie celular para alertar y estimular a las células de respuesta (Coffey et al, 2009). Muchos alelos humanos HLA clase I y II están asociados con el desarrollo de FHD. Asimismo, se ha observado que algunos polimorfismos tienen efectos específicos en el resultado de la enfermedad y frecuentemente actúan en conjunto con otros polimorfismos y factores de riesgo del ambiente, esto eventualmente resulta en enfermedades complejas y variables (Bracken, 2005). El polimorfismo en los genes del TNF- α , el receptor Fc γ , el receptor de vitamina D, CTLA-4 y el factor transformante del crecimiento β han sido asociados con el desarrollo de FHD/SCHD. Ciertos factores del hospedero, como la deficiencia de la deshidrogenasa de glucosa-6-fostato (G6PD), podrían también contribuir a la replicación de DENV en monocitos (Martina et al., 2009). Se demostró que el polimorfismo en el gen de la lecitina que une manosa 2 (MBL2) está asociado con trombocitopenia y un incremento en el riesgo de

desarrollar FHD. MBL es un miembro importante de la familia de las colectinas y se asume que tiene un papel importante en los patrones de reconocimiento y la defensa inmune innata (Thiel et al., 2006). El riesgo de desarrollar FHD/SCHD después de la infección con DENV probablemente este determinado por una combinación de múltiples características genéticas comunes, cada una con efectos moderados, predisponen a las formas severas de la enfermedad (Martina et al., 2009). Se ha propuesto que los casos más graves de la enfermedad sean resultado de un conjunto de factores tanto individuales (del hospedero), epidemiológicos como virales, que en su conjunto predisponen a la población a desarrollar Dengue Severo (Figura 1.8).

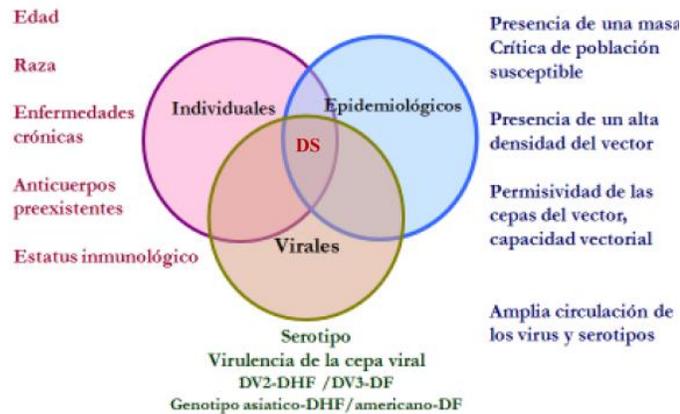


Figura 1.8. Interacción de factores que determinan el cuadro clínico del Dengue Severo (DS). Tomado del CDC 2009.

1.6 Patogénesis de la FHD

En la FHD se presenta una coagulopatía por consumo asociada a CID (Lei et al, 2001). La patogenia de las formas severas de FHD grados I y II aún se desconoce, pero se ha propuesto que podría ser explicada por una elevada concentración de citocinas pro-inflamatorias que causan un incremento en la permeabilidad vascular. La mayoría de los mediadores que favorecen la vasculopatía afectan la organización de las uniones adherentes (AJ, Adhesion Junction), una red compleja de proteínas de adhesión que están unidas al citoesqueleto celular (Dejana et al., 2009), causando retracción de las células endoteliales (CE) y apertura de los espacios intercelulares. Los sitios anatómicos dañados en pacientes con trombocitopenia severa son los espacios intercelulares en las vénulas postcapilares, que son ricas en AJ (Nachman y Rafii, 2008). Las plaquetas tiene un papel importante en mantener la integridad de los AJ, al liberar una serie de factores como el factor de activación plaquetario y la esfingosina-1-fosfato, que se liberan como resultado del estrés del flujo (Aoki et al., 2007). Por lo tanto, la interrupción de la interacción plaqueta-CE por la trombocitopenia severa o la disfunción plaquetaria podrían llevar al incremento en la permeabilidad vascular, resultando en hemorragias o tendencias incrementadas de hemorragia.

Las alteraciones funcionales del endotelio vascular probablemente son causadas por efectos de la liberación de las citocinas o mediadores inflamatorios durante la infección. El DENV puede infectar CE *in vitro*, lo cual lleva a la producción de citocinas y quimiocinas como IL-6, IL-8 y RANTES (Huang, 2001). Aunque la infección con DENV puede inducir apoptosis de células endoteliales *in vitro*, este

efecto depende del aislado de viral (Avirutnan et al., 1998). Las CE infectadas con DENV son capaces de activar al complemento e inducir la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1. La expresión de ICAM-1 junto con la producción de quimiocinas como IL-8 y RANTES incrementan la adherencia de células polimorfonucleares y mononucleares, respectivamente, resultando en un incremento de la vasopermeabilidad que favorece la liberación de la Trombomodulina, la cual es un marcador de daño celular endotelial. Los anticuerpos anti-DENV co-incubados con CE infectadas también producen incremento en la vasopermeabilidad y Trombomodulina en ausencia del complemento. Se ha propuesto que tanto el efecto citopático inducido directamente por DENV como el daño mediado por el sistema inmune favorecido por el reclutamiento de leucocitos y anticuerpos anti-DENV pueden causar daño estructural a las CE infectadas. Ya que el endotelio tiene un papel crucial en el mantenimiento de la hemostasia, el daño a CE por la infección puede afectar el balance procoagulante-anticoagulante del endotelio e incrementar la tendencia al sangrado, el secuestro de plaquetas por las CE activadas podría también contribuir al desarrollo de la trombocitopenia (Lei et al., 2001). La infección de células endoteliales derivadas de cordón umbilical humano (HUVEC) inhibe la producción de endotelina 1 (ET-1) y de prostaciclina 2 (PGI₂), que afectan a las funciones normales de secreción de moléculas vasoactivas lo que favorece un incremento en la permeabilidad vascular y un desequilibrio en la hemostasia y la coagulación sanguínea (Jiang et al, 1999).

Durante la infección aguda por DENV, los parámetros de la coagulación están alterados como el número de plaquetas, el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) y los parámetros fibrinolíticos como el activador del plasminógeno tisular (tPA) y el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). APTT se prolonga mientras que el tPA decrece. La coagulación y la fibrinólisis están activados y esta activación es más severa en pacientes con FHD/SCHD que en FD (Huang et al., 2001a). APTT y el tiempo de protrombina son indicadores de las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación, respectivamente. Solo APTT, pero no el tiempo de protrombina, se prolonga en la infección por DENV, sugiriendo que un defecto ocurre en la vía intrínseca de la coagulación. Esto puede ser causado por la regulación negativa de la síntesis de factores específicos o por un consumo incrementado de los factores. La hiperfibrinólisis durante la fase aguda de FHD/SCHD es causada por una producción incrementada de tPA. Por lo tanto, la coagulación y la fibrinólisis se activan en la fase aguda de la infección y son neutralizadas por plaquetas y niveles de PAI-1 incrementados en la etapa de convalecencia, un desequilibrio entre la coagulación y la fibrinólisis puede causar hemorragia en FHD/SCHD (Lei et al, 2001).

La trombocitopenia está presente casi siempre en pacientes con Dengue, involucrándose diferentes mecanismos. La supresión de la médula ósea combinada con un incremento en la destrucción periférica de las plaquetas durante las fases febril y de convalecencia temprana de la enfermedad pueden

llevar a una trombocitopenia profunda con un conteo plaquetario tan bajo como 5000 células por μl (Mitrakul, 1987).

Una propuesta creciente ha sido asociar la severidad de la enfermedad a la inmunopatogenia por células T, denominado el “pecado original antigénico”. Durante una infección secundaria por DENV, la expansión de células T de memoria de baja afinidad precede a la respuesta de células T nativas, con mayor afinidad por el nuevo serotipo. Las células T de baja afinidad que dominan la respuesta a infecciones secundarias por DENV no son eficientes para eliminar a las células infectadas (Halstead, 2007). Existe evidencia que indica que la infección secuencial con los diferentes serotipos del DENV podría alterar la respuesta de citocinas de células T CD4+, resultando en la producción de citocinas proinflamatorias contribuyendo con una respuesta alterada de células T CD8+, con una liberación excesiva de citocinas (Mangada et al., 2002). El pecado original antigénico en la respuesta de las células T podría suprimir o retardar la eliminación viral, llevando a una elevada viremia asociada con la inmunopatología (Basu y Chaturvedi, 2008)

También se ha propuesto que la elevada carga viral y la activación incrementada de células T no protectoras, favorecen la presencia de una “tormenta” de citocinas pro-inflamatorias, llevando al incremento en la fuga de plasma, presente en la FHD/SCHD. Se ha encontrado un incremento en los niveles plasmáticos de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, TGF-1 β , TNF α , e IFN γ en pacientes

con infección severa por DENV, en particular en pacientes con SCHD (Tabla 1.2). Otros mediadores y factores solubles que se incrementan en las formas más severas incluyen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, la proteína quimio atrayente de monocitos 1 (MCP-1), el factor de inhibición de migración de macrófagos, la Trombopoyetina, VCAM-1, ICAM-1 soluble, factor de von Willebrand, Trombomodulina, E-selectina, factor tisular (TF), PAI-1 y tPA. Niveles elevados de IL-18 podrían estar asociados con trombocitopenia y niveles elevados de enzimas hepáticas (Martina et al., 2009). IL-8 podría tener un papel importante incrementando la severidad de la enfermedad y la muerte. La coagulopatía que se observa en la FHD puede ser atribuida al menos en parte a los efectos de IL-8. Los niveles locales de IL-8 se asocian a la efusión pleural (Chaturvedi et al., 2000). Durante la infección por DENV, se demostró que las células T CD4+ producen una citocina única llamada factor citotóxico (CF), la mayoría de los pacientes con Dengue muestran presencia de CF elevada en el suero en los casos severos de FHD/SCHD (Agarwal et al., 1998; Chaturverdi et al., 1999). Cuando el CF aislado del suero de pacientes con FHD fue inoculado en ratones, se incrementó la permeabilidad capilar y el daño en la barrera hematoencefálica sugiriendo su participación en la patogenicidad (Mukerjee et al., 1997).

Tabla 1.2. Niveles de citocinas en pacientes con dengue, tomado de Chaturvedi et al,

Cytokines levels in patients with dengue		
Cytokines	DF	DHF
IL-1 β	→	→
IL-2	↑↑	↑
IL-4	↓	↑↑
IL-6	↑	↑↑
IL-8	↓	↑↑
IL-10	↓	↑↑
IL-12	↑↑	↓
IL-13	↓	↑↑
IL-18	↑	↑↑
TNF- α	↑↑	↑↑
IFN- γ	↑↑	↑
TGF- β	↓	↑↑
hCF	↑	↑↑

→, no change; ↓, decrease; ↑, increase; ↑↑, marked increase.

El sistema del complemento es uno de los principales componentes humorales de la inmunidad innata el cual interactúa cercanamente con el sistema hemostático para proveer la primera línea de defensa contra los patógenos. En lo que respecta al DENV, se ha reportado que dentro del periodo de defervescencia, se detectan niveles elevados de los productos de activación C3a y C5a en el plasma, seguido por un consumo acelerado y una reducción marcada de los componentes del complemento (Nishioka, 1974). Por lo tanto, se ha propuesto que la activación del complemento tiene un papel importante en la patogénesis del Dengue. Se ha propuesto que la proteína NS1 favorece la activación del complemento. La unión de anticuerpos (heterotípicos) dirigidos contra NS1 que se expresa en células infectadas podría inducir la activación del complemento. Además, se propone que la proteína NS1 que es secretada de las células infectadas puede activar a los factores del complemento presentes en la fase fluída (Korosu et al., 2007). El complejo C5b-C9 puede desencadenar reacciones celulares y estimular la producción de citocinas pro-inflamatorias que están asociadas con el desarrollo de FHD/SCHD (Avirutnan et al., 2006). El complejo C5b-C9 puede desencadenar

diferentes efectos locales y sistémicos que están asociados con la CID. Es importante entender que las enzimas de la coagulación pueden activar también al sistema del complemento, ilustrando la interacción que existe entre el complemento y el sistema de coagulación (Martina et al., 2009).

Los anticuerpos de reacción cruzada dirigidos a las proteínas virales, especialmente NS1 y plaquetas, sugieren un papel importante en el daño plaquetario durante la infección por DENV (Falconar, 1997). La producción de autoanticuerpos cuyas afinidades se potencian en infecciones secundarias no solo explicaría la destrucción inmune de plaquetas, también plantea una cuestión importante referente a la seguridad de la vacuna contra el Dengue. El mimetismo molecular entre el DENV y proteínas del huésped debería ser considerado en la presencia de autoinmunidad durante la infección por DENV (Lei et al., 2001). Los anticuerpos anti-NS1 actúan como autoanticuerpos que tienen reacción cruzada con CE no infectadas induciendo señalización para la producción de óxido nítrico y apoptosis, esto ha sido confirmado en pacientes con FHD/SCHD, donde los anticuerpos contra NS1 reaccionan con CE e inducen apoptosis por la vía dependiente de caspasas y causan lisis celular en presencia del complemento (Lin et al., 2003).

El hígado se encuentra frecuentemente involucrado durante la infección por DENV tanto en humanos como en el ratón. Diferentes reportes sugieren una asociación entre niveles elevados de enzimas pancreáticas y tendencia espontánea de

sangrado. Algunos casos de hepatitis asociados con Dengue se caracterizan por la presencia de necrosis hepatocítica moderada de la zona media, esteatosis microvesicular y cuerpos concejales (Halstead, 1988). Aunque el DENV fue encontrado en una proporción significativa en hepatocitos y células de Kupffer, se observó poca inflamación dentro del hígado indicando que probablemente la apoptosis y la necrosis observadas fueron inducidas por el virus, la elevada prevalencia de apoptosis sobre la necrosis explica la limitación observada en el hígado, similar a lo que se observa en la fase temprana de la Fiebre Amarilla o la Fiebre Rift Valley. Se ha propuesto que el daño hepático observado en la Fiebre Amarilla, la Rift Valley y la infección por Ébola resulta en una disfunción en la función hepática, lo que se asocia con disminución de la síntesis de factores de la coagulación y el desarrollo de la coagulopatía (Chen y Cosgriff, 2000). Las concentraciones altas de enzimas hepáticas en pacientes con FHD sugiere que el hígado está afectado, pero la participación del daño hepático en la coagulopatía y la severidad de la enfermedad deben ser establecidos (Martina et al, 2009). Los pacientes con infección por DENV tienen niveles altos en suero de RANTES comparados con los de otras infecciones virales. RANTES es una quimiocina que participa en el reclutamiento de linfocitos y células NK a sitios de inflamación, como el hígado que es conocido por ser el sitio de síntesis de la mayoría de los factores de la coagulación. Niveles reducidos de estos factores son el resultado del consumo incrementado o de la síntesis dañada (Lei et al, 2001).

1.7 Ciclo replicativo del DENV

Se ha propuesto que la internalización de los Flavivirus en células blanco, se lleva a cabo por endocitosis mediada por receptor. El DENV se replica en el artrópodo vector antes de ser transmitido a humanos. En una infección natural, los mosquitos infectados depositan los virus en la piel (intradérmicamente) durante la búsqueda e ingesta de sangre. Las células dendríticas son residentes normales de la piel que expresan DC-SIGN en su superficie. Esta lectina es específica para carbohidratos tipo manosa que están presentes en los viriones producidos en células de insectos. Recientemente se ha observado que los dos posibles sitios de glicosilación que están presentes en la proteína E del DENV se utilizan específicamente para el reconocimiento de DC-SIGN. El sitio correspondiente a Asn-153 está conservado entre los diferentes Flavivirus, mientras que el sitio Asn-67 es único para el DENV (Navarro-Sánchez et al., 2003), lo que sugiere que esta lectina tetramérica podría necesitar interactuar al mismo tiempo con más de un azúcar para la internalización eficiente del DENV. Los Arbovirus en la naturaleza se transmiten entre artrópodos y vertebrados, estos virus deben adaptarse a los receptores conservados en ambos hospederos o diversificarse para interactuar con receptores múltiples en hospederos diferentes (Wu et al., 2000; Davis et al., 2006; Klimstra et al., 2003). La replicación es lenta, alrededor de 15 horas posteriores a la infección (Gubler, 1998).

Una vez en el interior de la célula diana, el genoma viral debe ser transcrito. Las partículas virales entran a la célula hospedera por endocitosis mediada por

receptor como se mencionó anteriormente, la proteína E viral se trimeriza y media la fusión de la membrana viral y la celular por acidificación del endosoma. El virus se internaliza, lo que permite la entrada de la nucleocápside al citoplasma con la liberación del genoma viral. Durante la transcripción del RNA se sintetiza un intermediario de cadena negativa, el cual sirve como templado para la producción de múltiples copias de RNA viral. Rondas sucesivas de traducción producen niveles elevados de proteínas virales. La proteína C, la prM y la E, junto con el RNA viral se ensamblan en viriones que se transportan al aparato de Golgi y son secretados. La traducción de la poliproteína se asocia con membranas derivadas del retículo endoplásmico (RE) (Figura 1.9) (Tomlinson et al., 2009).

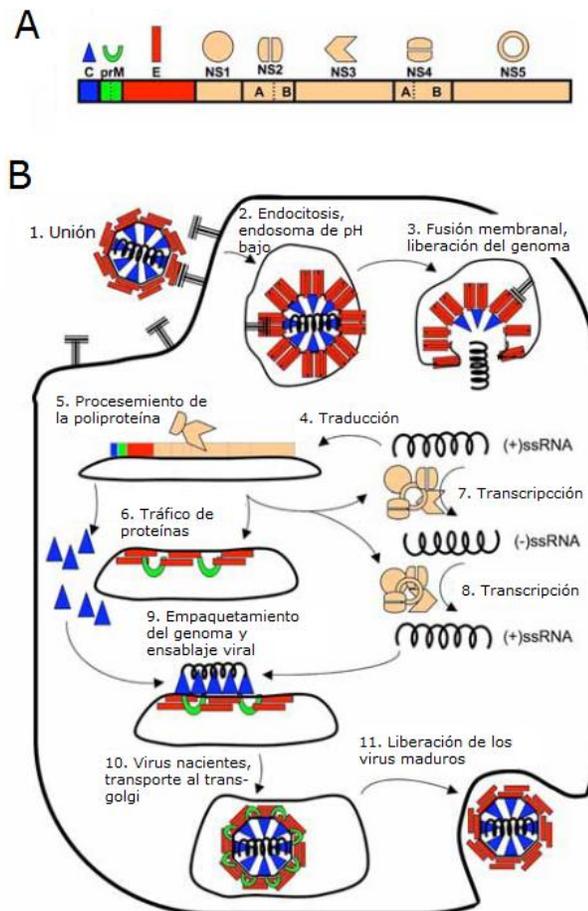


Figura 1.9. Diagrama esquemático de las proteínas del dengue involucradas en las fases del ciclo de replicación viral. (A) Diagrama de la poliproteína del dengue con representaciones gráficas de las proteínas estructurales (C, prM, E) y las no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS4, NS5) involucradas en la replicación viral. (B) Resumen de ciclo replicativo del virus del Dengue, destacando las proteínas virales que probablemente regulen cada etapa de la replicación. La composición detallada del complejo de replicación viral aún no es bien conocido pero se cree que involucra muchas (aunque no todas) las proteínas no estructurales. Modificado de Tomlinson et al, 2009

La poliproteína del DENV es procesada co- y pos-traduccionalmente en tres proteínas estructurales (C, PrM y E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). El tamaño limitado de los genomas de los virus RNA necesita maximización de la capacidad codificante de los genes; por lo tanto, muchas de las proteínas estructurales y no estructurales llevan a cabo múltiples funciones en el ciclo viral. La proteína prM es procesada en proteína M madura en el compartimento trans-Golgi por una furina. Este evento de maduración es necesario para exponer el dominio de unión al receptor de la proteína E y por lo tanto para la infectividad del virus. Se ha propuesto que prM protege a E de la reorganización inducida por un pH ácido y de la fusión prematura durante la secreción y posiblemente sirve como chaperona para el plegamiento propio de la proteína E (Clyde et al., 2006).

En viriones maduros, la proteína E se presenta en forma de homodímero, con el péptido de fusión inaccesible previo a la endocitosis. La proteína está anclada a la membrana viral, pero durante la acidificación del endosoma, presenta cambios conformacionales que inducen la fusión de la membrana del virus y las membranas celulares promoviendo la liberación de la nucleocápside dentro del citoplasma de la célula infectada. La conformación de la proteína E cambia entre los estados inmaduro, maduro y de fusión (Perera et al., 2008). La proteína E del DENV está glicosilada diferencialmente de acuerdo con el serotipo y el tipo celular en el que el virus se propaga, la glicosilación de E se ha implicado tanto en la unión al receptor como a la fusión endosomal (Pokidysheva et al., 2006; Navarro-

Sanchez et al., 2003). La glicoproteína E tiene dos sitios potenciales para la glicosilación tipo N en las posiciones Asn 61 y Asn 153, las cuales se utilizan diferencialmente por los cuatro serotipos (Jonhson et al., 1994). Por otro lado, se conoce que la proteína E contiene los principales epítomos de reconocimiento para los anticuerpos neutralizantes. Estos epítomos son específicos tanto dentro del grupo DENV como dentro del grupo de los Flavivirus (Kurane, 2007).

La proteína C es necesaria para empacar y liberar partículas virales maduras de la célula. La región hidrofóbica terminal de C contiene una secuencia señal para el anclaje de la proteína a la membrana del RE y compartimentación de la proteína prM a la membrana. La porción hidrofóbica de la proteína C promueve la asociación de la proteína de la cápside y la membrana del RE y se ha demostrado que en otros Flavivirus es importante para el ensamble viral, las regiones básicas de la proteína C han sido implicadas en interacción con el RNA viral (Tommlson et al, 2009).

De las proteínas virales no estructurales, las más caracterizadas son la proteína NS3, su cofactor NS2B y la NS5. NS3 presenta diferentes dominios como son: Una proteasa de serina que requiere del cofactor NS2B. NS3 también tiene funciones de trifosfatasa de nucleótidos y helicasa requeridos para la síntesis de RNA viral (Li et al., 1999). La proteína NS5 sirve como RNA polimerasa y metiltransferasa. La glicoproteína NS1 se expresa en tres formas; una residente del RE que se co-localiza con el complejo de replicación viral, una forma anclada a

la membrana y una forma secretada (Lindenbach and Rice, 2003). Las proteínas menos caracterizadas son las proteínas hidrofóbicas NS2A, NS4A y NS4B (Figura 1.10).

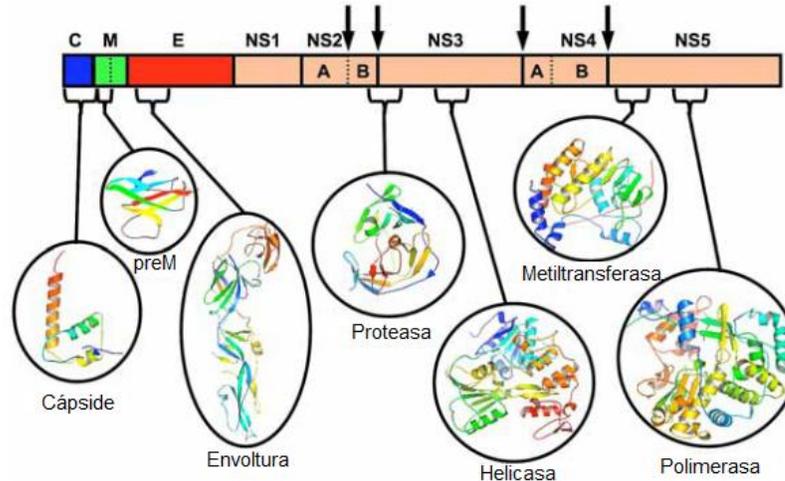


Figura 1.10. Elementos estructurales de la poliproteína del DENV. Las estructuras se muestran para proteínas del dengue individuales determinadas a resolución atómica adecuada para la estructura basada en el descubrimiento y el diseño de fármacos. Las flechas verticales indican sitios de corte de la poliproteína reconocidos por las proteasas NS2B-NS3 del dengue. Modificado de Tomlinson et al, 2009.

1.8 Tropismo celular del DENV

In vitro, se ha demostrado que en el humano el DENV es capaz de infectar diferentes tipos celulares, incluyendo células dendríticas (CD), monocitos/macrófagos, células B, células T, CE, hepatocitos y células neuronales, además de un número de líneas celulares usadas para la propagación viral (Anderson, 2003). Aunque hay un consenso en referencia a que las células del linaje mononuclear fagocítico (monocitos, macrófagos y DC) son los blancos primarios *in vivo*. Recientemente se ha postulado que durante la alimentación del vector, el DENV presumiblemente se deposita en la epidermis y la dermis, resultando en la infección de células de Langerhans inmaduras (CD epidermales) y queratinocitos (Limón-Flores et. al., 2005). Las células infectadas migran del sitio

de infección a los nódulos linfáticos, en donde se reclutan monocitos y macrófagos, por lo que se convierten en blancos de la infección. En consecuencia, la infección se amplifica y el virus se disemina a través del sistema linfático. Como resultado de la viremia primaria, varias células del linaje mononuclear, incluyendo monocitos derivado de sangre, CD mieloides y macrófagos del hígado y de la médula son infectados (Martina et al. 2009).

Jessie y colaboradores (2004) estudiaron diversos tejidos obtenidos de pacientes con FHD/SCHD *postmortem*, de biopsias *antemortem* y de muestras de sangre para demostrar la infección por DENV usando anticuerpos fluorescentes, inmunohistoquímica (IMC), hibridación *in situ* (ISH) y técnicas de microscopía electrónica. Se mostraron antígenos virales en células de Kupffer y CE sinusoidales del hígado; macrófagos, células multinucleadas y células linfoides reactivas en la medula; macrófagos y endotelio vascular del pulmón; en los túbulos del riñón y monocitos y linfocitos de las muestras sanguíneas. Se detectó RNA viral en las mismas células de la médula y de las muestras de sangre por IHC. La señal positiva por ISH en estas células indica un alto número de copias de RNA viral, lo que sugiere replicación. No se detectó daño en CE, sin embargo Limonta y colaboradores (2007) mostraron la presencia de células apoptóticas en pulmón, intestino cerebro y linfocitos en muestras de casos fatales de FHD/SCHD en Cuba. La conclusión del estudio fue que los macrófagos, los monocitos de sangre periférica, las células linfoides reactivas esplénicas y los linfocitos periféricos podrían ser las células dianas de la replicación viral del dengue en la infección natural en humanos (Jessi et al., 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1 Interacción virus-receptor

El primer paso en el ciclo de replicación viral es la unión del DENV con sus posibles receptores. La existencia de estas moléculas es un prerrequisito para la susceptibilidad a la infección de la célula hospedera y es considerada como un determinante del rango de hospedero y del tropismo celular. (Hyypia, 2006).

Los receptores son moléculas de superficie celular que participan en diferentes funciones celulares. Las moléculas receptoras a las cuales se unen los virus en general son principalmente proteínas de membrana y/o carbohidratos. A pesar de la diversidad de los receptores, parece que ciertas proteínas de superficie y carbohidratos son reconocidos preferentemente por los virus, incluyendo la superfamilia de las inmunoglobulinas, las integrinas, además de glicosaminoglicanos como el heparán sulfato (Olofsson and Bergström, 2005). También se ha descrito una preferencia por moléculas involucradas en adhesión celular. Los virus pueden haber evolucionado para unirse a receptores celulares abundantes, o para unirse con alta afinidad a receptores que tienen relativamente baja afinidad por sus ligandos naturales, o para unirse con receptores que tienen ambas características (Dimitrov, 2004).

La mayoría de los virus requieren más de una molécula de superficie celular para unirse e internalizarse (Zeng et al., 1996). Se propone que la interacción celular temprana involucra la concentración de partículas virales a través de un elemento de unión de baja afinidad que ayuda a la presentación y/o transferencia a un

segundo receptor de alta afinidad capaz de unir específicamente e internalizar al virus (Cabrera-Hernandez y Duncan, 2005; Smith y Helenius, 2004). Este elemento de unión de baja afinidad, comúnmente conocido como factor de reconocimiento (co-receptor) o receptor de baja afinidad, concentra las partículas virales en la célula hospedera, estableciendo las condiciones favorables para la unión al receptor de alta afinidad. Se ha propuesto que este receptor interactúa con los virus inicialmente por interacciones electrostáticas de amplio rango, posiblemente no específicas basadas en la atracción de la superficie celular negativamente cargada con cargas positivas en las partículas virales (Sieczkarski and Whittaker, 2004). Las interacciones de baja afinidad entre las proteínas virales y sus receptores involucran una pequeña área de interacción entre los receptores virales y los celulares que no lleva a cambios conformacionales en las proteínas de entrada al contrario de las interacciones de alta afinidad ya que estas involucran un área de interacción amplia entre los receptores celulares y virales y frecuentemente involucran cambios conformacionales importantes (Dimitrov, 2004).

La unión múltiple del virus lleva a incrementar la avidéz y hace que el virus se una virtualmente de manera irreversible. La unión al receptor lleva a la entrada del virus, frecuentemente dentro de endosomas y también desencadena eventos de señalización en la célula. Así mismo, funciona como una señal que induce cambios conformacionales en paralelo o en sucesión (Kalia and Jameel, 2001).

Estos eventos son prerequisites para el desnudamiento, el tráfico y la fusión necesarias para la entrada (Sieczkarski and Whittaker, 2004).

2.2 Receptores descritos para el DENV en hepatocitos y monocitos

Los DENV se unen a la superficie celular del hospedero a través de receptores. La proteína de envoltura del DENV se ha implicado como la proteína de reconocimiento viral (Chen et al., 1996), la identificación del receptor viral en la célula hospedera es menos clara. Se ha sugerido que hay un complejo de internalización que involucra receptores tanto de baja afinidad para concentrar los virus en la superficie como de alta afinidad además de receptores específicos que permiten la unión e internalización viral (Cabrera-Hernández y Duncan, 2005). Diferentes grupos han observado que los glicoconjugados participan en la unión del DENV en diferentes líneas celulares humanas, líneas celulares de mamífero y líneas de insectos. Se ha propuesto que el DENV se une al heparán sulfato, el cual actúa como un co-receptor ayudando a concentrar los virus en la superficie celular (Germi et al., 2002). Se han propuesto un número de diferentes receptores, entre otros; las proteínas de choque térmico de 70 kDa (hsp70) y hsp90 (Valle et al., 2005), GRP78/BiP (Jindadamrongwech et al., 2004), CD14 (Chen et al., 1999), y el receptor de alta afinidad a laminina de 37-kDa/67-kDa (Thepparit and Smith, 2004), además de DC-SIGN (Tassaneetrithep et al., 2003).

Las células del linaje monocito/macrófago han sido postuladas como principales blancos para el DENV. Los monocitos tienen un papel fundamental en la exacerbación de la viremia durante una infección secundaria. En humanos se ha

propuesto que el DENV infecta a los monocitos-macrófagos ya sea mediante la unión de un complejo virus-anticuerpo el cual es reconocido por el receptor Fc del macrófago (facilitación mediada por anticuerpos) o mediante su interacción directa con un receptor específico (el cual no está totalmente definido hasta ahora).

Chen y colaboradores en 1999 reportaron la inhibición de la infección por DENV de monocitos humanos en presencia de LPS (dependiente de CD14), sugiriendo que una molécula no identificada acoplada a CD14 actúa como receptor del DENV. Reyes del Valle y colaboradores en 2005 identificaron una proteína de 84 kDa como la proteína de choque térmico de 90 kDa (hsp90). Las hsp son una familia de chaperonas moleculares altamente conservadas con una localización intracelular amplia y que asisten en la estructura correcta de las proteínas *in vivo*, participando en la respuesta al estrés. Además de su localización intracelular, algunos miembros de la familia se localizan en la superficie, en microdominios resistentes a detergentes (balsas lipídicas), donde participan en una variedad de funciones como co-receptores para diferentes ligandos y virus.

Otro órgano que tiene un papel importante durante la infección por DENV es el hígado. Los estudios clínicos señalan que los casos de Dengue Severo frecuentemente se asocian con hepatopatía presentando un incremento en las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y aminotransferasa de alanina (ALT) en el suero, proponiéndose como indicadores de severidad.

Aunque el daño al hígado en las formas severas del Dengue ha sido bien documentado, no es claro cuál es el receptor que participa en el contacto inicial entre el virus y los hepatocitos. En 2004, Thepparit y Smith identificaron el receptor de alta afinidad a la laminina de 37/67 kDa expresado por la línea celular HepG2 como posible receptor del DENV. El cual es un receptor tipo no-integrina de superficie celular que media interacciones de alta afinidad entre las células y la laminina, que se expresa en varios tipos de tejidos incluyendo las células hepáticas, además de estar sobre-expresado en células de carcinoma hepático (Kim et al., 2005). Se ha sugerido una asociación de este receptor con otras glicoproteínas de superficie, incluyendo al heparán sulfato. Thepparit y Smith reportaron que existe un efecto aditivo en la internalización de DENV entre el heparán sulfato y el receptor de alta afinidad a la laminina de 37/67 kDa. Sin embargo, ya que el receptor de 37/67 kDa se expresa en muchos tipos celulares mientras que solo algunas de ellas son susceptibles a la infección por DENV (Cabrera-Hernández y Duncan, 2005).

Asimismo, en 2004 Jindadamrongwech y colaboradores identificaron a la proteína relacionada con la glucosa GRP78 (BiP) como proteína de unión al DENV. GRP78 es un homólogo de las proteínas de choque térmico y se localiza principalmente en el RE donde podría funcionar para asistir en el plegamiento correcto de las proteínas. Su presencia en la superficie celular también se ha demostrada.

2.3 Glicoconjugados como receptores

La presencia ubicua de diferentes glicoconjugados de superficie celular en diferentes tejidos ha sido utilizada por varios microorganismos patógenos, durante la adhesión e invasión tisular (Tabla 2.1) (Rostand y Eskon, 1997). El reconocimiento de receptores glicosilados representa una interacción temprana crucial para una serie de eventos complejos durante la invasión celular de microorganismos patógenos (Dinglasan y Jacobs-Lorena, 2005).

Tabla 2.1. Ejemplos de los componentes de superficie involucrados en la entrada de más de un virus en las células. Tomado de Baranowski et al., 2001.

Receptor class	Cellular structure*	Virus (Family)*
Cell adhesion and cell-cell contact proteins	CXCR4 (TM7 family) CD4 (Ig superfamily) α -Dystroglycan Integrins	HIV, SIV, FIV (<i>Retroviridae</i>) HIV, SIV (<i>Retroviridae</i>); HHV-7 (<i>Herpesviridae</i>) LCMV, Lassa fever virus (<i>Arenaviridae</i>) Adenovirus 2, 3, 12 (<i>Adenoviridae</i>); FMDV, coxsackievirus (A9, B1, B3, B5), echovirus (1, 8, 9 Barty); human parechovirus 1 (<i>Picornaviridae</i>); hantavirus (<i>Bunyaviridae</i>); human papillomaviruses (<i>Papovaviridae</i>); rotavirus SA11 (<i>Reoviridae</i>)
	ICAM-1 (Ig superfamily) MHC I (Ig superfamily)	Major group HRV, coxsackievirus (A13, A18, A21) (<i>Picornaviridae</i>) SV40 (<i>Papovaviridae</i>); adenovirus 5 (<i>Adenoviridae</i>); coxsackievirus A9, echovirus 7 (<i>Picornaviridae</i>)
Complement control protein superfamily	CD46 DAF (CD55)	Measles virus (<i>Paramyxoviridae</i>); HHV-6 (<i>Herpesviridae</i>) Coxsackievirus (A21, B1, B3, B5), echovirus (3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33), enterovirus 70 (<i>Picornaviridae</i>)
Other proteins	Aminopeptidase-N CAR (Ig superfamily) LDLR protein family	Human coronavirus 229E, TGEV, FIPV, CCV (<i>Coronaviridae</i>) Coxsackievirus (B1-B6) (<i>Picornaviridae</i>); adenovirus 2, 5 (<i>Adenoviridae</i>) Minor group HRV (<i>Picornaviridae</i>); HCV, BVDV (<i>Flaviviridae</i>); subgroup A avian leukosis and sarcoma virus (<i>Retroviridae</i>)
	PVR and related proteins HveB and HveC (Ig superfamily)	Poliovirus (<i>Picornaviridae</i>); HSV (<i>Herpesviridae</i>)
Extracellular matrix components and sugar derivatives	Heparan sulfate glycoaminoglycan	HSV, human cytomegalovirus, BHV, PRV (<i>Herpesviridae</i>); HIV (<i>Retroviridae</i>); vaccinia virus (<i>Poxviridae</i>); adenovirus 2, 5 (<i>Adenoviridae</i>); AAV2 (<i>Parvoviridae</i>); Dengue virus, CSFV (<i>Flaviviridae</i>); FMDV (<i>Picornaviridae</i>); Sindbis virus (<i>Togaviridae</i>); HRSV (<i>Paramyxoviridae</i>); human papillomavirus (<i>Papovaviridae</i>)
	Sialic acid (N-acetylneuraminic acid, N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid)	Influenza virus (<i>Orthomyxoviridae</i>); reovirus type 3, group A porcine rotavirus (<i>Reoviridae</i>); human coronavirus OC43, BCV, TGEV (<i>Coronaviridae</i>); adenovirus 8, 19a, 37 (<i>Adenoviridae</i>); Sendai virus, human parainfluenza virus 3, NDV (<i>Paramyxoviridae</i>); bovine enterovirus, TMEV strain DA, HRV 87 (<i>Picornaviridae</i>)

*Abbreviations of cellular structures: CAR, coxsackievirus-adenovirus receptor; DAF, decay-accelerating factor; Hve, herpesvirus entry protein; ICAM-1, intracellular adhesion molecule type 1; Ig, immunoglobulin; LDLR, low-density lipoprotein receptor; PVR, poliovirus receptor; TM7, transmembrane seven. Abbreviations of virus names: AAV2, adeno-associated virus type 2; BCV, bovine coronavirus; BHV, bovine herpesvirus; BVDV, bovine viral diarrhoea virus; CCV, canine coronavirus; CSFV, classical swine fever virus; ECMV, encephalomyocarditis virus; FIPV, feline infectious peritonitis virus; FIV, feline immunodeficiency virus; FMDV, foot-and-mouth disease virus; HCV, hepatitis C virus; HHV, human herpesvirus; HIV, human immunodeficiency virus; HRSV, human respiratory syncytial virus; HRV, human rhinovirus; HSV, herpes simplex virus; LCMV, lymphocytic choriomeningitis virus; NDV, Newcastle disease virus; PRV, pseudorabies virus; SIV, simian immunodeficiency virus; SV40, simian virus 40; TMEV, Theiler's encephalomyelitis virus; TGEV, transmissible gastroenteritis virus.

La superficie externa de las células procariontas y eucariotas, están cubiertas con una densa capa de glicanos (oligosacáridos o polisacáridos), los cuales se revelaron por primera vez mediante microscopía electrónica y a los que se les llamo glicocalix. Estos azúcares están unidos covalentemente a proteínas o

lípidos, y forman varias estructuras que son específicas de cada tipo celular. En células eucariontes, los principales mecanismos para que las superficies celulares se glicosilen, se lleva a cabo a través de la vía biosintética del RE-aparato de Golgi (Varki, 2007). La glicosilación favorece el incremento en la diversidad y funcionalidad de las proteínas.

Se han descrito tres tipos de glicosilación: N, O y C (Rogers y Heise, 2009). Los glicanos son macromoléculas esenciales para numerosos procesos celulares, como señalización, soporte estructural, interacciones célula-célula, adhesión, crecimiento, protección y tráfico vesicular (Roseman, 2001).

2.4 El ácido Siálico

2.4.1 El ácido Siálico como receptor viral.

El ácido Siálico (Sia) es una molécula con carga negativa, que es muy abundante en la superficie celular en diferentes glicoconjugados. Estas moléculas han sido propuestas como co-receptores de adhesión de baja afinidad para diferentes virus, participando en el tropismo y propagación viral, determinando el rango de especificidad del hospedero durante la infección por virus (Eash et al., 2004). Algunos ejemplos de virus que interaccionan con Sia son los reovirus, favoreciendo la concentración de partículas virales en la superficie celular y por lo tanto, incrementar la probabilidad de interacción con algún receptor de elevada afinidad (Barton, et. al, 2003). En el caso del virus de la influenza humana, la infección de células diana se lleva a cabo mediante el reconocimiento de Sia en

conformación $\alpha 2,6$, mientras que los virus aviares se unen preferencialmente al Sia en configuración $\alpha 2,3$, lo que confiere especificidad de especie (Sugrue, 2007). Por otra parte, los virus pertenecientes a la familia Adenoviridae también interactúan con estructuras sializadas. El Ad37 se une preferentemente a Sia en uniones $\alpha 2,3$ en la córnea y células conjuntivales (Arnberg et al., 2000). El enterovirus 70 también reconoce Sia $\alpha 2,3$ como receptor y está asociado a conjuntivitis menos severa pero más contagiosa, designada como conjuntivitis aguda (Nokbeth et al., 2005). Asimismo, Sia es un elemento crucial en el complejo del receptor de los virus BK y JC los cuales permanecen a la familia Polyomaviridae y causan infecciones subclínicas. La activación de virus BK produce nefropatía en trasplantes de riñón mientras que la activación del virus JC está asociada con la leucoencefalopatía progresiva multifocal en pacientes con inmunosupresión severa. La unión del virus JC a células permisivas (células gliales y células B) depende de Sia en unión $\alpha 2,6$ (Liu et al., 1998), el virus BK se une a gangliosidos que contienen Sia $\alpha 2,3$ como GD1a (Sinibaldi et al., 1990). Otro ejemplo de virus que interactúan con Sia son los virus adenoasociados (AAV) tipos 4 y 5. Estos virus pertenecen a la familia Parvoviridae y son conocidos por no causar enfermedad clínica en el humano por lo que los miembros de la familia AVV han sido considerados como vectores virales para la terapia génica. A pesar de pertenecer a la misma familia, los virus AVV4 se unen preferencialmente a Sia $\alpha 2,3$ localizados en O-glicanos e infectan células epidermales mientras que los AVV5 se unen a Sia $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ unidos a N-glicanos e infectan preferencialmente células parenquimales (Kaludov et al., 2001).

2.4.2 Estructura y función del ácido siálico

El término ácido siálico indica un nombre general para los azúcares de nueve carbonos que incluyen al ácido N-acetilneuramínico, ácido N-glicolilneuramínico y al ácido 2-ceto-3-deoxi-D-glicero-D-galactonónico (α -D-KDN) (Blix et al., 1956). Los Sia comparten un esqueleto de nueve carbonos y son los azúcares más diversos encontrados en las cadenas de glicanos de las superficies celulares de mamíferos. Una variedad de uniones a la cadena en la posición 2 y varios tipos de sustituciones en las posiciones 4, 5, 7, 8, y 9 generan esta diversidad (Varki and Varki, 2007). El ácido siálico se encuentra típicamente terminando las cadenas de N-glicanos, O-glicanos y glicoesfingolípidos (gangliósidos), usualmente está unido a galactosa y el más frecuente en humanos es el ácido N-acetilneuramínico, que se presenta principalmente en 3 configuraciones: α 2,3, α 2,6 y α 2,8 (Figura 2.1) (Kumlin et al., 2008). Cada especie expresa un “sialoma” distintivo, un término definido como el arreglo total de los tipos de Sia. El sialoma difiere entre el tipo celular, variando con respecto al tiempo, espacio y condiciones ambientales. La expresión elevada de Sia en las membranas celulares, en el interior de las membranas lisosomales y en las glicoproteínas secretadas sugiere que tiene un papel en la estabilización de moléculas y membranas, además de modular interacciones con el ambiente. El Sia puede proteger moléculas y células del ataque de proteasas o glicosidasas, extendiendo su vida y su función. Además, pueden regular la afinidad de los receptores y modular procesos involucrados con la señalización transmembranal, crecimiento y diferenciación (Varki et al., 1999). Los Sia han sido encontrados en el reino animal, desde los equinodermos hasta

los seres humanos. Están ampliamente distribuidos en tejidos humanos y en diferentes fluidos incluyendo el suero, fluido cerebro-espinal, saliva, orina, fluido amniótico y leche materna, encontrándose en niveles elevados en el cerebro, glándulas adrenales y el corazón (Matsuno and Suzuki, 2008). Asimismo, Sia se presenta en algunos protozoos, virus y bacterias (Traving and Schauer, 1998).

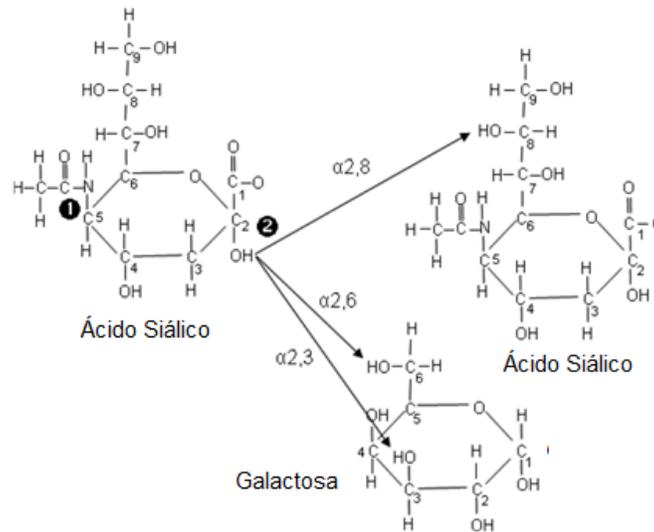


Figura 2.1. Estructura del ácido siálico y sus enlaces glicosídicos con sacáridos adyacentes. 1 corresponde al sitio de N-acilación (glicolil o acetil) y el 2 corresponde al sitio de enlaces glicosídicos α 2,3; α 2,6 y α 2,8 entre el Sia y la galactosa o Sia adyacentes.

Debido a su carga negativa, los Sia están involucrados en la unión y el transporte de moléculas con cargas positivas, además en el fenómeno de atracción y repulsión entre células y moléculas. Su posición terminal en las cadenas de carbohidratos, además de su tamaño y su carga negativa les permite funcionar como un escudo protector de la parte terminal de la molécula (impidiendo que las glicoproteínas sean degradadas por las proteasas) o de la célula (como en el caso de la capa mucosa del epitelio respiratorio) (Figura 2.2). Durante la infección bacteriana, la colonización de bacterias puede ser limitada por la cubierta de Sia

de la superficie celular, otro fenómeno importante es el efecto de propagación que se ejerce en las moléculas que contienen Sia debido a las fuerzas de repulsión que actúan entre las cargas negativas, esto estabiliza la conformación correcta de diferentes enzimas y/o de glicoproteínas membranales (Traving and Schauer, 1998).

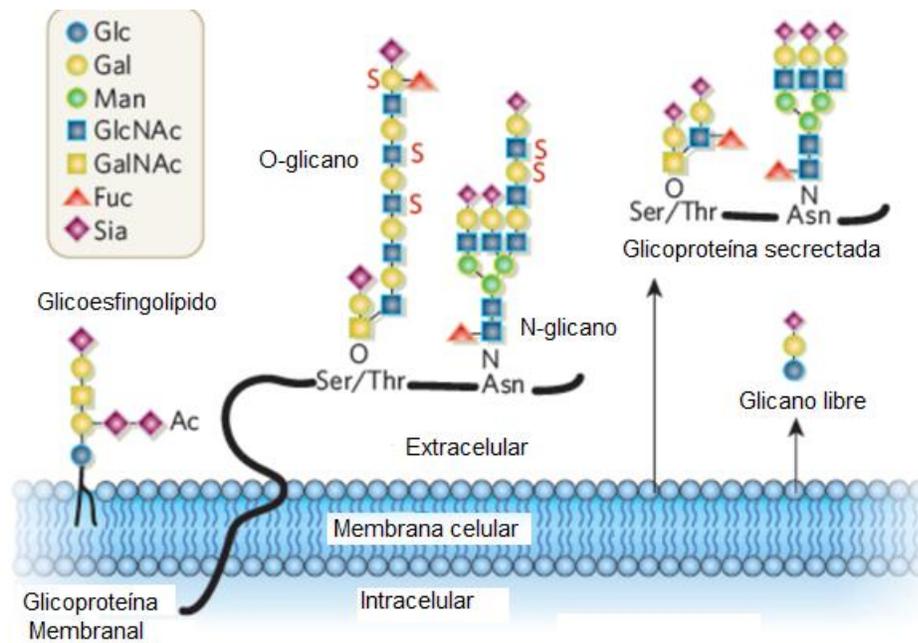


Figura 2.2. Diversidad de la presentación de Ácido Siálico. Los Sia se encuentran típicamente en las posiciones terminales de N- y O-glicanos unidos a la superficie celular o en glicoproteínas secretadas, también en glicoesfingolípidos expresados en la superficie celular. Ac, O-acetil ester; Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Glc, glucosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; Man, manosa; S, sulfato ester. Tomado de Varki and Varki, 2007.

Este grupo de azúcares forman parte de diferentes determinantes antigénicos de la superficie celular, por ejemplo, en la superficie de los eritrocitos formando los grupos sanguíneos. Es un componente necesario de los receptores de muchas moléculas endógenas como hormonas y citocinas. Más aún, el contenido de Sia en los fluidos corporales se han convertido en un método de diagnóstico de cáncer, porque la alteración de los glicanos refleja la influencia de varios tipos de tumores (Narayanan, 1994).

Otro papel importante del Sia es que puede actuar de manera dual al enmascarar o reconocer sitios específicos en la superficie celular. En el primer caso, enmascara sitios antigénicos, receptores y residuos de galactosa. Después de la remoción del Sia, las moléculas y las células pueden unirse, por ejemplo, por macrófagos y hepatocitos, por la vía de receptores que reconocen galactosa, y pueden ser absorbidas y degradadas (Figura 2.3) (Traving and Schauer, 1998).

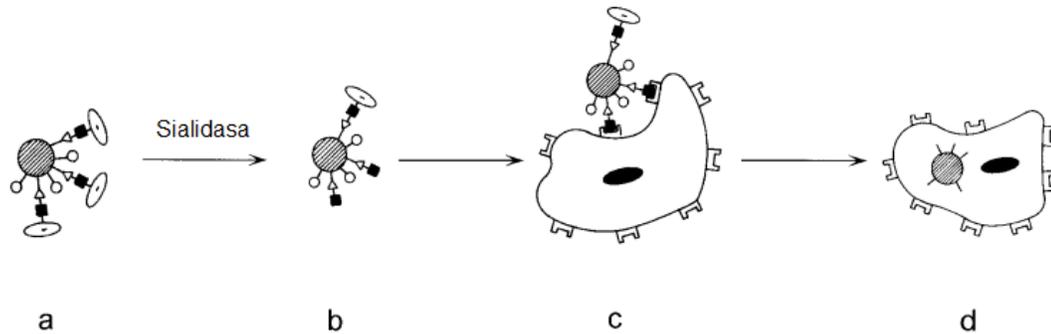


Figura 2.3. La función de enmascarar de los ácidos siálicos: mecanismo de unión (b) y fagocitosis (c) de los eritrocitos tratados con sialidasa por los macrófagos. La sialidación permite a estas células un tiempo de vida largo en circulación. , Sia cargados negativamente; , residuo de galactosa; , otros componentes de membrana; , lectina específica para galactosa en la superficie de los macrófagos. Tomado de traving and Schauer, 1998.

Se postula que los residuos de Sia puedan actuar como ligandos de lo propio que contribuyen al establecimiento de umbrales de activación apropiados ya que interactúan con Siglecs (Sialic Acid Binding Protein). Los siglecs son miembros de la superfamilia de Inmunoglobulinas que unen ácido siálico y están principalmente expresados en células de sistema hematopoyético. El reconocimiento del Sia por los Siglecs podría tener un papel en la regulación del sistema inmune innato (Varki, 2007). Los Sia forman parte de una gran variedad de procesos de reconocimiento entre células y moléculas. Por lo tanto, el sistema inmune puede

distinguir entre estructuras propias y no propias de acuerdo a los patrones superficiales de Sia.

Por otro lado, Sia puede servir como ligando de una variedad de lectinas animales y microbianas (Varki et al., 1999). Además de los efectos bien conocidos del Sia microbiano en la repulsión electrostática, la inhibición de la activación de la vía alterna del complemento por el reconocimiento del factor H y el enmascaramiento de diferentes residuos antigénicos, se ha propuesto recientemente que el ácido siálico de patógenos reconoce a los Siglecs inhibitorios presentes en las células del sistema inmune innato. Por lo tanto, al interactuar con estos Siglecs, los patógenos mandan una falsa señal de lo propio a las células innatas y evitan (ó evaden) el ataque o la respuesta hacia ellos (Figura 2.4) (Chen y Varki, 2010).

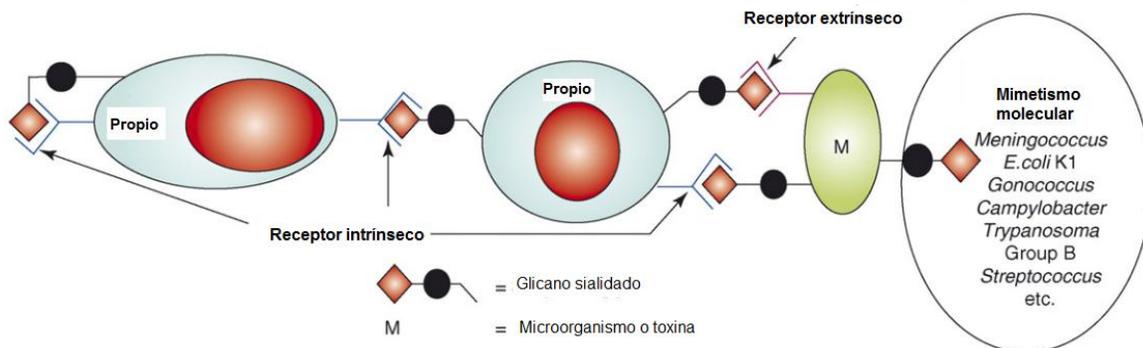


Figura 2.4. Los ácidos siálicos funcionan como componentes de los sitios de unión de varios patógenos y toxinas. En la mayoría de las interacciones, una proteína de unión en el patógeno (receptor extrínseco) reconoce ciertas formas de Sia presentes en uniones específicas en cadenas glicocídicas definidas. Los Sia también funcionan como ligandos para receptores intrínsecos como los Siglecs y el factor H. Se muestran las posibles interacciones entre Sia (como glicanos sialidados) expresados en las células hospederas (propio) con los receptores intrínsecos expresados en la misma o en diferentes células hospederas. Otra función de los Sia es el "mimetismo molecular", en el cual el patógeno expresa por sí mismo Sia, ayudando a la evasión de la inmunidad del hospedero. Estas funciones variadas de los Sia son antagonistas, provocando una carrera evolucionaria en la cual los hospederos vertebrados necesitan mantener los Sia para las funciones críticas endógenas a pesar de cambiarlos constantemente para evitar rápidamente a los patógenos que están uniéndose o evadiéndolos.

2.4.3 Metabolismo del ácido siálico

Las reacciones de la síntesis y degradación del Sia están distribuidas entre los diferentes compartimentos celulares, el azúcar se sintetiza a partir del N-acetilmanosamida-6-fosfato y de fosfoenolpiruvato en el citosol. Después de la desfosforilación del producto de reacción, Neu5Ac-9-fosfato, la molécula es activada en el núcleo por la transferencia de un residuo de citidina monofosfato (CMP) desde una citidina trifosfato (CTP) a través de la CMP-Neu5Ac sintasa. Este nucleótido es el único caso natural de una unión β entre el Sia y otro componente, pues en los glicoconjugados siempre es α , el CMP-Neu5Ac es entonces translocado en el aparato de Golgi o el retículo endoplásmico. Ahí, el Sia es activado y puede ser transferido por una sialiltransferasa a una molécula aceptora, que es una cadena de oligosacáridos de un glicoconjugado naciente. El Sia unido puede ser modificado por O-acetilación u O-metilación antes del transporte del glicoconjugado maduro a la superficie celular, mientras la modificación única que tiene lugar antes de la transferencia en el glicoconjugado es la hidroxilación del grupo N-acetil del CMP-Neu5Ac, que lo lleva a CMP-Neu5Gc en el citosol. La enzima clave en el catabolismo del Sia es la sialidasa. Los residuos de Sia pueden ser eliminados de la superficie celular o de los sialoglicoconjugados del suero por sialidasas unidas a la membrana. Usualmente, los glicoconjugados que están próximos a la degradación son absorbidos por endocitosis mediada por receptor. Después de la fusión del endosoma con un lisosoma, los residuos de Sia terminales son eliminados por sialidasas lisosomales. Las moléculas de Sia libres son transportadas a través de la

membrana lisosomal al citosol desde donde pueden ser recicladas para la activación y transferencia de otro glicoconjugado en el Golgi. Como alternativa son degradadas a acilmanosamina y piruvato con la ayuda de un liasa acilneuraminato citosólica (Figura 2.5) (Traving and Schauer, 1998).

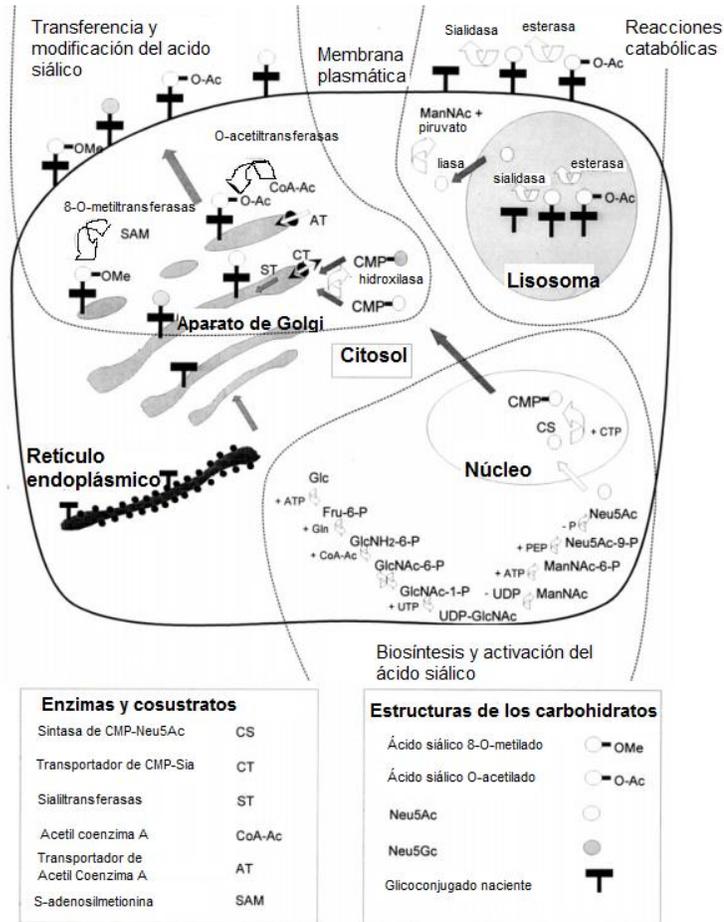


Figure 2.5. Metabolismo de los ácidos Siálicos. Se muestran las reacciones enzimáticas involucradas en la biosíntesis, activación, transferencia, modificación y catabolismo del ácido siálico con su localización intracelular. Tomada de Traving and Schauer, 1998

Las sialiltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de moléculas activadas de CMP-ácido siálico hacia un sustrato aceptor en la red trans-Golgi después de su transporte a través de la membrana del aparato de Golgi. Las estructuras primarias de las sialiltransferasas de muchos tejidos de mamíferos y

de algunas especies de bacterias son conocidas, y hoy existen alrededor de 15 miembros que catalizan las uniones α 2,3, 2,6, 2,8 y 2,9 entre el Sia y el azúcar aceptor, usualmente a una estructura que termine en una galactosa u otro residuo de ácido siálico (Traving and Schauer, 1998).

Las sialidasas o neuraminidasas, son exoglicosidasas que catalizan la remoción de los Sia terminales de los sialósidos y sialoglicoconjugados en la naturaleza. Muchos patógenos expresan sialidasas como enzimas destructoras de receptores como el del virus de la influenza o para liberar Sia para propósitos nutricionales o descubrir receptores subyacentes. Una clase especial de sialidasas son las transialidasas, las cuales catalizan el corte de un enlace sialosídico existente y la formación de uno nuevo simultáneamente. Para muchos patógenos microbianos, se hipotetiza que las sialidasas actúan como factores de virulencia, permitiendo una competencia exitosa con el hospedero favoreciendo su expansión en el tejido del hospedero. Otro posible papel de las sialidasas de parásitos es desenmascarar las estructuras subterminales de la célula hospedera, la cual sirve como receptor de parásitos y las toxinas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado que los glicoconjugados superficiales son moléculas importantes en el reconocimiento de diferentes agentes virales, específicamente aquellos que contienen ácido siálico (Smith and Helenius, 2004). De éstos, el ejemplo más estudiado es el que se lleva a cabo entre la hemaglutinina del virus de la influenza humana A con el ácido siálico de las células del tracto respiratorio.

En nuestro laboratorio, se llevó a cabo un estudio referente a la participación del ácido siálico en las interacciones tempranas del DENV en diferentes tejidos del mosquito *Aedes aegypti*, que es el principal vector de este virus. Se observó que el ácido siálico tiene un papel importante en el reconocimiento específico del DENV en glándulas salivales e intestino del mosquito, estos tejidos son los principales sitios de replicación del DENV en el vector. Esto fue un hallazgo importante ya que los DENV mantienen su ciclo de vida entre el huésped humano y el vector, y la utilización de receptores compartidos es una propuesta aún no estudiada. Por lo tanto, en el presente trabajo se propuso estudiar la participación del ácido siálico en las interacciones tempranas del DENV en monocitos y hepatocitos humanos, pues ambos tipos celulares tienen papeles importantes en el desarrollo de la infección por DENV.

4. JUSTIFICACIÓN

El Dengue es un problema de salud pública muy importante a nivel mundial. En el 90-95% de los casos se presenta como una enfermedad autolimitante, pero en un 5-10% se presentan las manifestaciones severas (FHD/SCHD) de la enfermedad. Los mecanismos patogénicos involucrados en el establecimiento de los casos más severos de la enfermedad, hasta la fecha no han podido ser dilucidados (ya que no existe un modelo animal para su estudio) a pesar de numerosos estudios que se han llevado a cabo en los últimos años. Actualmente no existe una vacuna segura y efectiva ni un tratamiento antiviral específico, por lo que el conocimiento de las interacciones tempranas entre el virus y su célula blanco es importante para identificar la(s) molécula(s) de posible reconocimiento del virus en la superficie. Se eligió a los monocitos ya que se han descrito como las principales células de replicación del virus y en el caso de los hepatocitos, una de las características principales de la enfermedad es la hepatomegalia y la deficiencia de enzimas hepáticas. Con base en estos antecedentes se propuso la siguiente hipótesis:

5. HIPÓTESIS

El ácido siálico presente en la superficie celular de monocitos y hepatocitos humanos puede participar en las interacciones tempranas (unión e internalización) del virus dengue con sus células diana.

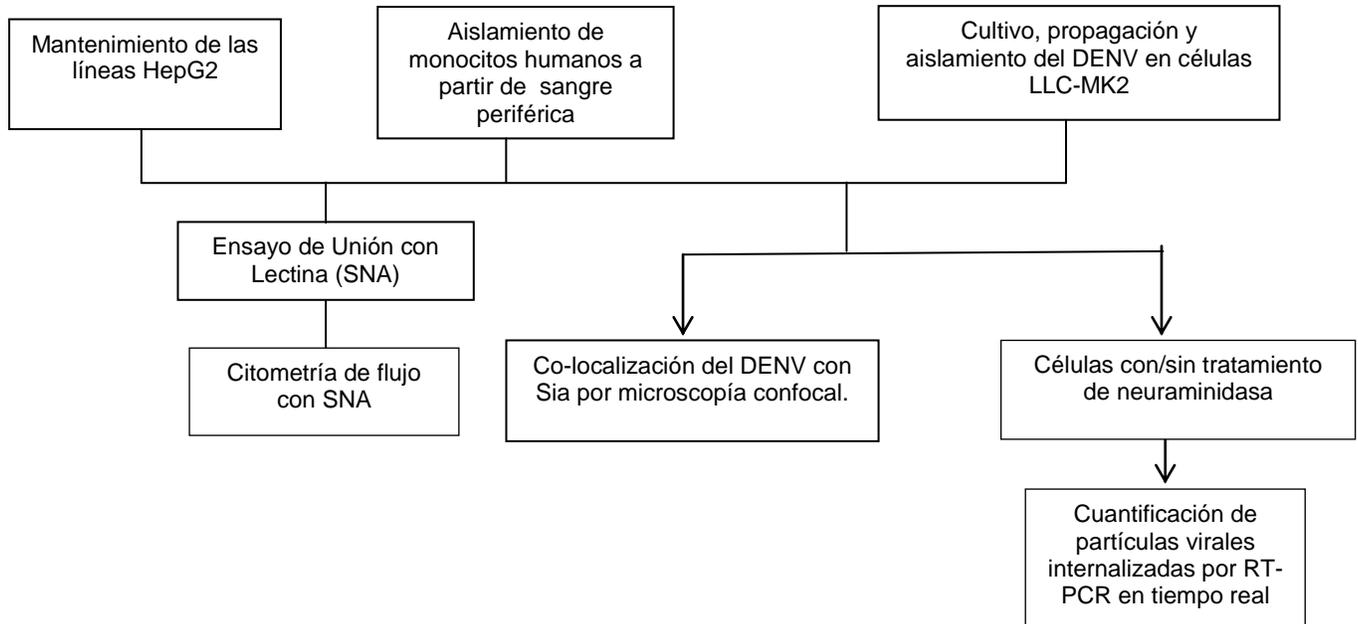
6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la posible participación del ácido siálico (Sia) durante la infección por el virus dengue (DENV) tanto en monocitos como en hepatocitos humanos.

6.1 Objetivos particulares

- Corroborar la presencia de Sia en la superficie de monocitos humanos y hepatocitos mediante el uso de lectinas y por citometría de flujo.
- Evaluar la posible participación de Sia en el reconocimiento del DENV en monocitos y hepatocitos humanos mediante ensayos de co-localización con microscopía confocal.
- Evaluar la posible participación de Sia en la internalización del DENV (en células con y sin tratamiento de neuraminidasa) en monocitos y hepatocitos humanos.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL



8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Cultivo, amplificación y titulación del virus Dengue en células LLC-MK2.

Durante el desarrollo del presente estudio, se utilizó un aislado viral procedente de un caso de Dengue clásico serotipo-2, que es la cepa prototipo del DENV-2, llamada DENV-2 Nueva Guinea-C. Este aislado se propagó, tituló y purificó en células de riñón de mono verde africano LLC-MK2. El serotipo viral se confirmó con ayuda del anticuerpo monoclonal específico Mab8702 (Millopore 92590). La amplificación viral se llevó a cabo en células LLC-MK2 con una confluencia del 80% las cuales se inocularon con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta observar que el efecto citopático (ECP) fuera aproximadamente del 90% (alrededor de 6-8 días). Los sobrenadantes (sn) de cultivo se colectaron y se clarificaron de restos celulares mediante centrifugación a 900 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, los sn se centrifugaron a 16 000 g durante 45 minutos, colectando el precipitado, el cual se almacenó a -70°C hasta su uso. El título viral se determinó mediante ensayo de placa lítica, para lo cual, las células LLC-MK2 se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos con medio MEM (Biowest L415-500) y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta obtener una monocapa al 90% de confluencia. Estos cultivos se inocularon por duplicado, con 100 µL de DENV-2 utilizando diluciones seriadas en base 10 y se incubaron por 2 h a 37°C con 5 % de CO₂. Posteriormente se eliminó el virus no adsorbido y los cultivos se lavaron con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM; pH 7.4). Las monocapas celulares infectadas se cubrieron con 1 mL de medio D-MEM completo (Biowest L0107-500)

con 2% de metil-celulosa y posteriormente se incubaron hasta observar ECP. Finalmente, las células se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 15 minutos. El título viral se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$PFU/mL = n(10)$ (factor dilución) en donde:

n, número de placas contadas

10, factor de corrección

Factor de dilución, dilución correspondiente a la columna en donde se hizo el conteo de placas líticas

8.2 Aislamiento de monocitos de sangre periférica

Para evaluar la interacción de monocitos con el virus DENV-2 se decidió utilizar monocitos humanos extraídos de sangre periférica de donadores sanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Estas células se aislaron y se confirmaron como monocitos con el anticuerpo anti-CD14 (Biolegend, 325606). Brevemente: 40 mL de sangre total de donadores sanos se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Con este procedimiento se separó el suero del paquete globular. El paquete se diluyó con PBS 1X a 1:2 volúmenes, y se vertió en tubos que contenían 15 ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare 17-1440-03) a 4°C, los cuales se centrifugaron a 3300 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, se tomó cuidadosamente el anillo de células polimorfonucleares y se transfirió a tubos con PBS 1X y se centrifugaron a 2100 rpm durante 10 minutos a 4°C. En seguida se decantó el sn, se resuspendió el botón celular en PBS 1X y se repitió 2 veces el lavado. A continuación se lisaron los eritrocitos adicionando 2.5 ml de solución de lisis

(NH₄Cl 385 mM, NaHCO₃ 100 mM, EDTA 0.5 mM) incubándose 3 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo, se completó el volumen a 50 ml con PBS 1X a 4°C y se centrifugaron durante 5 minutos a 2100 rpm. Se repitió 2 veces este último lavado.

Paralelo al aislamiento de las células, se llevó a cabo la inactivación del suero autólogo para adicionarlo al medio de cultivo y así poder obtener mayor porcentaje de adherencia, el suero que se obtuvo de la primera centrifugación se colocó en tubos eppendorff de 1.5 mL y se inactivó a 56°C durante 30 minutos, después se centrifugó a 4600 rpm durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se colocó el suero en un tubo nuevo y se centrifugó a 4600 rpm durante 40 minutos nuevamente, enseguida se calentó 5 minutos a 40°C y finalmente se filtró. Una vez que se tuvieron las células y el suero autólogo, se suplementó el medio RPMI 1640 (Biowest, L0500-500) con Suero Fetal Bovino (SFB) (Biowest, S1650-500) al 2%, el suero autólogo obtenido al 10% y con antibióticos, el botón celular se resuspendió con este medio y se colocaron 2 ml de las células en placas de cultivo de 24 pozos. Finalmente, las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir el proceso de adhesión. Previo al uso para cualquier experimento se lavaron con medio incompleto para retirar los leucocitos no adheridos.

8.2.1 Determinación de monocitos mediante Citometría de Flujo

Los monocitos humanos adheridos a las placas de cultivo, se lavaron 2 veces con medio RPMI 1640 incompleto y se observaron al microscopio óptico con un aumento de 50X. Una vez que se retiraron las células no adheridas, se les adicionó 100 µl del anticuerpo anti-CD14 (Biolegend, 325606) a una dilución de 1:100 en PBS 1X y se incubó por 2 horas protegido de la luz. Posteriormente se lavaron las células agregándoles PBS-Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 0.5% a temperatura ambiente y se procedió a despegarlas, para lo cual, se adicionó 1 ml de PBS 1X a 4°C y se colocaron 5 minutos en hielo. Después, se rasparon con un gendarme y el precipitado celular se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. Al botón celular se le agregó PBS-BSA al 0.5% y se centrifugó 5 min a 1000 rpm, se repitió el lavado 2 veces. Después las muestras se resuspendieron en buffer de adquisición (FacsFluid®). Finalmente las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (FacsCalibur). Los datos de los histogramas se evaluaron con el software CellQuest® y WinMD® Versión 2.9.

8.3 Evaluación de la presencia de Ácido Siálico en la superficie celular mediante marcaje fluorescente con lectina SNA (*Sambucus Nigra* Agglutinin)

Para evaluar que Sia estuviera presente en la superficie de las células humanas que se utilizaron en el presente trabajo, se llevó a cabo un marcaje fluorescente con la lectina *Sambucus Nigra* la cual reconoce Sia en unión $\alpha 2,6$. El experimento se llevó a cabo de la manera siguiente: Las células de los cultivos de monocitos de sangre periférica se desprendieron como anteriormente se mencionó, se contaron en un hemocitómetro (Bright-Line, Hausser Scientific, USA), utilizando 1×10^5

células monocíticas, las cuales se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente en un portaobjetos de vidrio salinizado (Fisherbrand, 12-550-15), después se lavaron 2 veces con PBS 1X durante 5 minutos. Posteriormente se incubaron con 50 μ l de SNA (SIGMA, L6890) previamente biotinilada a una dilución 1:300 en PBS Mg^{2+}/Ca^{2+} a temperatura ambiente protegida de la luz, durante 2 horas. Se repitió el lavado con PBS 1X dos veces más. A continuación se incubó con 50 μ l de estreptavidina acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (SIGMA, S3762) a una dilución de 1:100 en buffer de bicarbonatos ($NaHCO_3$ 0.1M, NaCl 0.1M, pH 8.3) a temperatura ambiente protegido de la luz durante 1 hora. Se lavaron dos veces nuevamente. Finalmente se añadieron 10 μ L de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en solución de montaje (Vectashield, Vector Laboratories Inc., 94010). Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra, sellando los bordes de la laminilla con esmalte incoloro. Se protegieron de la exposición a la luz hasta su evaluación por microscopía confocal (Microscopio Olympus BX51WI equipado con una unidad de disco giratorio -DSU- y una cámara EM-CCD Hamamatsu). La captura se realizó con el software StereoInvestigator® (MicroBrightfield.) y el análisis se llevó a cabo utilizando el programa ImageJ.

Para el caso de los hepatocitos, se utilizó la línea celular HepG2 (derivada del tejido hepático de un hombre caucásico americano de 15 años con un carcinoma hepatocelular bien diferenciado), el procedimiento fue el mismo con la siguientes modificaciones: a partir de hepatocitos cultivados en una caja de cultivo con medio DMEM alto en glucosa suplementado con SFB al 10%, las células se tripsinizaron

durante 5 minutos hasta observar que presentaban una morfología redonda. Posteriormente se retiró la tripsina, se resuspendieron en medio y se sembraron en un cámara deslizable con 8 compartimentos individuales con cubreobjetos (Nunc, 177402). Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir el proceso de adhesión y antes del ensayo de marcaje fluorescente se lavaron todos los compartimentos con PBS 1X.

Para ambos casos, el control negativo no se incubó con la lectina SNA en su lugar se adicionó PBS Mg²⁺/Ca²⁺, pero si se incubó con estreptavidina acoplada a FITC.

8.4 Evaluación de la presencia Ácido Siálico en superficie celular mediante Citometría de Flujo con lectina SNA.

Paralelamente al experimento anterior, con el objetivo de evaluar por otro método, la presencia de Sia en superficie de los monocitos humanos y hepatocitos, se llevó a cabo un ensayo de citometría de flujo utilizando la lectina SNA. Primero, las células se desprendieron de sus cajas de cultivo agregándoles PBS-BSA al 0.5% a 4°C, se rasparon con un gendarme y se centrifugaron a 2000 rpm x 5 minutos. Se decantó el sn y el botón celular se resuspendió con medio de cultivo al 2% de SFB y se agregaron 5 x 10⁵ células en tubos eppendorff individuales. Se centrifugaron nuevamente y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sn y se incubaron con 500 µl de SNA biotinilada a una dilución 1:300 en PBS Mg²⁺/Ca²⁺ durante 2 horas protegidas de la exposición de la luz. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron nuevamente. Se

incubaron con 500 μ l de estreptavidina-FITC a una dilución 1:300 en buffer de bicarbonatos durante 1 hora. Se realizó otro lavado y se resuspendió el botón celular en buffer FACS. Finalmente las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo (Facscalibur). Los datos de los histogramas se evaluaron con el software CellQuest® y FlowJo® Versión 7.6.1.

Para ambos casos, el control negativo no se incubó con la lectina SNA en su lugar se adicionó PBS Mg^{2+}/Ca^{2+} , pero si se incubó con estreptavidina acoplada a FITC.

8.5 Evaluación de la interacción del DENV con Sia en la superficie celular mediante ensayos de co-localización

Para determinar si Sia interacciona con DENV en la superficie celular se realizó un ensayo de co-localización marcando ambos elementos con fluoróforos diferentes y analizando las muestras a través de microscopía confocal. A partir de los cultivos celulares de monocitos de sangre periférica y hepatocitos HepG2; se ajustaron 5×10^5 células que se sembraron en una cámara deslizable con 8 compartimentos individuales con cubreobjetos, y se incubaron durante 24 horas para permitir el proceso de adhesión. Posteriormente se lavaron con PBS-BSA 0.5% en agitación constante en dos ocasiones. Después se incubaron con DENV-2 NGC a una MOI de 25 durante 1 hora a 4°C, lo anterior para permitir el reconocimiento y la unión a los receptores, más no la internalización. A continuación se lavaron con PBS-BSA 0.5% durante 5 minutos. Después, se incubó con PBS-BSA al 3% para bloquear los sitios inespecíficos y se repitió el lavado. Primero se procedió a marcar al virus incubando la muestra con 100 μ l del anticuerpo anti-DENV2 monoclonal (Millipore,

MAB8702) a una dilución 1:200 en PBS 1X durante 2 horas a temperatura ambiente protegido de la exposición de la luz, posteriormente se lavó 2 veces. En seguida, se incubó con 100 µl del anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 555 (Invitrogen A31570) durante 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz y después se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos. Después se procedió a marcar el Sia incubando la muestra con 100 µl de la lectina SNA biotinilada en PBS Mg^{2+}/Ca^{2+} a una dilución 1:300 durante 2 horas, a temperatura ambiente cubierto de la luz. Se repitió el lavado en dos ocasiones más. Posteriormente, se incubó con 100 µl de estreptavidina acoplada a FITC a una dilución 1:100 en buffer de bicarbonatos durante 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz. A continuación se realizaron 3 lavados en agitación constante para retirar todos los complejos sin unir. Finalmente se añadieron 10 µL de DAPI en solución de montaje (Vectashield, Vector Laboratories Inc., 94010). Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra, sellando los bordes de la laminilla con esmalte incoloro. Se protegieron de la exposición a la luz hasta su evaluación por microscopía confocal (Microscopio Olympus BX51WI equipado con una unidad de disco giratorio -DSU- y una cámara EM-CCD Hamamatsu). La captura se realizó con el software StereoInvestigator® (MicroBrightfield.). Las imágenes obtenidas y los índices de co-localización fueron analizados con el software Macbiophotonics, el cual es una extensión del programa ImageJ y se utilizaron los plugin de “Colocalization Finder” e “Intensity Colocalization Analysis” (Rusband, 1997-2012).

Para los controles negativos, el procedimiento fue el mismo pero en células sin infectar con y sin la incubación de la lectina SNA y del anticuerpo monoclonal anti-

DENV2, en su lugar se adicionó PBS Mg²⁺/Ca²⁺ y PBS 1X respectivamente en cada caso. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se eligió una foto representativa de la co-localización.

8.6 Evaluación de la internalización del DENV en presencia o ausencia de Sia mediante retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real)

8.6.1 Ensayo de internalización viral

Para evaluar la posible participación de Sia durante la internalización celular del DENV, se llevó a cabo un ensayo de internalización viral en células con o sin tratamiento de neuraminidasa, ya que esta enzima cataliza la remoción de Sia en cualquier tipo de enlace. En los ensayos de internalización utilizamos la retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real). Para el tratamiento con neuraminidasa utilizamos 5 x 10⁶ células (monocitos y hepatocitos) que se incubaron con 0.05 U/μl de neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Roche, 1158986001) durante 2.5 horas a 37°C, posteriormente se lavaron una vez con medio fresco. Las células con y sin tratamiento de neuraminidasa se incubaron con DENV-2 a MOI 5 y MOI10 a 37°C durante 1.5 horas para permitir la internalización viral y después se lavaron una vez con PBS/Ca²⁺ para retirar los virus no adheridos. A continuación se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂ antes de la extracción del RNA viral.

Todos los tratamientos se hicieron por duplicado, para los controles negativos se utilizaron células que no se incubaron con virus y para los controles positivos se

utilizaron células tratadas con tripsina al 0.075% durante 20 minutos a 37°C, esto para retirar proteínas de la membrana celular y posibles receptores del DENV-2.

8.6.2 Purificación del RNA viral

Posterior al ensayo de internalización se procedió a extraer el RNA viral usando el mini kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Hamburg, Germany) con varias modificaciones. Brevemente, se adicionaron 280 µl de la solución acarreadora-lítica a las muestras y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se recuperó el lisado celular y se agregó etanol (100%) para precipitar los ácidos nucleicos. La muestra se transfirió a un cartucho de giro, el cual contiene una columna con un tubo de recolección, se centrifugó a 6000 g durante 2 minutos. Después, la columna se transfirió a un tubo de recolección limpio, se desechó el filtrado. Se agregaron 500 µl de buffer AW1 y se centrifugó nuevamente. La columna se volvió a transferir a un tubo limpio, se adicionaron 500 µl del buffer AW2 y se centrifugó nuevamente. Finalmente la muestra se eluyó en 60 µl de buffer AVE y se almacenó a -70°C.

8.6.3 RT-PCR en tiempo real

Para evaluar la internalización del DENV en las células blanco (hepatocitos y monocitos) se determinó el número de copias del RNA viral mediante retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real usando el kit TaqMan (Perkin Elmer Applied Biosystem). Para la retrotranscripción se utilizaron sondas específicas que permitieron amplificar el

RNA del DENV-2, se utilizó la secuencia 3'RNT (región 3' no traducible) del virus que es muy conservada, la cual se muestra en la siguiente tabla:

Serotipo	Extremo 5´	Extremo 3´
D2	10301	10708

Se utilizó la sonda anteriormente mencionada marcada con el fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM) como tinte reportero (Applied Biosystems, Part Number 4331348, life technology). Para el procedimiento se utilizaron 5 µl de RNA purificado, adicionando 1µl de sonda, 0.5 µl de la enzima multisstep 40x, 10 µl de buffer y 20 µl de agua por cada muestra. El RT-PCR en tiempo real se llevó a cabo en un equipo Step-One (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción para la RT-PCR fueron las siguientes:

ETAPA	TIEMPO (MIN)	TEMPERATURA °C
Retrotranscripción	60	37
Desnaturalización	15 seg	95
Unión y extensión	1	60
Conservación final	10	4

PCR
40 ciclos

Se utilizó un concentrado de DENV-2 con un número de copias conocido previamente como curva estándar en cada ciclo de replicación para determinar el número de copias de RNA viral en cada muestra.

9. Resultados

9.1 Amplificación y titulación del DENV-2 en células LLC-MK2

El cultivo, cosecha y titulación del DENV-2 NGC, se llevó a cabo en la línea LLC-MK2. En la figura 9.1A se muestra una monocapa homogénea de células sin infectar, mientras que la figura 9.1B se observa un cultivo de ocho días post infección con DENV-2 a MOI1 que presenta el desprendimiento celular o la formación de placas líticas (Figura 9.2) debido al efecto citopático ocasionado por la infección viral que altera la integridad de la monocapa. Una placa lítica se produce cuando una partícula vírica infecta una célula, se replica y posteriormente provoca la muerte de dicha célula produciendo espacios intracelulares en la monocapa.

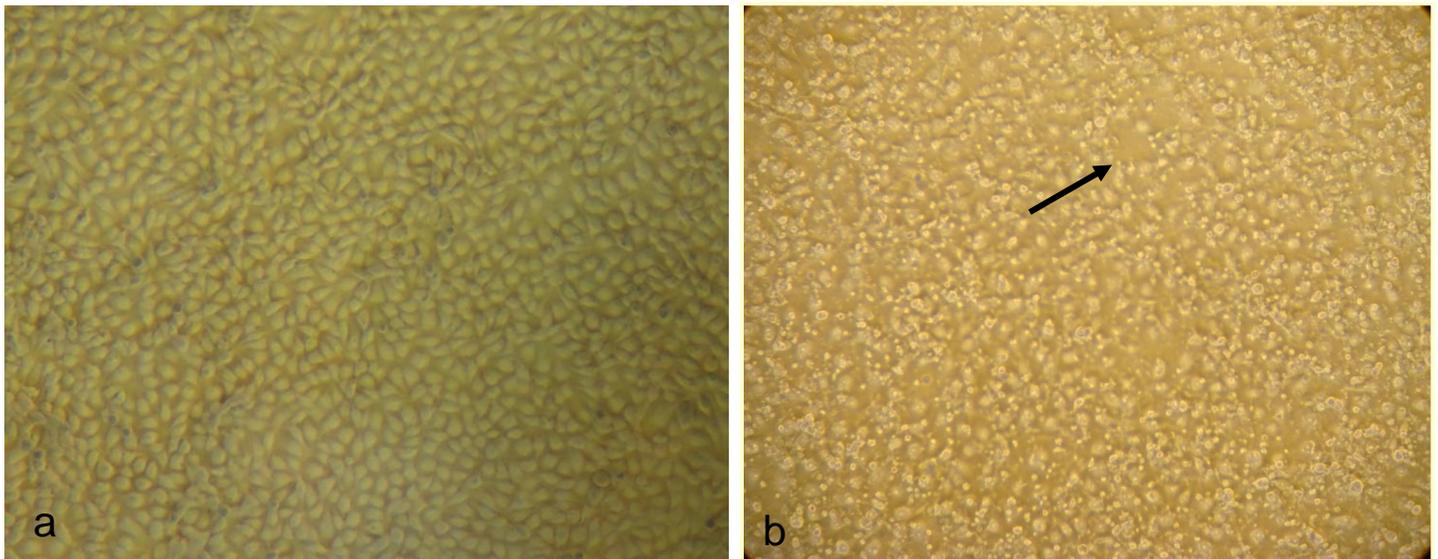


Figura 9.1 Infección de células LLC-MK2 con el virus Dengue. (a) Células sin infectar. (b) Células infectadas con DENV MOI 1 8 días post infección. La flecha negra señala el efecto citopático.

Una vez que se observó el efecto citopático máximo en los cultivos de células LLC-MK2, (pero antes del desprendimiento total de la monocapa celular) se colectaron los sobrenadantes para la purificación viral mediante

ultracentrifugación. El título viral del stock del DENV, se determinó mediante ensayo de placa lítica. Alrededor del día 10 post-infección, observamos la formación de placas líticas completamente definidas (Fig. 9.2).

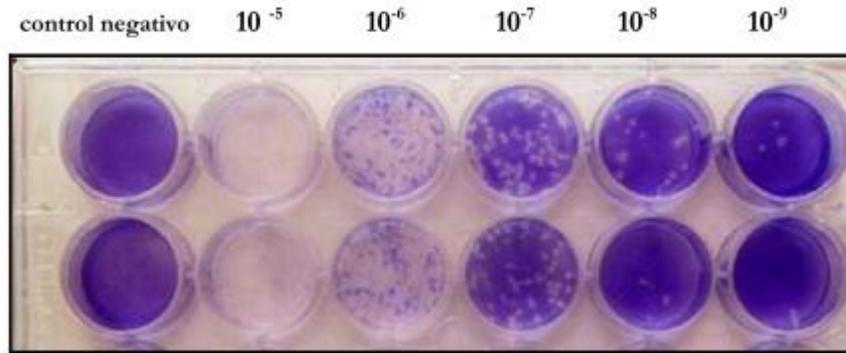


Figura 9.2. Titulación viral por ensayo de placa lítica. Se muestra la formación de placas líticas por el DENV-2 en células LLC-MK2. Duplicados de las diluciones logarítmicas en base 10 del stock viral que se realizaron para determinar la concentración. Control negativo, células sin infectar.

Se consideró la columna de la dilución más alta en la que se pudieron contar placas líticas: en la dilución 10^8 se observaron 15 placas en promedio de los dos pozos. El título viral (1.5×10^{10}) se expresó como unidades formadoras de placa (PFU) por ml (PFU/ml). A partir de esta muestra se llevaron a cabo todos los ensayos del presente trabajo.

9.2 Aislamiento de monocitos de sangre periférica

Para los ensayos del presente trabajo, se decidió utilizar monocitos aislados de sangre periférica de donadores sanos ya que las células de origen humano se aproximan a un modelo *in vivo* de la infección por DENV y son pocos los estudios que se han llevado a cabo a partir de monocitos de sangre periférica. Las células extraídas durante el procedimiento se incubaron durante 24 horas para permitir su

adhesión, se lavaron y observaron al microscopio para verificar su morfología. Los monocitos se observan al microscopio como células de gran tamaño y una membrana celular poco nítida que a veces presenta pequeñas proyecciones las cuales se muestran en la figura 9.3.

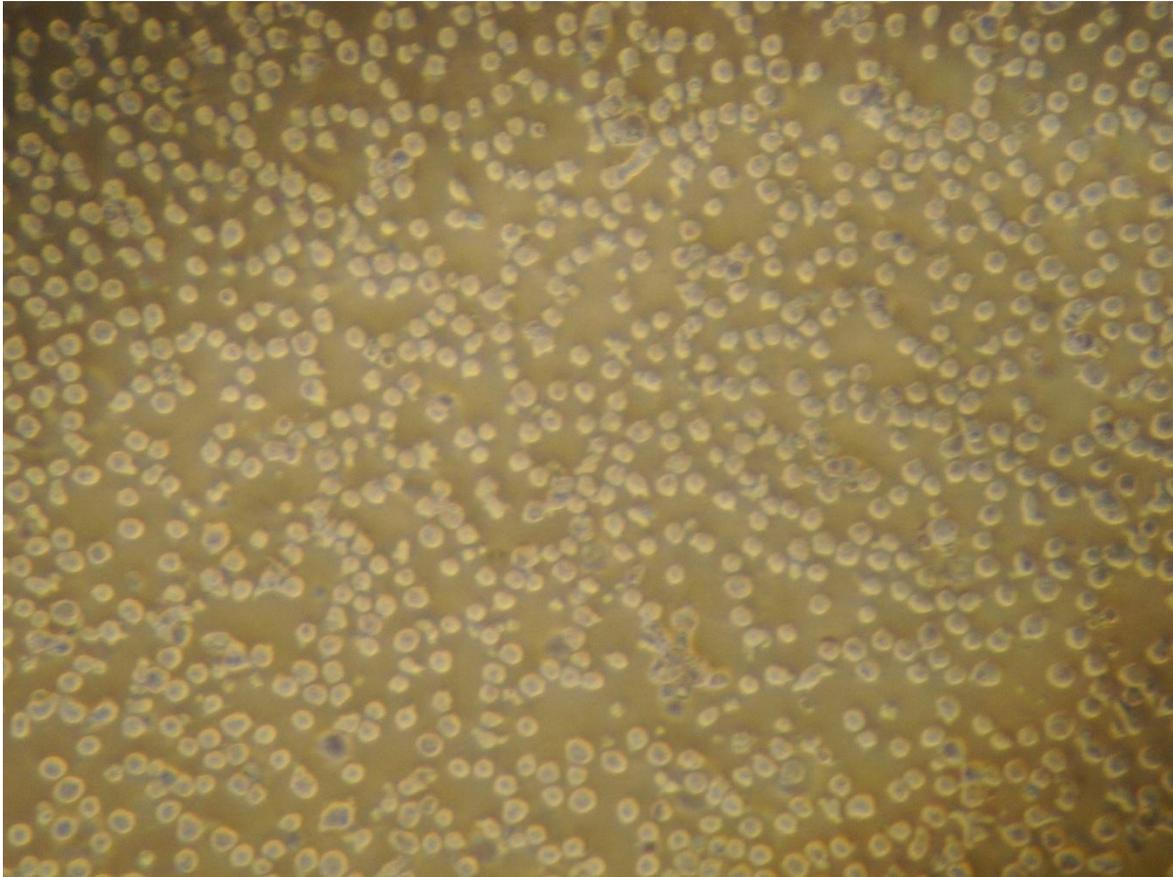
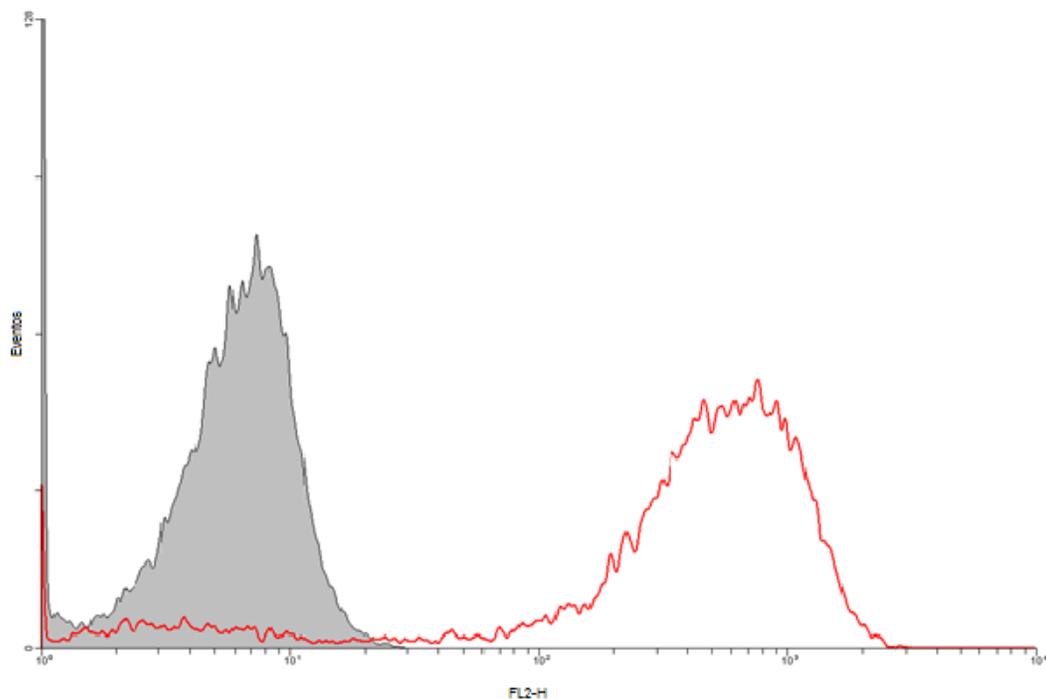


Figura 9.3 Monocitos aislados de sangre periférica. Se observan las células aisladas a partir de sangre periférica de donadores sanos, fotografía tomada con microscopio óptico con un aumento de 40X.

Posteriormente, estas células se verificaron utilizando el anticuerpo anti-CD14, ya que el CD14 es una proteína que se considera un antígeno de superficie celular para diferenciar monocitos, lo anterior se evaluó mediante citometría de flujo (Histograma 9.1).



Histograma 9.1. Expresión de CD14 en monocitos humanos de sangre periférica. Control de isotipo (gris), células incubadas con anticuerpo anti-CD14 (Rojo). Adquisición de 1×10^4 eventos. FL2-H, fluorescencia emitida por las células marcadas con el anticuerpo anti-CD14 acoplado a ficoeritrina; Eventos, representa el número relativo de células.

Se observó que pocas células fueron negativas para CD14, ya que la mayor parte de la población fue positiva para este marcador de monocitos por lo que decidimos incluirlas en el ensayo, ya que efectivamente corresponden a esta estirpe celular.

9.3 Evaluación de la presencia de Ácido Siálico en superficie celular mediante marcaje fluorescente con lectina SNA (*Sambucus Nigra* Agglutinin)

En el caso de los monocitos, como ya se mencionó anteriormente, se decidió utilizar monocitos humanos aislados de sangre periférica, debido a la importancia que tiene usar células humanas en los estudios de la infección por DENV. Sin embargo, para el caso de los hepatocitos que también son una célula fundamental durante la patogenia del DENV, la utilización de cultivos primarios humanos tiene una gran variedad de implicaciones bioéticas y en el caso de utilizar algún cultivo de origen animal tiene como inconveniente principal el hecho de que ningún modelo animal hasta ahora descrito reproduce las manifestaciones clínicas o la patogenia que produce el DENV en humanos. Por lo anterior, se decidió utilizar la línea celular humana HepG2 ya establecida previamente y que además ha sido ampliamente usada en los estudios de infección por DENV en hepatocitos. Una vez que elegimos los tipos celulares con los que se desarrollaría el presente trabajo, se procedió a evaluar la presencia del ácido siálico en la superficie celular, ya que a pesar de que las células humanas presentan Sia superficial, el glicocalix de cada tipo celular difiere dependiendo de su origen. Lo anterior, se evaluó mediante microscopia confocal, utilizando como marcador de Sia la lectina SNA (*Sambucus Nigra* Agglutinin), la cual reconoce Sia en su conformación $\alpha 2,6$. Ambos tipos celulares fueron incubados con SNA lo cual se muestra en las figura 9.4 para monocitos y en la figura 9.5 para los hepatocitos.

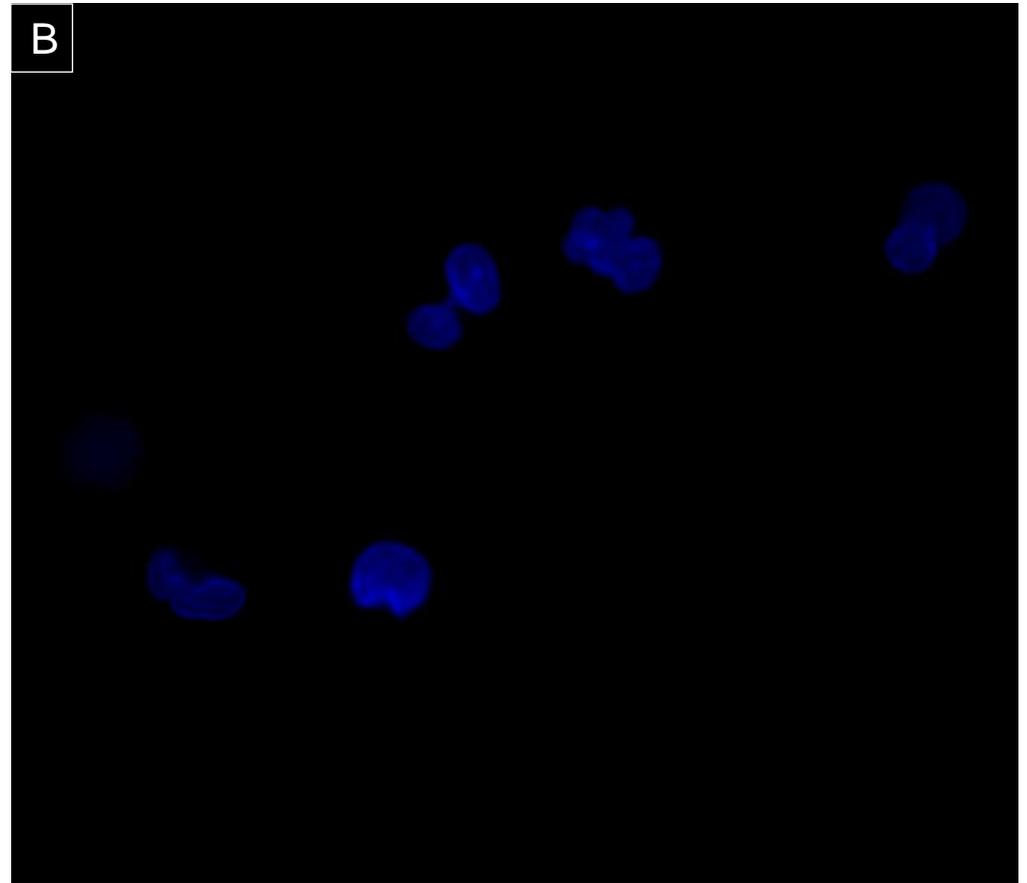
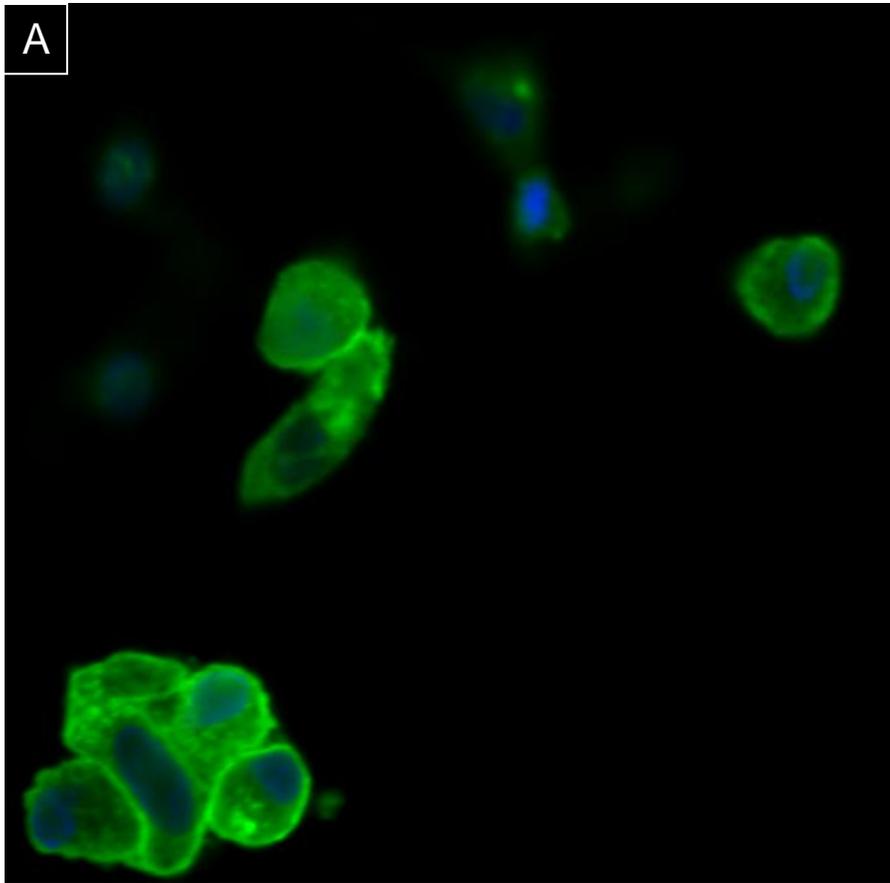


Figura 9.4. Presencia de ácido siálico en la superficie celular de monocitos humanos de sangre periférica. (A) Células incubadas con lectina SNA. (B) Células del control negativo incubadas sin lectina. Se observan en azul los núcleos teñidos con DAPI. Micrografías tomadas con Microscopio Olympus acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) con aumento de 40X.

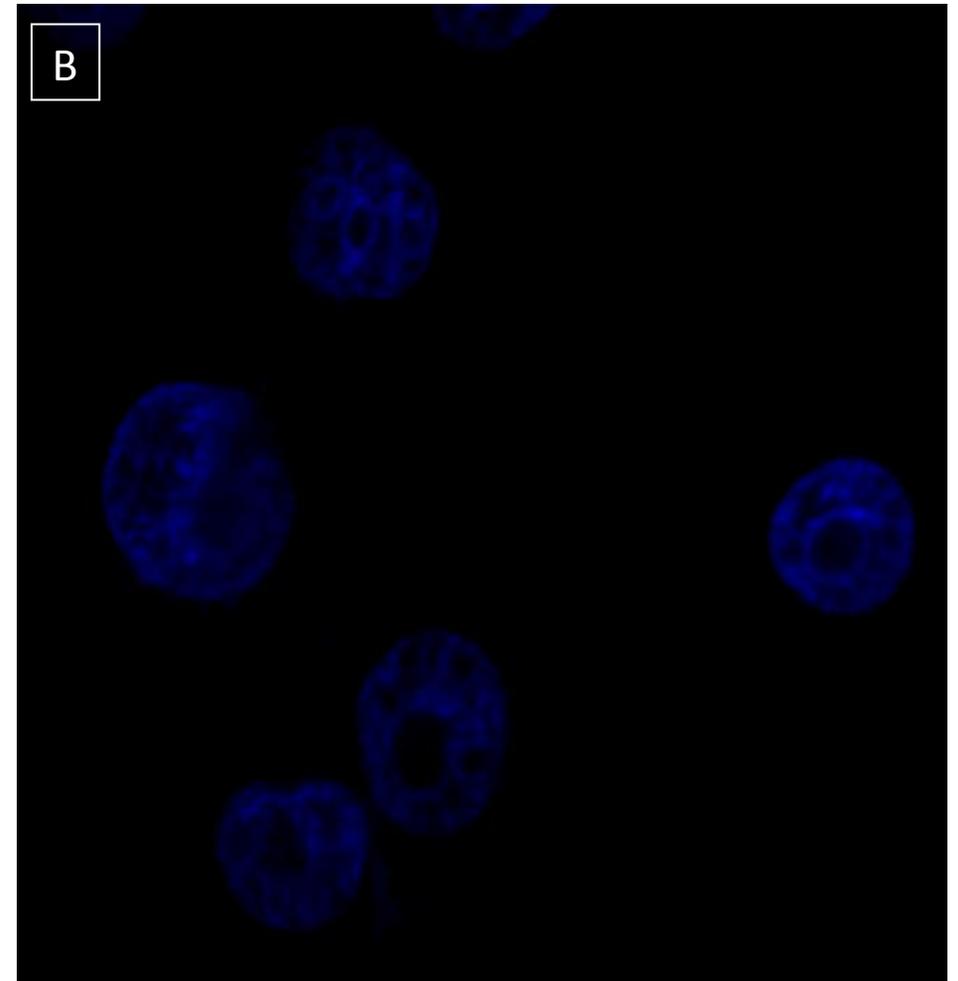
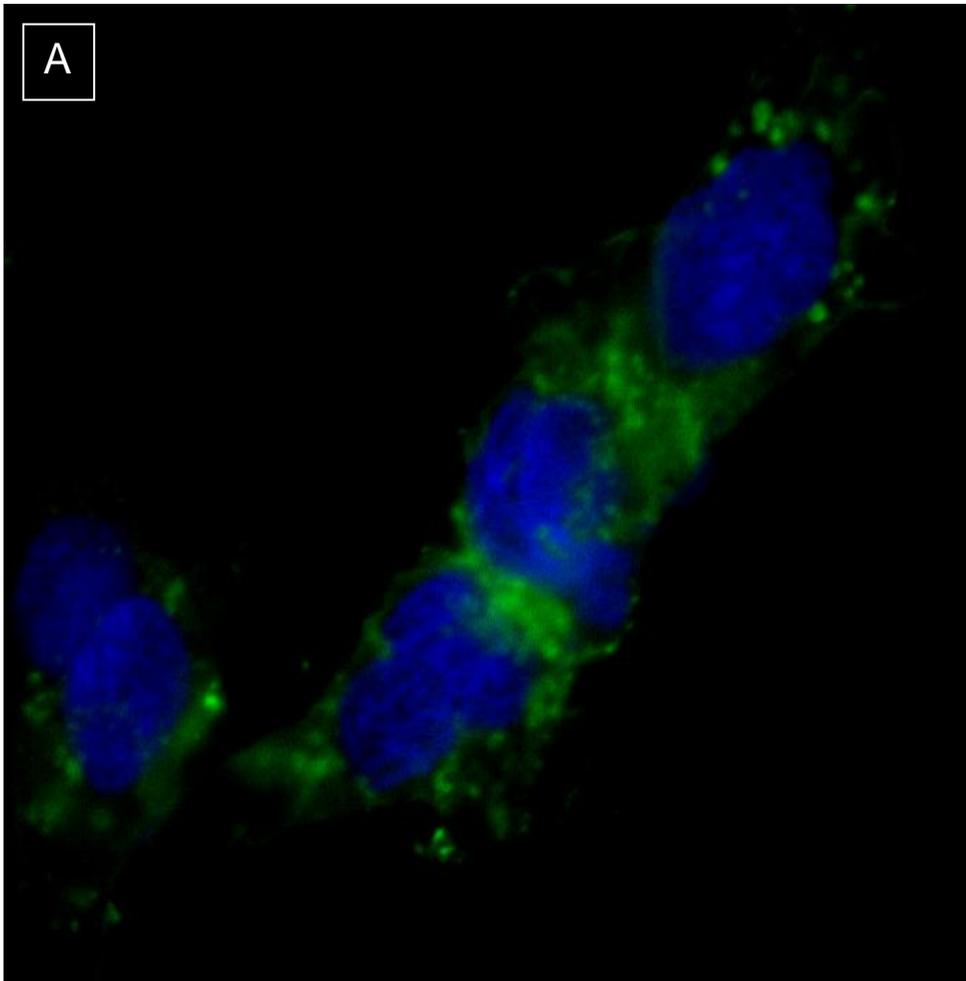


Figura 9.5. Presencia de ácido siálico en la superficie celular de hepatocitos de la línea celular HepG2. (A) Células incubadas con lectina SNA. (B) Células del control negativo incubadas sin lectina. Se observan en azul los núcleos teñidos con DAPI. Micrografías tomadas con Microscopio Olympus acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) con aumento de 40X.

En comparación con los controles que no fueron incubados con SNA en los que solo se puede observar el núcleo celular teñido con DAPI, ambos tipos celulares presentaron una fluorescencia apreciable que corresponde al Sia de superficie celular teñido con FITC, aunque en ambas células se aprecia con una abundancia y distribución diferente. Mientras que los monocitos presentan Sia abundante en toda la superficie que incluso opaca la fluorescencia del núcleo, en la línea celular de los hepatocitos, la tinción no es uniforme y además se presentó en menor intensidad.

9.4 Evaluación de la presencia de Ácido Siálico en la superficie celular mediante Citometría de Flujo con la lectina SNA.

Además de los ensayos (para evaluar la presencia de Sia en superficie celular) de microscopía confocal, se decidió realizar un ensayo mediante citometría de flujo para evaluar por diferentes métodos la presencia y proporción de la población celular que lo expresa, ya que algunos cultivos son demasiado heterogéneos. De manera similar al ensayo anterior, se utilizó la lectina SNA para marcar al Sia en la superficie de ambos tipos celulares. Figuras 9.6 para monocitos y 9.7 para los hepatocitos.

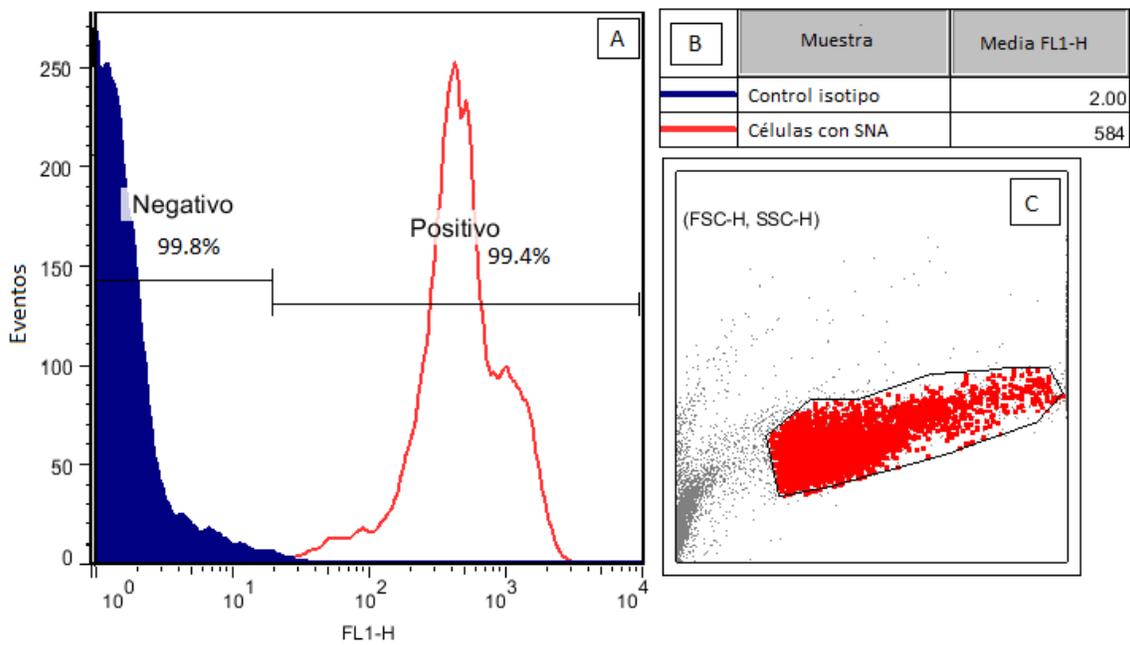


Figura 9.6. Presencia de ácido siálico en la superficie celular de monocitos humanos de sangre periférica. (A) Histograma de fluorescencia: Población 1: Control de isotipo (azul), Población 2: células incubadas con Lectina SNA (Rojo). (B) Tabla que muestra las medias de la intensidad de fluorescencia de cada población celular. (C) Dotplot que muestra la población celular total y el subgrupo que fue analizado. Adquisición de 1×10^4 eventos. FL1-H, fluorescencia emitida por las células marcadas con la lectina SNA biotinilada y estreptavidina acoplada a FITC; Eventos, representa el número relativo de células.

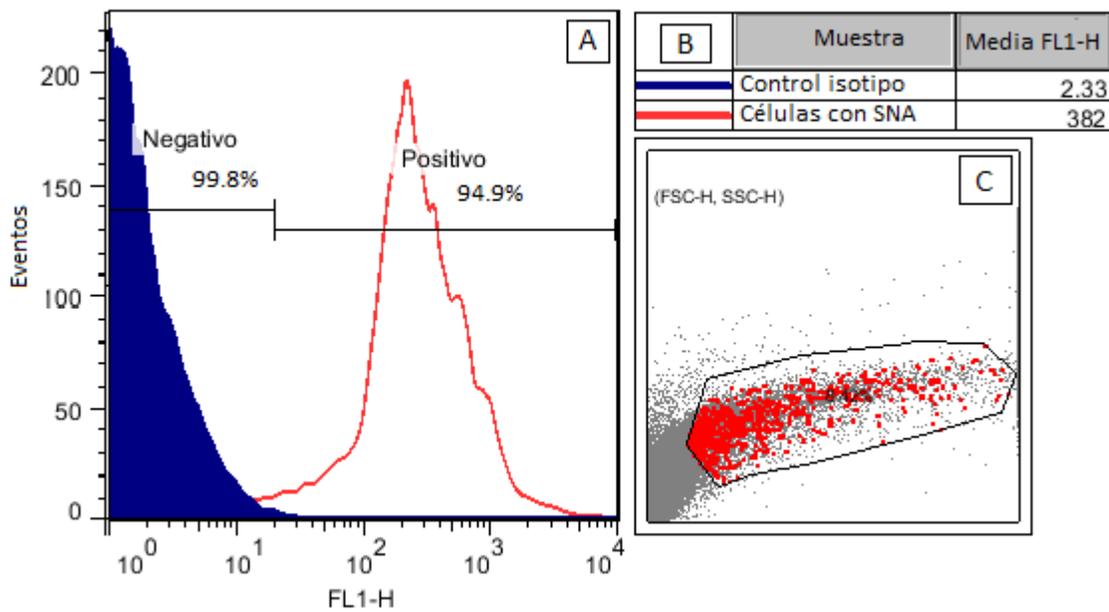


Figura 9.7. Presencia del ácido siálico en la superficie celular de hepatocitos de la línea HepG2. (A) Histograma de fluorescencia: Población 1: Control de isotipo (azul), población 2: células incubadas con Lectina SNA (Rojo). (B) Tabla que muestra las medias de la intensidad de fluorescencia de cada población celular. (C) Dotplot que muestra la población celular y el subgrupo que fue analizado. Adquisición de 1×10^4 eventos. FL1-H, fluorescencia emitida por las células marcadas con la lectina SNA biotinilada y estreptavidina acoplada a FITC; Eventos, representa el número relativo de células.

Para ambos tipos celulares se muestran dos grupos: Los negativos, en base a la fluorescencia emitida por el control de isotipo, y los positivos que fueron aquellas células que se encontraban fuera de ese rango. En el caso de los monocitos, el 99.8% de la población celular del control de isotipo fueron negativas, mientras que las restantes (0.2%) presentaron una fluorescencia inespecífica. El 99.4% de las células monocíticas marcadas con SNA fueron positivas, mientras que las restantes (0.6%) no mostraron fluorescencia. Al comparar las medias de ambas poblaciones, los monocitos incubados con SNA tuvieron una media de intensidad de fluorescencia (MIF) de 584 mucho mayor a la que presentaron las células control que fue de 2.

En el caso de los hepatocitos, de igual manera el 99.8% de la población del control fueron negativas y el 0.2% presentaron fluorescencia inespecífica. Mientras que el 94.9% de la población de células marcadas con SNA fueron positivas y el 5.1% restantes no presentaron fluorescencia. Las células marcadas con SNA presentaron una MIF de 382 mientras que la media del control fue de 2.33.

En coincidencia con los resultados de la microscopia confocal, observamos también mediante citometría de flujo, que tanto los monocitos humanos como los hepatocitos de la línea celular HepG2 presentan Sia en la superficie celular. Se pudo observar que las poblaciones de ambos tipos celulares presentan una fluorescencia intensa al comparar las medias de las poblaciones marcadas con SNA con las de los controles, las cuales no fueron incubadas con la lectina. Sin embargo, dentro de las poblaciones positivas observamos una heterogeneidad relativa en la intensidad de la fluorescencia.

9.5 Evaluación de la interacción del DENV con Sia a nivel de la superficie de monocitos y hepatocitos humanos mediante ensayos de co-localización

Una vez que se confirmó la presencia de Sia en la superficie celular de monocitos y hepatocitos humanos, se propuso evaluar la posible interacción del DENV con este carbohidrato como previamente se observó en los tejidos del mosquito vector. Esto se llevó a cabo mediante ensayos de co-localización, utilizando microscopía confocal, ya que permite estimar el grado de coincidencia de dos ó más moléculas, usando imágenes multicolores. La co-localización se observa cuando al marcar dos o más moléculas en la misma sección, son marcados con fluoróforos que tienen diferentes espectros de excitación y por lo tanto se visualizan en diferentes colores, es decir se sobreponen o sobrelapan. En el presente ensayo, Sia se detectó con FITC que tiene una longitud de onda de absorción de 518 nm y emite una fluorescencia verde, mientras que el DENV-2 se detectó con Alexa 555 que presenta una longitud de onda de absorción de 565 nm y emite una fluorescencia roja, la co-localización indicaría un color próximo al amarillo, las micrografías se pueden observar en las figuras 9.8, 9.9 para los monocitos y 9.11, 9.12 para los hepatocitos.

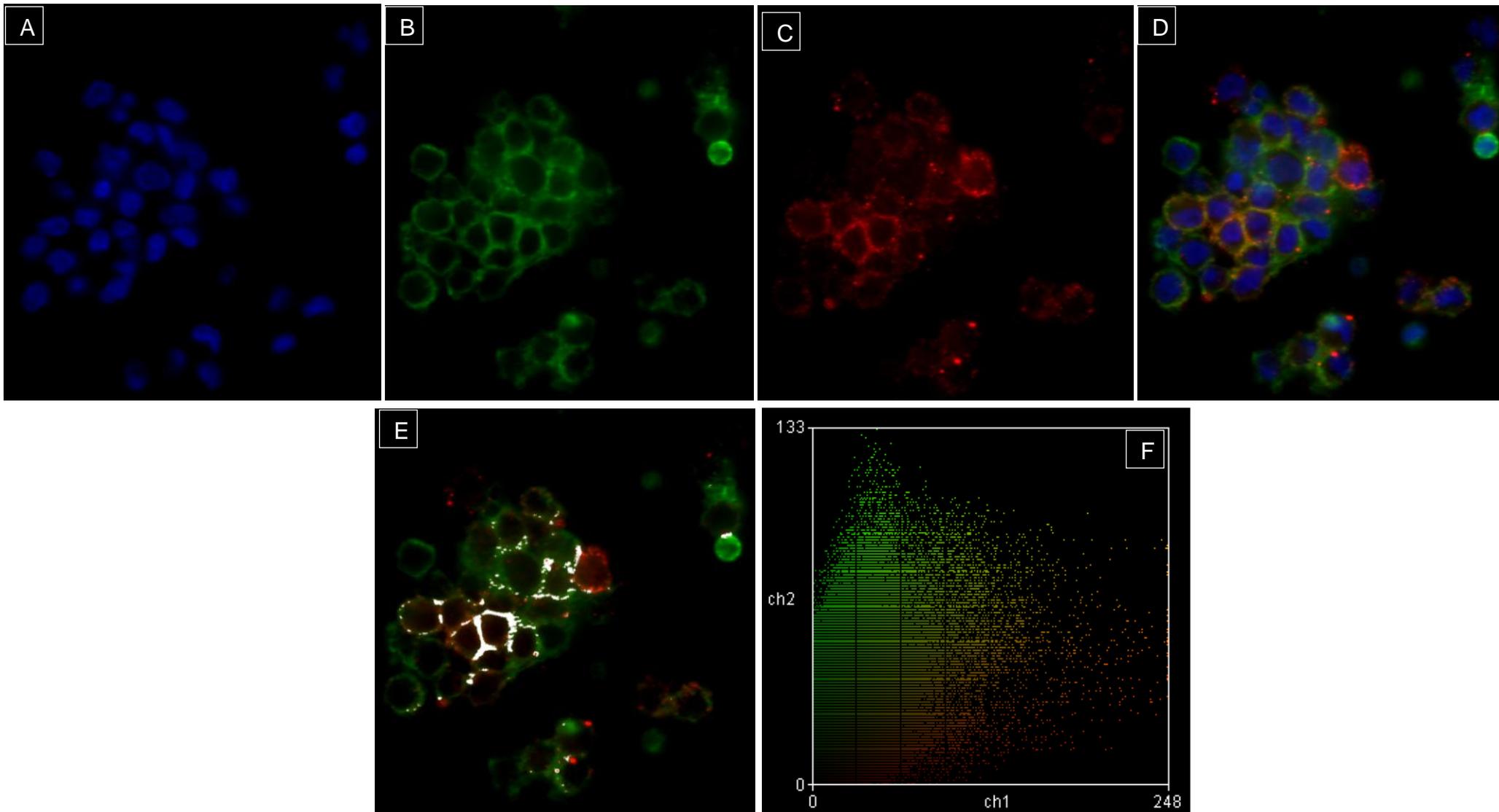


Figura 9.8. Co-localización del virus Dengue con el ácido siálico en la superficie celular de monocitos humanos aislados de sangre periférica. (A) Núcleos teñidos con DAPI, (B) ácido siálico en superficie celular marcado con FITC , (C) virus Dengue en superficie celular marcado con Alexa 555, (D) Merge o sobreposición de las tres imágenes anteriores, (E) Colocalización de DENV y Sia en superficie celular, los pixeles blancos indican lugares de colocalización. (F) Diagrama de dispersión de color que muestra los pixeles verdes, los pixeles rojos y en amarillo aquellos que se encuentran colocalizando. Micrografías tomadas con Microscopio Olympus acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) con aumento de 40X y analizadas con el programa MacBiophotonics ImageJ.

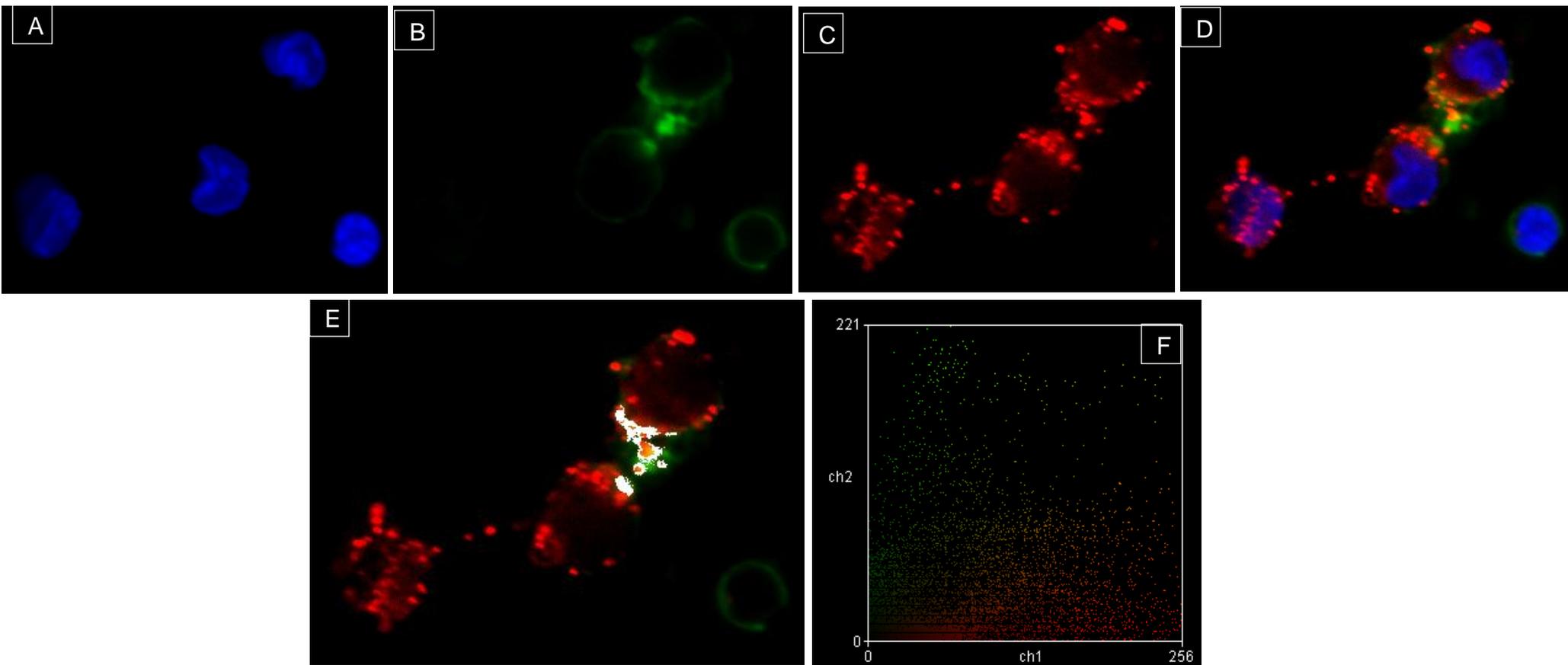


Figura 9.9. Co-localización del virus Dengue con el ácido siálico en la superficie celular de monocitos humanos aislados de sangre periférica. (A) Núcleos teñidos con DAPI, (B) ácido siálico en superficie celular marcado con FITC, (C) virus Dengue en superficie celular marcado con Alexa 555, (D) Merge o sobreposición de las tres imágenes anteriores, (E) Colocalización de DENV y Sia en superficie celular, los pixeles blancos indican lugares de colocalización. (F) Diagrama de dispersión de color que muestra los pixeles verdes, los pixeles rojos y en amarillo aquellos que se encuentran colocalizando. Micrografías tomadas con Microscopio Olympus acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) con aumento de 60X y analizadas con el programa MacBiophotonics ImageJ.

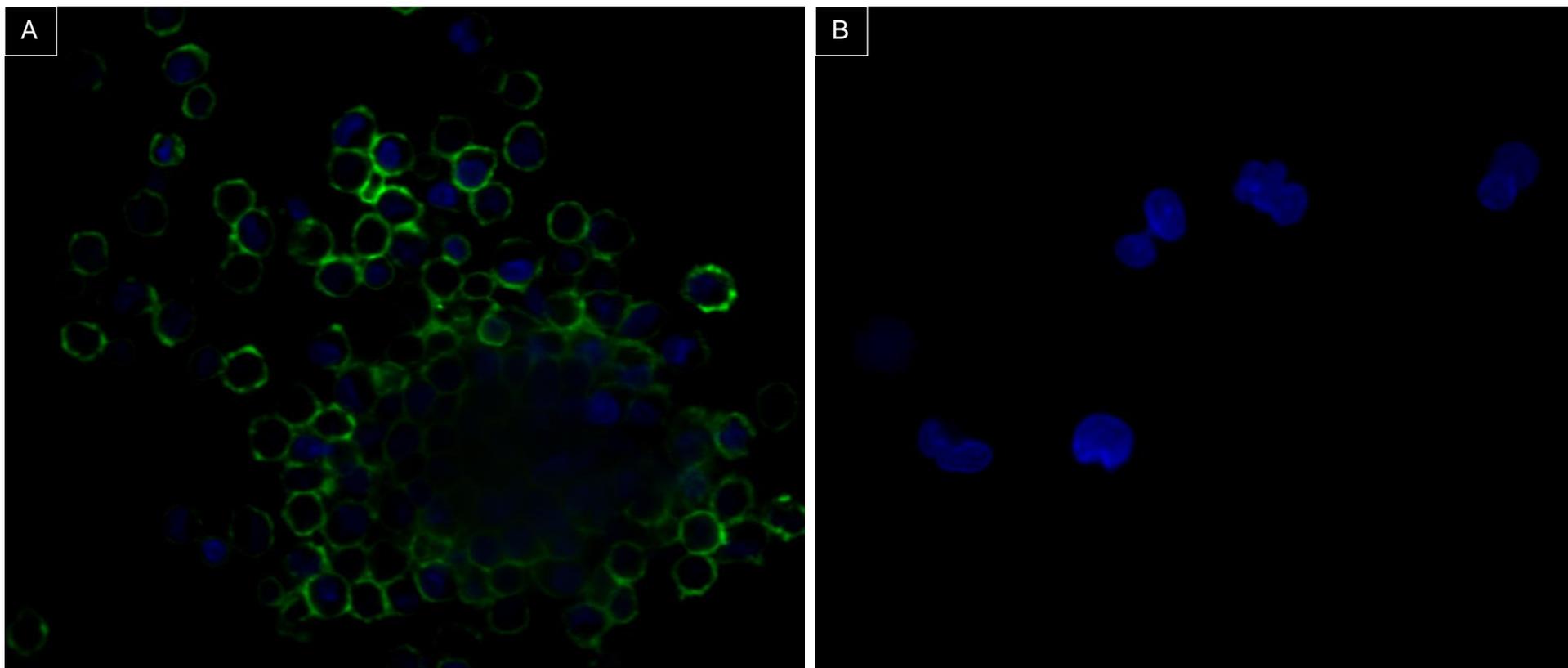


Figura 9.10. Controles negativos de la co-localización de monocitos humanos de sangre periférica. (A) Monocitos sin infectar incubados con lectina y anticuerpo secundario Alexa 555 con un aumento de 20X. (B) monocitos sin infectar incubados solo con estreptavidina y anticuerpo secundario Alexa 555 Con un aumento de 60X. Micrografías tomadas con Microscopio Olympus acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) y analizadas con el programa MacBiophotonics ImageJ.

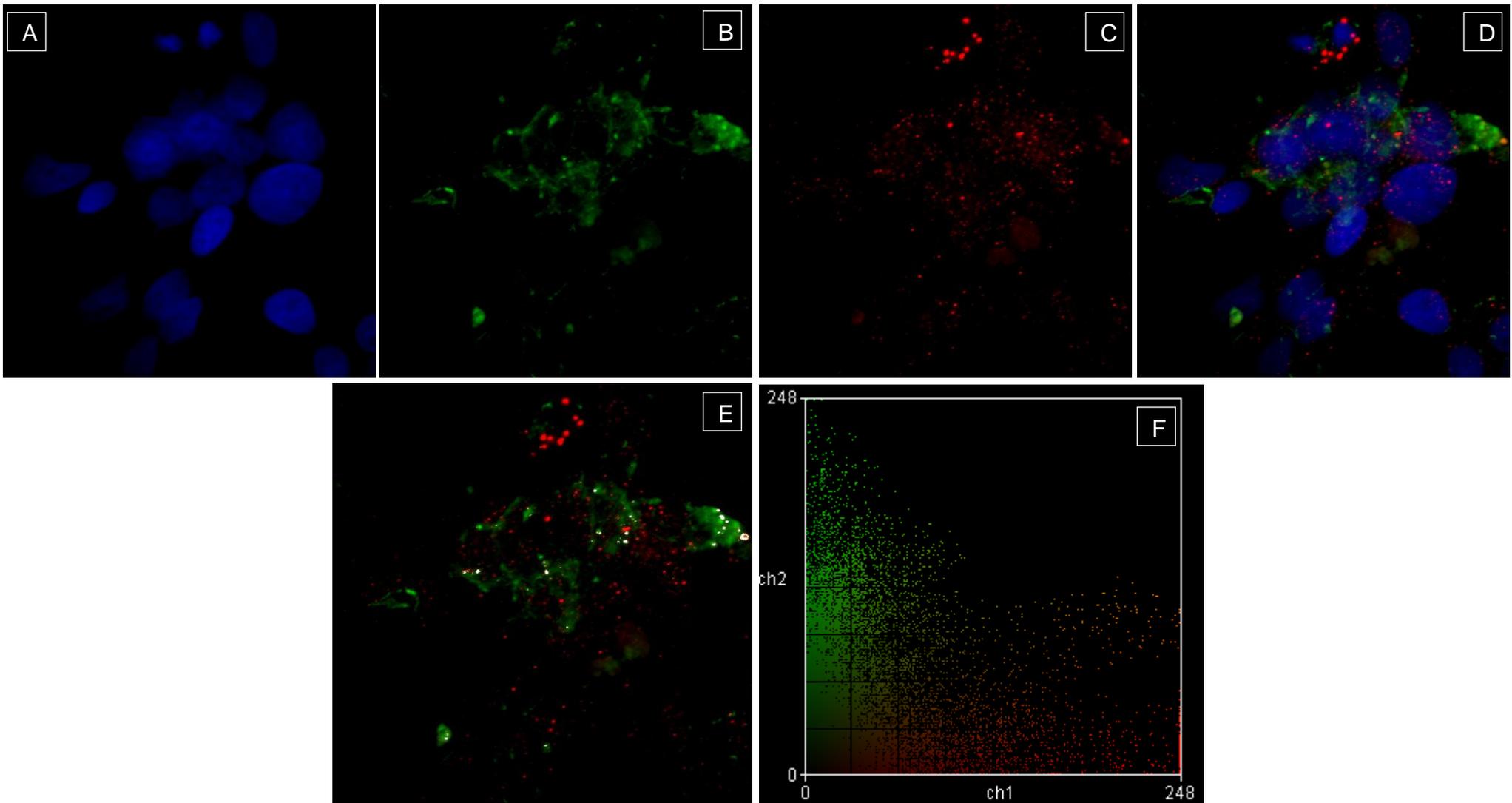


Figura 9.11. Co-localización del virus Dengue con el Ácido Siálico en la superficie celular de hepatocitos de la línea HepG2. (A) Núcleos teñidos con DAPI, (b) ácido siálico en superficie celular marcado con FITC, (C) virus Dengue en superficie celular marcado con Alexa 555, (D) Merge o sobreposición de las tres imágenes anteriores, (E) Colocalización de DENV y Sia en superficie celular, los pixeles blancos indican lugares de colocalización. (E) Diagrama de dispersión de color que muestra los pixeles verdes, los pixeles rojos y en amarillo aquellos que se encuentran colocalizando. Micrografías Microscopio Olympus acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) con aumento de 20X y analizadas con el programa MacBiophotonics ImageJ.

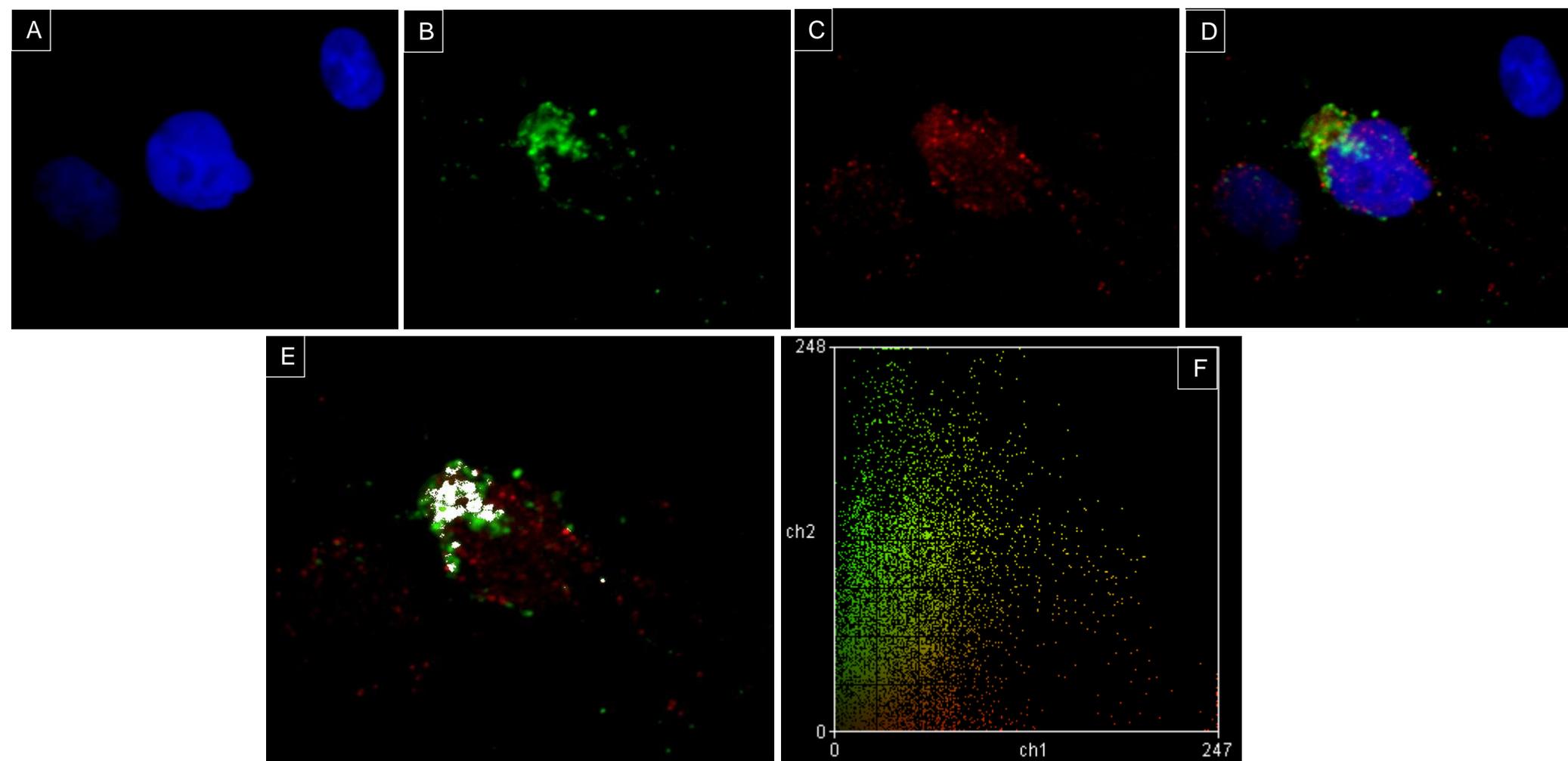


Figura 9.12. Co-localización del virus Dengue con el ácido Siálico en la superficie celular de hepatocitos de la línea HepG2. (A) Núcleos teñidos con DAPI, (B) ácido siálico en superficie celular marcado con FITC, (c) virus Dengue en superficie celular marcado con Alexa 555, (D) Merge o sobreposición de las tres imágenes anteriores, (E) Colocalización de DENV y Sia en superficie celular, los pixeles blancos indican lugares de colocalización. (F) Diagrama de dispersión de color que muestra los pixeles verdes, los pixeles rojos y en amarillo aquellos que se encuentran colocalizando. Microscopio Olympus acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) con aumento de 60X y analizadas con el programa MacBiophotonics ImageJ.

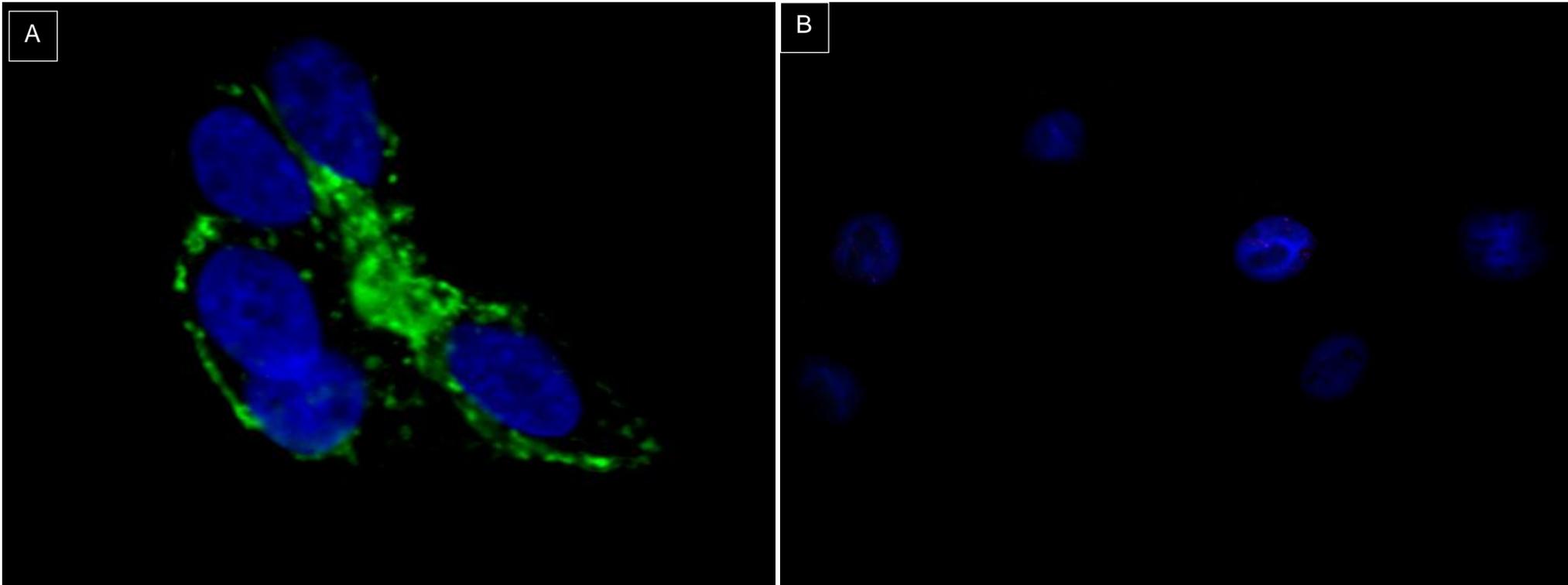


Figura 9.13. Controles negativos de la co-localización de hepatocitos de la línea celular HepG2. (A) Células sin infectar incubadas con lectina y anticuerpo secundario Alexa 555 con un aumento de 60X. (B) células sin infectar incubados solo con estreptavidina y anticuerpo secundario Alexa 555 con un aumento de 20X. Micrografías tomadas con Microscopio Olympus acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) y analizadas con el programa MacBiophotonics ImageJ.

Tabla 9.1. Índices de co-localización de cada figura.

FIGURA	ÍNDICE DE MANDEL
Monocitos	
9.8	0.7516
9.9	0.579
Hepatocitos	
9.11	0.2214
9.12	0.4085

La co-localización, como una manifestación biológica, se define como la presencia de dos o más moléculas que se encuentran en la misma locación física en una muestra determinada. Dentro del contexto de una célula individual vista al microscopio, la co-localización puede indicar que las moléculas estén unidas, mientras que en el contexto de la imagen digital el término se refiere a los colores emitidos por las moléculas fluorescentes compartiendo un mismo pixel en la imagen. Con base en lo anterior, el programa McBiophotonics Image J emite una foto en la que los pixeles que se encuentran co-localizando se ven de color blanco. En el presente ensayo, se observó que Sia y el DENV-2 muestran una interacción cercana a nivel de la superficie celular tanto en los monocitos como en los hepatocitos humanos. Asimismo, en correlación a los estudios anteriores se observó que cada tipo celular interacciona de manera diferente.

Para los monocitos, se pudo observar en la figura 9.8 que existe una co-localización considerable y, de manera interesante, esta se presentó en las

interconexiones celulares. En el diagrama de dispersión de color de la foto, se muestran los pixeles verdes, los pixeles rojos y aquellos que se encuentran co-localizando en amarillo. Se pudo observar que efectivamente hay varios de ellos co-localizando lo que indicaría una interacción del virus con el ácido siálico. El índice de Mandel, se refiere al índice de co-localización o solapamiento de los pixeles y sus valores, que van de 0 (correspondiendo a la ausencia de co-localización) a 1, siendo este valor el mayor nivel de co-localización. El índice para esta fotografía fue de 0.7516 (Tabla 9.1), que se consideró como un valor elevado de co-localización. No todas las células interaccionaron con el virus pero en la mayor parte de las que lo hicieron, se encontró co-localización.

En la foto 9.9, de igual manera que en la anterior, se pudo observar la presencia de co-localización (pixeles blancos). Se puede observar una co-localización intensa mientras que su índice de Mandel fue 0.579.

Los controles fueron células incubadas con SNA (Fig. 9.10A) y células sin lectina (Fig 9.10B) a las que se les adicionó estreptavidina acoplada a FITC y los anticuerpos primarios y secundarios. Lo anterior, con la finalidad de observar si no existía algún reconocimiento inespecíficos por parte de los anticuerpos o la avidina que pudiera interferir con la interpretación de nuestros datos.

A diferencia de los monocitos primarios, en los hepatocitos hubo una menor co-localización, como se puede en la figura 9.11. Se muestran pocos lugares de co-localización en pixeles blancos y así mismo en el diagrama de dispersión de color pueden observarse pocos pixeles amarillos. El índice de Mandel fue de 0.2214 que comparado con el de los monocitos de la foto 9.8 corresponde a menos de la

mitad. Sin embargo, en la foto 9.12 en que se enfoca otra muestra, se pueden observar varios puntos de co-localización y algunos pixeles amarillos en el diagrama de dispersión. Aunque al analizar el índice de Mandel este correspondió a 0.4085, que es menor que el observado en monocitos.

9.6 Evaluación de la internalización del DENV en presencia o ausencia de Sia mediante RT-PCR en tiempo real o RT-PCR en tiempo real

Se ha postulado que algunos co-receptores no solo concentran partículas virales en la superficie de la célula hospedera sino que también participan durante la internalización viral y con ello, favorecen tanto su replicación como la infección celular. Una vez que se observó la interacción DENV- Sia a nivel de la superficie celular tanto de los monocitos humanos y de los hepatocitos, se procedió a evaluar si este posible receptor tiene un papel en la internalización de la partícula viral. Lo anterior se llevó a cabo mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real. Una de las ventajas del RT-PCR en tiempo real es que la generación del amplicón se puede observar conforme la amplificación progresa, la detección de la fluorescencia que se genera durante la reacción ocurre en cada ciclo de amplificación y es detectada por el equipo en tiempo real. La cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado. La cantidad de copias de RNA viral se calculan a partir del Ct (ciclo de umbral de detección). De esta forma, el Ct es un número fraccional que indica cuantos ciclos le tomo a cada muestra generar cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección. El valor de Ct es directamente

proporcional a la cantidad inicial de templado y es el fundamento para calcular la cantidad de RNA viral. Mientras mayor la cantidad de RNA viral que se encuentra en la muestra, menor el número de ciclos que requiere para alcanzar el umbral de detección.

Con base en lo anterior, se evaluó la internalización viral en ambos tipos celulares, tanto en presencia como en ausencia de Sia superficial, lo cual se obtuvo incubando a las células con neuraminidasa, una enzima que cataliza la remoción del Sia en cualquier tipo de enlace. Se utilizó como control positivo, células sin tratamiento con neuraminidasa y como control negativo células tratadas con tripsina al 0.075%, ya que la tripsina cataliza la digestión de proteínas de la membrana celular. Primero llevamos a cabo el establecimiento de una curva patrón del número de copias del RNA viral, utilizando un stock del DENV-2, el cual previamente se había titulado por ensayo de placa lítica (Fig. 9.14). A partir de la curva patrón se extrapoló el número de copias de RNA de cada una de las muestras evaluadas.

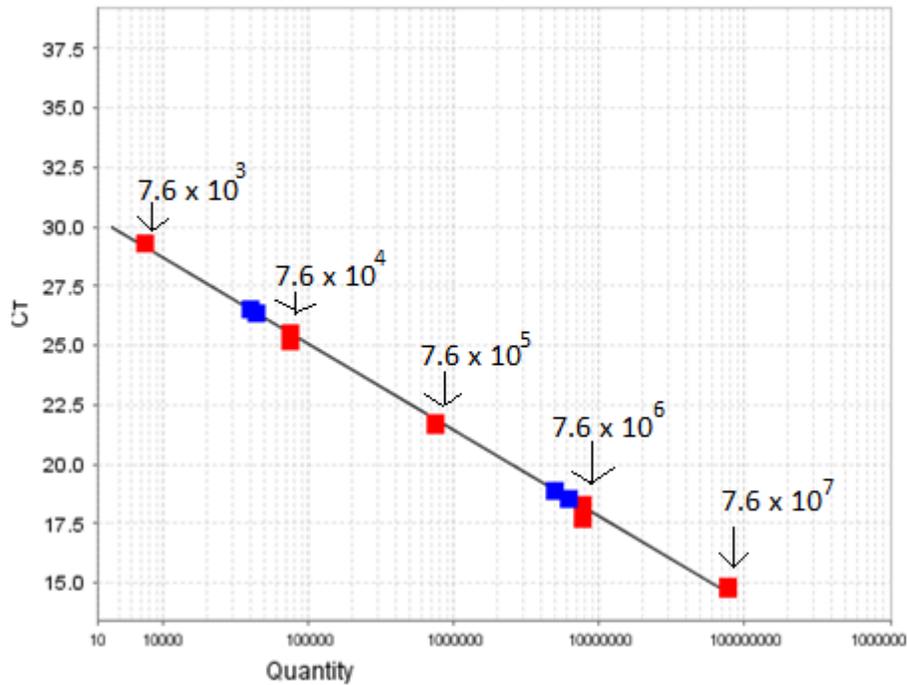


Figura 9.14. Curva patrón del RT-PCR en tiempo real. En rojo se muestran 5 diluciones logarítmicas en base 10 de un stock de DENV-2 con una concentración de 7.6×10^7 copias/ml. En azul algunas de las muestras problema. CT=Ciclo umbral, Quantity=copias de RNA viral por ml.

Posterior a la determinación de la curva patrón para el ensayo de internalización viral, se analizaron todas las muestras anteriormente mencionadas y los resultados se muestran en la figura 9.15 para los monocitos y la figura 9.16 para los hepatocitos.

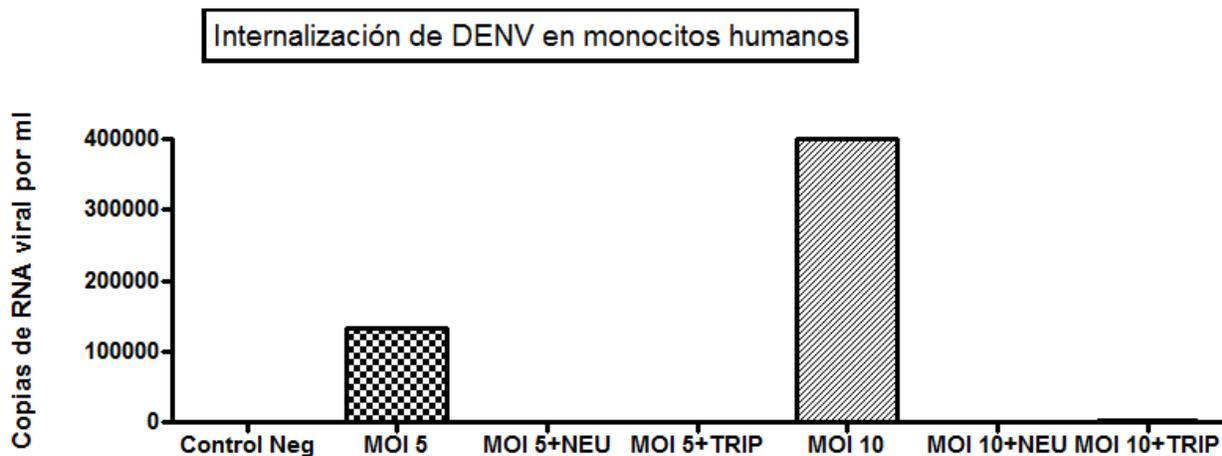


Figura 9.15. Internalización del virus DENV-2 en monocitos humanos de sangre periférica con y sin tratamiento de neuraminidasa. Control negativo, células sin infectar; MOI 5, células infectadas con DENV-2 MOI 5; MOI 5 + NEU, células con tratamiento de neuraminidasa infectadas con DENV-2 MOI5; MOI 5 + TRIP, células tratadas con tripsina e infectadas con DENV-2 MOI 5; MOI 10, células infectadas con DENV-2 MOI 10; MOI 10 + NEU, células con tratamiento de neuraminidasa infectadas con DENV-2 MOI 10; MOI 10 + TRIP, células tratadas con tripsina e infectadas con DENV-2 MOI 10. Carga viral representada por las copias de RNA viral por ml.

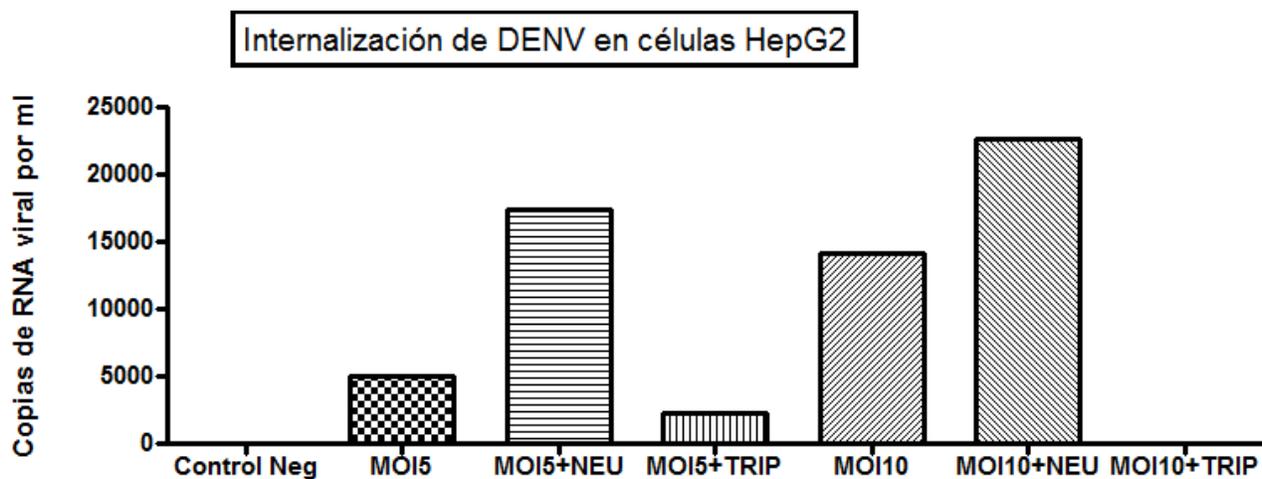


Figura 9.16. Internalización del virus DENV-2 en hepatocitos de la línea celular HepG2 con y sin presencia de Sia de superficie. Control negativo, células sin infectar; MOI 5, células infectadas con DENV-2 MOI 5; MOI 5 + NEU, células con tratamiento de neuraminidasa infectadas con DENV-2 MOI5; MOI 5 + TRIP, células tratadas con tripsina e infectadas con DENV-2 MOI 5; MOI 10, células infectadas con DENV-2 MOI 10; MOI 10 + NEU, células con tratamiento de neuraminidasa infectadas con DENV-2 MOI 10; MOI 19 + TRIP, células tratadas con tripsina e infectadas con DENV-2 MOI 10. Carga viral representada por las copias de RNA viral por ml.

Se encontró que el DENV-2 presenta una internalización diferencial en hepatocitos y en monocitos rasurados con neuraminidasa. Para los monocitos, se pudo observar que el DENV se internalizó en las células que no habían sido tratadas con neuraminidasa, es decir, que conservaban al Sia superficial y que fue una respuesta que estuvo relacionada a la dosis infectante. En las células tratadas con neuraminidasa, es decir, en la ausencia de Sia, se observó un efecto inhibitorio en la internalización viral, ya que no encontramos carga viral en ambas dosis del DENV utilizadas en el ensayo (MOI 5 y MOI 10). Se propone que el posible receptor del DENV-2 en los monocitos humanos pueda ser de naturaleza proteica, ya que al tratar a las células con tripsina la internalización viral se redujo prácticamente en su totalidad; aunque algunas partículas virales si lograron ser internalizadas, lo que hace suponer que el DENV-2 utiliza mecanismos alternos para su internalización. Aunque cabe destacar que al eliminar al Sia de la superficie celular, la entrada se inhibió prácticamente en su totalidad por lo que se propone que el DENV reconozca azúcares superficiales (Sia) en estructuras proteicas permitiendo su interacción temprana con los monocitos humanos.

En el caso de los hepatocitos, se observó que la internalización viral fue menor comparada con la de los monocitos. A pesar de ello si se observó que el DENV entra a la célula y que de igual forma al haber más partículas virales (MOI 10) la internalización también se incrementa. El efecto que tuvo la ausencia del Sia en superficie fue inverso al caso de los monocitos, pues se pudo observar que en las células tratadas con neuraminidasa hubo una mayor cantidad de partículas virales internalizadas en ambas dosis utilizadas en el ensayo (MOI 5 y MOI 10). Esto

plantea que la remoción del ácido siálico en la superficie de hepatocitos favorece una mayor entrada de las partículas virales que posiblemente esté relacionada con la accesibilidad en la interacción con el receptor putativo exponiendo el sitio de unión al receptor. Este fenómeno está bien documentado en otros modelos, en los cuales la remoción de Sia, favorece ó expone el sitio específico de unión. En las células tratadas con tripsina, se observó una reducción de la internalización de las partículas virales siendo casi total en el caso de MOI 10 aunque en MOI 5 algunas partículas si lograron entrar por lo que posiblemente el receptor putativo en los hepatocitos humanos sea de naturaleza proteíca.

10. DISCUSIÓN

10.1 Presencia de ácido siálico en la superficie de monocitos humanos de sangre periférica y hepatocitos de la línea celular HepG2

En el presente trabajo se propuso evaluar la posible participación del Sia en las interacciones tempranas (unión, internalización) del DENV con sus principales células diana (monocitos y hepatocitos humanos), por lo que inicialmente se verificó la presencia de Sia en la superficie de monocitos y hepatocitos humanos. Se conoce que todas las células de mamíferos están cubiertas de un glicocáliz denso que consiste en glicoproteínas, proteoglicanos y glicolípidos, diferentes glicoconjugados presentan cadenas de glicanos que contienen Sia. Sin embargo, este azúcar tiene una distribución diferencial dependiendo del tipo celular del que se trate. Más aun, se propone que por la presión de selección ejercida por los patógenos que usan a Sia como receptor para infectar a su célula hospedera, la expresión de Sia esté altamente regulada (Gagneux et al., 2003).

Se decidió utilizar monocitos humanos obtenidos de sangre periférica de donadores sanos, ya que no existe un modelo animal para el estudio del Dengue. Las células diana humanas permiten tener una aproximación más real de lo que puede suceder *in vivo* durante la infección por DENV. Además existen pocos estudios relacionados con las interacciones tempranas del DENV en cultivos primarios de monocitos humanos, ya que en la mayor parte de estos, se utilizan líneas celulares como la THP-1 o la U937.

Para evaluar la presencia de Sia en la superficie celular se utilizó la lectina SNA que une al ácido siálico presente en las cadenas de glicanos en conformación

α 2,6. Se pudo observar en las micrográficas (9.4) que los monocitos primarios humanos contienen Sia de manera abundante en la superficie celular, la distribución de esta molécula es uniforme. La intensidad de la fluorescencia presente opacaba incluso a la de los núcleos teñidos con DAPI. Posteriormente se evaluó mediante citometría de flujo la proporción de células que contenían este carbohidrato. Encontramos que el 99.4% de la población de monocitos contiene estructuras sializadas y al comparar MIF, nuestros datos correlacionaron a los previamente reportados por Videira y colaboradores en 2008, en los cuales se analizó una población de monocitos extraídos de sangre periférica de donadores sanos, reportando valores de MIF= 500 para la presencia de Sia. En el presente trabajos obtuvimos una MIF= 584. En el reporte de Videira, se evaluó la expresión de Sia en referencia al nivel de la diferenciación celular (los monocitos expresaron menor cantidad de Sia que los macrófagos o células dendríticas derivadas de monocitos). En el presente trabajo, los niveles de expresión de Sia en la superficie de los monocitos humanos, correlacionaban, ya sea detectándose mediante citometría de flujo o por microscopía confocal, por lo que se consideró un buen modelo de estudio.

En referencia a los hepatocitos de la línea celular humana HepG2 y de acuerdo a la literatura previa (Wang, 2005), en donde se ha propuesto que los niveles de expresión de Sia depende de diferentes sialiltransferasas y que la actividad de estas enzimas se modifican drásticamente durante la transformación celular, no se conocía si esta línea celular en particular expresaría Sia, por lo que inicialmente se evaluó tanto por citometría de flujo como mediante microscopía confocal la

existencia de éste azúcar a nivel de la superficie membranal. En las micrografías de los hepatocitos (Fig. 9.5) se observó la presencia de Sia en superficie celular aunque no en una distribución uniforme como la que se observó en los monocitos de sangre periférica y opuesto a lo esperado, su abundancia era también menor. La población celular de la línea HepG2 también era homogénea (94.5%). Comparando la MIF con células obtenidas de cultivos primarios de los monocitos de sangre periférica de personas sanas, se comprobó que fue menor, con un valor de MIF= 382.

10.2 Interacción DENV-Sia en la superficie de monocitos humanos de sangre periférica y hepatocitos humanos (HepG2)

Los monocitos son las principales células blanco para el DENV y juegan un papel importante durante la diseminación viral en el hospedero humano (Gubler 1998; Halstead 1988). Mientras que el papel del hígado durante la infección por DENV generalmente ha sido subestimado, aunque en el DS se presentan niveles elevados de enzimas hepáticas. Algunos reportes recientes sugieren que el hígado es uno de los órganos blanco para DENV y que los hepatocitos son un sitio importante durante la replicación viral *in vivo* (Hilgark and Stockert, 2000).

Para evaluar el DENV reconoce estructuras Sia a nivel de la superficie membranal tanto de monocitos primarios como de hepatocitos (HepG2) humanos, se utilizó un ensayo de co-localización, que consiste en marcar a dos o más moléculas en la misma sección, con fluoróforos que presenten diferentes espectros de excitación y por lo tanto se visualicen en diferentes colores, es decir se sobreposicionen o

sobrelapen. Este ensayo de interacción es una propuesta de nuestro grupo, ya que en la literatura general, los ensayos de interacción se desarrollan con virus marcados radioactivamente lo cual es costoso y con riesgos de seguridad. En los ensayos de co-localización, se utilizaron tanto anticuerpos como lectinas. Anteriormente se consideraba como posible inconveniente de los ensayos de co-localización que representa una técnica aparentemente cualitativa. Sin embargo, actualmente existen programas como el Biophotonics de Image J que permiten analizar las micrografías con valor cuantitativo, como el señalamiento de los lugares de co-localización, los diagramas de dispersión de color y el índice de Mandel.

En el presente trabajo se observó que para el caso de los monocitos humanos de sangre periférica hubo una elevada co-localización que se evidenció mediante la presencia de pixeles blancos como se muestra en las micrografías 9.8E y 9.9E. Asimismo, el índice de Mandel fue mayor a 0.5 en ambas micrografías, lo que confirma la presencia de co-localización del DENV con Sia presente en monocitos de sangre periférica a nivel de superficie celular.

Con respecto a los hepatocitos de la línea celular HepG2, el resultado del ensayo de co-localización fue menor al observado en monocitos, que se puede observar en la micrografía 9.11E, Los sitios de co-localización fueron pocos. Sin embargo, la micrografía 9.12E que representa la toma de una sola célula, muestra que existen varios sitios de co-localización del DENV-Sia en el hepatocito, estos sitios se indican en pixeles blancos. El índice de Mandel en estas muestras fue de 0.4085. En referencia a la interacción de posibles receptores con DENV en líneas

celulares hepáticas, existen estudios contradictorios, algunos sugieren que las células HepG2 pueden saturarse con DENV-1, con una unión máxima de aproximadamente 10^4 partículas virales por célula (Marianneau et al., 1996), otros indican que los hepatocitos de las líneas Huh7 y HepG2 no se saturan en presencia de diferentes títulos del DENV (Hilgark y Stockert, 2000; Suksanpaisan y Smith, 2003).

10.3 Ensayos de internalización del DENV en ausencia y presencia de Sia en monocitos y hepatocitos humanos (HepG2).

Como ya se mencionó anteriormente, un receptor putativo puede además de concentrar partículas virales en la superficie celular, desencadenar diferentes procesos de endocitosis para que el virus pueda ser internalizado al citoplasma donde posteriormente se replica. Con objeto de evaluar si el Sia participa durante la internalización del DENV en sus células diana, se llevaron a cabo diferentes ensayos de internalización viral en cultivos celulares pretratados con neuraminidasa (enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces de Sia en sus diferentes configuraciones). Como control negativo se utilizaron células tratadas con tripsina. Los diferentes tratamientos se llevaron a cabo previamente a la incubación con el DENV. En el caso de los monocitos humanos, se encontró que la internalización del DENV fue dosis dependiente, es decir, que un aumento de la cantidad de partículas virales correlacionó con una mayor internalización, lo que se observa en la figura 9.15. De manera interesante, observamos que tanto para una MOI 5 como para MOI 10 al rasurar el Sia presente en la superficie celular, la

internalización viral se eliminó. Al compararlo con el control negativo, el cual fueron células tratadas con tripsina corroboramos que el receptor del DENV-2 en monocitos es principalmente de naturaleza proteica, aunque existió un pequeño porcentaje de partículas virales que pudo internalizar lo que permite proponer que existen otras vías de entrada del DENV en los monocitos de sangre periférica. De manera similar a nuestros resultados, en 1993 Mady y colaboradores observaron que utilizando concentraciones elevadas (aproximadamente 5 unidades/ml) de neuraminidasa en células K562 (que es una línea humana de eritroleucemia), la infección con DENV-2 disminuyó considerablemente. Más aún, Thaisombbonsuk y colaboradores en 2005, reportaron que la neuraminidasa reduce la unión del DENV-2 a las superficies de las líneas celulares de mamífero LLC-MK2 y Vero e incluso postulan que el receptor de superficie en las células blanco podría contener motivos de ácido siálico y que la proteína de envoltura del DENV tal vez contenga un dominio que reconocería estos motivos.

La mayor parte de la literatura se ha enfocado a estudiar las interacciones tempranas del DENV con receptores principalmente de origen proteico y muy pocos de ellos han evaluado este tipo de interacciones que un virus con los carbohidratos, aunque su presencia es ubicua, su disponibilidad al exterior celular es realmente importante. Por ejemplo y como ya se mencionó anteriormente, los monocitos y macrófagos han sido identificados como los blancos celulares primarios a través de la participación de los receptores FC γ R1 y Fc γ RII que reconocen la región constante de las moléculas IgG heterotípicos no neutralizantes. Sin embargo, en monocitos humanos adherentes se observó la

presencia de posibles receptores sensibles a tripsina, además de los receptores Fc que son resistentes a la acción de la tripsina (Daughaday et al., 1981). Estos receptores sensibles a tripsina fueron postulados como los receptores de alta afinidad para DENV en el curso de una infección primaria (en ausencia de anticuerpos de reacción cruzada). Posteriormente, Chen y colaboradores, en 1999 detectaron una inhibición con LPS dependiente de CD14 durante la unión de DENV en monocitos humanos primarios, sugiriendo la existencia de una molécula acoplada a CD14 que funcionara como un receptor para el DENV. En el 2005 Reyes-Del Valle y colaboradores identificaron como receptor putativo para DENV a la hsp90, aunque es un miembro de la familia de chaperonas moleculares que residen primordialmente dentro de la célula, hsp70 y hsp90 pueden estar asociadas con la membrana celular en las balsas lipídicas durante la infección celular con el DENV.

Existen a la fecha múltiples estudios que intentan identificar los posibles receptores para el DENV en monocitos-macrófagos. Sin embargo, estos se han llevado a cabo utilizando líneas celulares transformadas y la infección de estas células no logra ser reproducida en modelos *in vitro*, a pesar de utilizar multiplicidades de infección muy elevadas. (Diamond et al., 2000; Lin et al., 1998). Por ejemplo, Moreno-Altamirano y colaboradores en 2002 refieren que el DENV-2 solo reconoce a las proteínas de macrófagos derivados de monocitos diferenciados de la línea celular U937, mientras que este mismo virus no logro reconocer alguna proteína en los extractos celulares de monocitos no diferenciados. Por lo que no es recomendable llevar a cabo este tipo de ensayos en líneas celulares

transformadas. En el presente estudio se encontró que el DENV interacciona con Sia en la superficie celular de monocitos humanos de sangre periférica y más aún esta molécula también es capaz de participar durante la internalización viral en monocitos. Sin embargo, en estudios posteriores se tiene que llevar a cabo tanto la identificación de los glicoconjugados que participan en estos procesos (unión e internalización viral). La internalización del DENV en células diana conlleva una activación de las mismas. En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo García-Pillado en 2011, demostró que la infección por DENV-2 produce una activación de células monocíticas de la línea celular THP-1 lo cual es importante tanto en el proceso pro-inflamatorio a través de la producción de TNF α ; como en la respuesta pro-coagulante con la expresión del receptor trombogénico: Factor Tisular. Ambos efectores actualmente están implicados en la patogénesis del DS.

En el caso de los hepatocitos, el efecto del tratamiento con la sialidasa (neuraminidasa) fue contrario al observado en los monocitos. En la figura 9.16 observamos que a una MOI 5, cuando se retira Sia de la superficie celular de los hepatocitos, probablemente se desenmascaran los sitios específicos de interacción en el receptor celular favoreciendo un incremento en la internalización del DENV a más del doble de partículas virales, y aunque en una MOI 10 también se observó un incremento en la internalización viral, pero en este caso fue menor de la mitad. En las células tratadas con tripsina, la internalización fue nula. Concordando con nuestros resultados Marianneau y colaboradores en 1996 reportaron que la adhesión del DENV-1 a células Vero y HepG2 fue reducida

cuando las membranas se trataron con enzimas proteolíticas, por lo que postularon que al menos una de las moléculas de superficie involucradas en la unión viral es de origen proteico.

Sin embargo, el incremento en la internalización del DENV en las células HepG2 tratadas con neuraminidasa, nos permite postular que al retirar al Sia en superficie celular existe posiblemente un re-arreglo en las proteínas de superficie que conlleve a que el posible receptor de DENV-2 en hepatocitos quede más expuesto y por lo tanto haya una mayor internalización, aunque esta hipótesis tendría que ser estudiada.

Por otro lado, Jindadamrongwech y colaboradores en 2004, identificaron otro posible receptor para el DENV-2 en hepatocitos, el GRP78 o BiP que es también un miembro de la familia de chaperonas moleculares como hsp90 o hsp70. Ya que estas proteínas habían sido identificadas como receptores para DENV en monocitos/macrófagos, se pensó que tal vez la identificación pudo haber sido errónea y que en realidad se trataba de hsp90 y hsp70 pero en células hepáticas. Sin embargo, Cabrera-Hernández y colaboradores en 2007, demostraron que el complejo hsp70/90 no interviene en la internalización de los virus dengue en células hepáticas, a través de ensayos de inhibición de la infección en células HepG2 en presencia de anticuerpos dirigidos contra hsp70 y hsp90. También se encontró que no existió inhibición de la entrada del virus en estas células pero si observaron un ligero incremento de la infección. Asimismo, también se presentó un incremento en la entrada del DENV en presencia de anticuerpos anti-hsp70. Los autores proponen que las células HepG2 expresan el complejo

CD14/hsp70/hsp90 en una forma funcional y que mientras el virus es capaz de unirse a este complejo, no resulta en una infección productiva del virus.

En base a lo encontrado en el presente trabajo, se puede postular que la interacción del DENV con sialoconjugados presentes en la superficie de los monocitos de sangre periférica y en hepatocitos de la línea celular HepG2 sea diferente. Apoyando a esta propuesta, Bielefeldt-Ohmann y colaboradores en 2001 a través de un estudio donde utilizaron los 4 serotipos de DENV y células de macrófago, células T y B, proponen que el DENV utiliza múltiples moléculas de superficie celular para unirse y para infectar a sus células blanco. Además las moléculas de unión del DENV en la membrana de la célula blanco pueden variar entre los tipos celulares y también variar para los diferentes serotipos de DENV.

Finalmente, se propone que el DENV al coexistir en la naturaleza entre el humano y el mosquito vector, pueda usar moléculas de diferente naturaleza para infectar a diversos tipos celulares y esto concordaría con el amplio tropismo que presenta este virus. Ya que es un virus de RNA, las mutaciones que puedan presentarse en la proteína de envoltura le conferirían la habilidad para reconocer diferentes estructuras. Además, basados en los reportes hasta ahora disponibles parece evidente que la unión y la internalización de los DENV son procesos en multipasos que involucran una unión ordenada y secuencial de varias moléculas en la superficie celular a través de reconocimiento de múltiples epítomos en la proteína de envoltura (McBride y Bielefeldt-Ohmann, 2000).

11. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se cumplieron los objetivos planteados en mi tesis de maestría. Se demostró que los monocitos humanos de sangre periférica y los hepatocitos humanos de la línea HepG2 presentan diferentes niveles de Sia a nivel de la superficie celular. También se encontró que Sia puede participar en las interacciones tempranas de monocitos humanos de sangre periférica, tanto en la unión en superficie celular al co-localizar con el DENV como en la internalización de virus dentro de la célula. Sin embargo, en los hepatocitos de la línea celular HepG2, aunque se observó co-localización del DENV con estructuras sializadas, no sabemos si este tipo de estructuras están protegiendo (ó enmascarando) al receptor de alta afinidad en la superficie del hepatocito, y al retirar al Sia la internalización viral puede incrementarse. Esto apoyaría la hipótesis de que el DENV reconoce estructuras diferentes de acuerdo a la estirpe celular. Sin embargo, se propone que la participación del glicocálix celular puede participar de manera importante modulando las interacciones muy tempranas de los DENV con sus células diana.

12. PERSPECTIVAS

Los resultados de esta tesis permiten realizar otras preguntas acerca de la posible propuesta del Sia como receptor putativo del DENV en monocitos humanos primarios:

1. Llevar a cabo ensayos de competencia para DENV en presencia de Sia libre en monocitos humanos.
2. Identificar mediante ensayos de overlay las posibles sialoproteínas a las cuales se une el DENV a partir de proteínas membranales de los monocitos humanos con y sin tratamiento de neuraminidasa para su identificación posterior mediante espectroscopía de masas.
3. Realizar ensayos de la posible inhibición de la internalización viral en presencia de los gliconjugados identificados.

13. BIBLIOGRAFÍA

Agarwal R, Chaturvedi UC, Misra A, Mukerjee R, Kapoor S, Nagar R, Tandon R y Mathur A. (1998). Production of cytotoxic factor by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with dengue haemorrhagic fever. *Clin Exp Immunol* 112:477–481.

Anderson R. (2003). Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 59:229–274.

Aoki S, Osada M, Kaneko M, Ozaki Y y Yatomi Y. (2007). Fluid shear stress enhances the sphingosine 1-phosphate responses in cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358:1054–1057.

Arnberg N, Edlund K, Kidd AH y Wadell G. (2000). Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol* 74:42-48.

Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S y Husmann M. (1998). Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol* 161:6338–6346.

Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsri A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, Pattanakitsakul SN, Yenchitsomanus PT, Mongkolsapaya J, Kasinrerak W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, Vasanawathana S, Bhakdi S, y Malasit P. (2006). Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* 193:1078–1088.

Baranowki E, Ruiz-Jarabo CM y Domingo E. (2001). Evolution of cell recognition by viruses. *Science* 292:1102-1105.

Barton ES, Youree BE, Ebert DH, Forrest JC, Connolly JL, Valyi-Nagy T, Washington K, Wetzel JD y Dermody TS. (2003). Utilization of sialic acid as a coreceptor is required for reovirus-induced biliary disease. *J Clin Invest* 111:1823–1833.

Basu A y Chaturvedi UC. (2008). Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53:287-299.

Bielefeldt-Ohmann H, Meyer M, Fitzpatrick DR y Mackenzie JS. (2001). Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Research* 73:81–89

Blix G, Lindberg E, Odin L y Werner I. (1956). Studies on sialic acids. *Acta Soc Med Upsaliensis* 61.

Bracken MB. (2005). Genomic epidemiology of complex disease: the need for an electronic evidence-based approach to research synthesis. *Am J Epidemiol* 162:297–301.

Cabrera-Hernandez A y Duncan RS. (2005). Mammalian dengue virus receptors. *Dengue Bolletin* 29: 119-134.

Cabrera-Hernandez A, Thepparit C, Suksanpaisan L y Smith DR. (2007). Dengue Virus Entry Into Liver (HepG2) Cells Is Independent of hsp90 and hsp70. *Journal of Medical Virology* 79:386–392.

Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S y Ubol S. (2007). Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol* 88:365–375.

Chaturvedi UC, Agarwal R, Misra A, Mukerjee R, Kapoor S y Nagar R. (1999). Cytotoxic factor in dengue haemorrhagic fever. *Med Principles Pract* 8:26–31.

Chatuverdi UC, Agarwal R, Elbishi EA y Mustafa AS. (2000). Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 28:183-188.

Chen YC, Wang SY y King CC. (1999). Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol* 73:2650–2657.

Chen X y Varki A. (2010). Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *AcsChemicalBlology* 5(2): 163-176.

Chen Y, Maguire T y Marks RM. (1996). Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol* 70:8765–8772.

Chen JP y Cosgriff TM. (2000). Hemorrhagic fever virus-induced changes in hemostasis and vascular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 11:461–483.

Clyde K, Kyle J y Harris E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and host determinants of Dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80(23): 11418-11431.

Coffey LL, Mertens E, Brehin AC, Fernandez-Garcia MD, Amara A, Depres P, y Sakintabhai A. (2009). Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes and Infection* 11:143-156.

Cologna R, Armstrong PM y Rico-Hesse R. (2005). Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 79: 853-859.

Daughaday CC, Brandt WE, McCown JM y Russell PK. (1981). Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun* 32:469-473.

Davis CW, Mattei LM, Nguyen HY, Ansarah-Sobrinho C, Doms RW y Pierson TC. (2006). The location of asparagine-linked glycans on West Nile virions controls their interactions with CD209 (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin). *J Biol Chem* 281: 37183–37194.

Dejana E, Tournier-Lasserre E y Weinstein BM. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell* 16:209-221.

Diamond MS, Edgil D, Robberts TG, Lu B y Harris E. (2000). Infection of Human Cells by Dengue Virus Is Modulated by Different Cell Types and Viral Strains. *Journal of virology* 74(17):7814–7823 .

Dimitrov DS. (2004). Virus entry. Molecular mechanism and biomedical applications. *Nature Reviews* 2: 109-122.

Dinglasan RR y Jacobs-Lorena M. (2005). Insight into a Conserved Lifestyle: Protein-Carbohydrate Adhesion Strategies of Vector-Borne Pathogens. *Infect Immun* 73(12): 7797-7807.

Eash S, Tavares R, Stopa EG, Robbins SH, Brossay L y Atwood W. (2004). Differential Distribution of the JC Virus Receptor-Type Sialic Acid in Normal Human Tissues. *AJP* 164(2):418-428.

Falconar AKI. (1997). The dengue virus nonstructural- 1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/ adhesin proteins and binds to human endothelial cells: Potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* 142: 897–916.

Gagneux P, Cheriyan M, Hurtado-Ziola N, van der Linden ECMB, Anderson D, McClure H, Varki A y Varki NM. (2003). Human-specific Regulation of α 2–6-linked Sialic Acids. *The journal of biological chemistry* 488(2): 48245–48250.

García-Pillado J. (2011). Expresión del receptor trombogénico Factor Tisular (TF) en monocitos estimulados con el virus Dengue. Tesis de maestría, México, Universidad Nacional Autónoma de México, citado el 6-12-2012.

Germi R, Jean-Marc C, Daniel G, Josette G, Hugues L, Rob WH, Ruigrok JZ y E Drouet. (2002). Heparan sulphate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 292: 162-168.

Gubler DJ. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11:480-496.

Gubler DJ. (2006). Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp* 277:3–16; discussion 16–22, 71–73, 251–253.

Guha-Sapir D, y Schimmer B. (2005). Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol* 2:1.

Guzman MG y Kouri G. (2002). Dengue: an update. *Lancet Infect Diss* 2:33-42.

Halstead S. (2007). Dengue. *Lancet*. 370: 1644–1652.

Halstead SB. (1988). Pathogenesis of Dengue: Challenges to molecular biology. *Science*. 239:476-481.

Halstead SB. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med* 42:350-362.

Halstead SB y O'Rourke EJ. (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146(1): 201-217.

Hilgark P y Stockert R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32(5):1069-1077.

Huang YH, Lei HY, Liu HS, LinYS, Li CC y Yeh TM. (2001). Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Tropic Med Hyg* 63:71-75.

Huang YH, Liu CC, Wang ST, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Wu HL y Yeh TM. (2001a). Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *J Med Virol* 63:247–251.

Hyypiä, T. (2006). Virus Host Cell Receptors. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi:10.1002/9780470015902.a0000433.pub2].

Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Thong K y Wong KT. (2004). Localization of Dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* 189:1411-1418.

Jiang L, Guo H y Fang D. (1999). Effect of dengue virus infection on the production of ET-1 and PGI₂ by human vascularendothelial cells. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 13: 239–242.

Jindadamrongwech S, Thepparit C y Smith DR. (2004). Identification of GRP78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 149(5):915-927.

Johnson AJ, Guirakhoo F y Roehrig JT. (1994). The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. *Virology* 203:241–249.

Kalia M y Jameel S. (2001). Virus entry paradigms. *Amino Acids* 41(5):1147-1157.

Kaludov N, Brown KE, Walters RW, Zabner J y Chiorini JA. (2001). Adeno-associated virus serotype 4 (AVV4) and AVV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* 75:6884-6893.

Kim KJ, Chung JW y Kim KS. (2005). 67-kDa laminin receptor promotes internalization of cytotoxic necrotizing factor 1-expressing *Escherichia coli* K1 into human brain microvascular endothelial. *J Biol Chem* 280(2):1360-1368.

Klimstra WB, Nangle EM, Smith MS, Yurochko AD y Ryman KD. (2003). DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. *J Virol* 77: 12022-12032.

Kumlin U, Olofsson S, Dimock K y Arnberga N. (2008). Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2(5):147–154.

Kurane I. (2007). Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 30:329–340.

Kurosu T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S y Ikuta K. (2007). Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 362:1051-1056.

Lei HY, Yeh T, Liu H, Lin Y, Chen S y Liu C. (2001). Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed* 8:377-388.

Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, Ramos C y Rico-Hesse R. (1999). Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73:4738-4747.

Li H, Clum S, You S, Ebner KE y Padmanabhan R. (1999). The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol* 73:3108–3116.

Limon-Flores AY, Perez-Tapia M, Estrada-Garcia I, Vaughan G, Escobar-Gutierrez A, Calderon-Amador J, Herrera-Rodriguez SE, Brizuela-Garcia A, Heras-Chavarria M, Flores-Langarica A, Cedillo-Barron L y Flores-Romo L. (2005). Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. *Int J Exp Pathol* 86:323–334.

Limonta D, Capó V, Torres G, Pérez AB y Guzmán MG. (2007). Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol* 40: 50–54.

Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Chen SH y Lin YS. (2003). Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol* 69:82-90.

Lin CF, Wan SH, Cheng HJ, Lei HY y Lin YS. (2006). Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral immunology* 19(2): 127-132.

Lin YL, Liao CL, Chen LK, Yeh CT, Liu CI, Ma SH, Huang YY, Huang YL, Kao CL, and King C. (1998). Study of dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. *J Virol* 72:9729–9737.

Lindenbach BD y Rice CM. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 59:23–61.

Liu CK, Wei G y Atwood WJ. (1998). Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an glycoprotein containing terminal alpha(2-6)-linked sialic acids. *J Virol* 72:4643-4649.

Mady B, Kurane I, Erbe DV, Fanger MW y Ennis FA. (1993). Neuraminidase augments Fc γ 2 receptor II-mediated antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Journal of General Virology* 74:839-844.

Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, Green S, Ennis FA y Rothman AL. (2002). Dengue specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis* 185:1697-1703.

Marianneau P, Megret F, Olivier R, Morens DM y Deubel V. (1996). Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *J Gen Virol* 77:2547–2554.

Martina BEE, Koraka P y Osterhaus AD. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 22(4): 564-580.

Matsuno K y Suzuki S. (2008). Simple fluorimetric method for quantification of sialic acids in glycoproteins. *Analytical Biochemistry* 375:53–59

McBride WJ y Bielefeldt-Ohmann H. (2000). Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2(9):1041-1050.

Mitrakul C. (1987). Bleeding problem in dengue hemorrhagic fever: platelets and coagulation changes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 18:407-412.

Moreno-Altamirano MM, Sanchez-Garcia FJ y Muñoz ML. (2002). Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J Gen Virol* 83:1123-1130.

Mukerjee R, Chaturvedi UC, Vaughn DW y Kalayanarooj S. (1997). Purification and pathogenicity of the cytotoxic factor from the cases of dengue haemorrhagic fever. *Curr Sci* 72:494-501.

Nachman RL y Rafii S. (2008). Platelets, petechiae and preservation of the vascular wall. *N Engl J Med* 359:1261-1270.

Narayanan S. (1994). Sialic acid as a tumor marker. *Ann Clin Lab Sci* 24:376–384.

Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F y Despres P. (2003). Dendritic-cell specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* 4:723-728.

Nishioka K. (1974). Serum complement level in dengue hemorrhagic fever. *Allerg Immunol (Leipz)* 21:385-392.

Noisakran S y Perng GC. (2008). Alternate hypothesis on the pathogenesis of Dengue hemorrhagic Fever (DHF)/ Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue virus infection. *Exp Biol Med* 233:401-408.

Nokbeh MR, Hazra S, Alexander DA, Khan A, McAllister M y Suuronen EJ. (2005). Enterovirus 70 binds to different glycoconjugates containing α 2,3-linked sialic acid on different cell lines. *J Virol* 79:113-114.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2009). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Edición en español. 2nd edn. Geneva: World Health Organization.

Olofsson S y Bergström T. (2005). Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Annals of Medicine* 37:154-172.

Perera R, Khaliq M y Kuhn RJ. (2008). Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res* 80:11-22.

Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao CA, Gregorio GG, Hendrickson WA, Kuhn RJ y Rossmann MG. (2006). Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell* 124:485-493.

Rasband WS. (1997-2012). ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>

Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F y Del Angel RM. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* 79(8):4557-4567.

Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A y Ramos C. (1997). Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230:244–51.

Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ y Vorndam AV. (1998). Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 352:971–977.

Rogers KM y Heise M. (2009). Modulation of cellular tropism and innate antiviral response by viral glycans. *J Innate Immun* 1:405-412.

Roseman S. (2001). Reflections on glycobiology. *J Biol Chem* 276:41527-41542.

Rosen L. (1986). Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of DHF: new data and a different conclusion. *May* 35(3):642-653.

Rostand KS y Esko JD. (1997). Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun* 65:1–8.

Sieczkarski SB y Whittaker GR. (2004). Viral entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 285:1-23.

Sinibaldi L, Goldoni P, Pietropaolo V, Longue C y Orsi N. (1990). Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. *Arch Virol* 113:291-296.

Smith AE y Helenius A. (2004). How virus enter animal cells. *Science* 304:237-242.

Sugrue RJ. (2007). Viruses and glycosylation. *Methods in Molecular Biology* 379:1-13.

Suksanpaisan L y Smith RS. (2003). Analysis of saturation binding and saturation infection for dengue serotypes 1 and 2 in liver cells. *Intervirology* 46:50-55.

Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpherer C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S y Marovich MA. (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197:823–829.

Teo D, Ng LC, Lam S. (2009). Is dengue a threat to the blood supply? *Transfusion Medicine* 19(2):66–77.

Thaisomboonsuk BK, Clayson ET, Pantuwatana S, Vaughn DW y Endy TP. (2005). Characterization of Dengue-2 virus binding to surface of mammalian and insects cells. *Am J Trop Med Hyg* 72(4):375–383.

Thepparit C y Smith DR. (2004). Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol* 78(22):12647-12656.

Thiel S, Frederiksen PH y Jensenius JC. (2006). Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Mol Immunol* 43:86–96.

Tomlinson SM, Malmstrom R y Watowich SJ. (2009). New Approaches to Structure-Based Discovery of Dengue Protease Inhibitors. *Infectious Disorders-Drug Targets* 9(3):1-17.

Traving C y Schauer R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *CMLS Cell Mol Life Sci* 54:1330-1349.

Valle JRD, Chavez-Salinas S, Medina F y del Angel RM. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol.* 79:4557–4567.

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley, Betozzi CR, Hart GW y Etzler ME. (1999). *Essentials of glycobiology*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Varki A. (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* 446:1023-1029.

Varki NM y Varki A. (2007). Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory investigation* 87:851-856.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA y Nisalak A. (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181:2–9.

Videira PA, Amado IF, Crespo HJ, Algueró MC, Dall'Olio F, Cabral MG y Trindade H. (2008). Surface α 2-3- and α 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconj J* 25:259–268.

Wang PJ. Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases. 2005. *Cancer Mol* 1(2):73-81.

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG y Frankel SS. (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 6:816–820.

Zeng L, Kurane I, Okamoto Y y Ennis FA. (1996). Identification of aminoacids involved in recognition by dengue virus NS3-Specific, HLADR15-Restricted cytotoxic CD4+ T-cell clones. *J. Virol.* 7:3108-3117.