



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**“INMUNOMODULACION DE CD209 EN  
MONOCITOS Y EN CÉLULAS THP-1 INDUCIDA  
POR VIRUS DEL DENGUE”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**CRISTOPHER RAMÍREZ SERRANO**

**ASESOR:**

**DR. SALVADOR FONSECA CORONADO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**“INMUNOMODULACION DE CD209 EN  
MONOCITOS Y EN CÉLULAS THP-1 INDUCIDA  
POR VIRUS DEL DENGUE”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**CRISTOPHER RAMÍREZ SERRANO**

**ASESOR:**

**DR. SALVADOR FONSECA CORONADO**

**CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Inmunomodulación de CD209 en monocitos y en células THP-1 inducida por virus del Dengue.

Que presenta el pasante: Cristopher Ramirez Serrano  
Con número de cuenta: 305226477 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Septiembre de 2013.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Marco Antonio Vega López	
<b>VOCAL</b>	M.V.Z. Angel Gemán Martínez Sosa	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HBA/mmgm

## **Dedicatorias**

Este trabajo está dedicado en primer lugar a Dios que da la vida y el ánimo.

A la familia y amigos.

## **Agradecimientos:**

En primera instancia le agradezco a Dios porque es el que da la vida y las oportunidades.

A mi familia porque siempre me ha apoyado en todos los aspectos de la vida.

A mi amigo, el M. en C. Juan Alberto Ruiz Pacheco, por el apoyo, el tiempo y la dedicación prestada para el desarrollo de este trabajo.

También se agradece a todo el grupo de trabajo del Dr. Salvador Fonseca Coronado, en especial a la M. en C. Karina Ruiz Tovar, por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Así mismo, a todos los integrantes del laboratorio de Inmunología Especial del InDRE, los cuales me brindaron siempre su incondicional apoyo.

A mis amigos

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunobiología de Enfermedades Infecciosas de la UIM, FES Cuautitlán de la UNAM bajo la dirección del Dr. Salvador Fonseca Coronado.

Esta tesis fue apoyada con fondos del proyecto CONACyT Salud-2011-C01-161716 “Desarrollo de un modelo predictivo de cuadros hemorrágicos debidos al virus del dengue basado en el análisis de polimorfismos de nucleótido único presentes en el promotor de DC-SIGN y  $TNF\alpha$  y en la secuenciación completa del gen E viral”.

<b>Contenido</b>	
Dedicatorias .....	4
Agradecimientos: .....	4
Contenido .....	6
Índice de figuras.....	9
Índice de tablas.....	9
Resumen .....	10
Introducción .....	11
Agente etiológico .....	13
Replicación viral .....	15
Epidemiología .....	17
Métodos de diagnóstico.....	19
Antecedentes.....	20
Células blanco del DENV .....	20
Células dendríticas y DC-SIGN (CD209).....	22
Relación monocito CD 209 y dengue .....	26
Línea celular THP-1 .....	27
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	28
Objetivo general .....	28
Objetivos particulares .....	28
Metodología y materiales.....	30
Células C6/36 .....	30
Obtención de abasto viral .....	30
Cuantificación del DENV .....	30
Cultivo viral en cerebro de ratones neonatos: .....	31
Purificación de monocitos.....	31
Trasformación de monocitos a células dendríticas.....	32
Infección de la línea celular THP-1 y de cultivos primarios de monocitos ..	32
Cuantificación de IL-8.....	33
Realización de las tinciones para citometría de flujo (CMF) a partir de línea celular, cultivos primarios de monocitos y sangre total .....	34
Transformación de RNA total a cDNA (DNA complementario) total .....	36

Integridad y cuantificación .....	36
Detección del mRNA de DC-SIGN y GAPDH por PCR .....	36
Resultados .....	38
Discusión .....	50
Conclusiones .....	57
Perspectivas .....	57
Referencias.....	58

## Abreviaturas

UTR	Región no traducible, del inglés <i>Untranslated Region</i>
CD 80	Grupo de diferenciación 80 del inglés " <i>cluster of differentiation 80</i> "
CD 86	Grupo de diferenciación 86 del inglés " <i>cluster of differentiation 86</i> "
CD-14	Grupo de diferenciación 14 del inglés " <i>cluster of differentiation 14</i> "
CD4	Grupo de diferenciación 4 del inglés " <i>cluster of differentiation 4</i> "
CD8	Grupo de diferenciación 8 del inglés " <i>cluster of differentiation 8</i> "
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario del inglés " <i>complementary Deoxyribonucleic acid</i> "
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CLR	Receptor lectina tipo C
CMF	Citometría de flujo
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CRD	Dominio de reconocimiento a carbohidratos del inglés " <i>Carbohydrate recognition domain</i> "
CT ó Ct	Ciclo umbral del inglés " <i>cycle threshold</i> "
DCis	Células dendríticas inmaduras del inglés " <i>Immature dendritic cells</i> "
DCs	Células dendríticas del inglés " <i>dendritic cells</i> "
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin</i> ó <i>CD209</i>
DENV	Virus del Dengue
DEV2	Virus del Dengue serotipo 2
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FD	Fiebre por dengue
FHD/SCD	Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque por Dengue
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos del inglés " <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> "

HRP	Peróxidasa de rábano picante del inglés " <i>horseradish peroxidase</i> "
ICAM-2	<i>Molécula de adhesión intercelular 2 del inglés "Intercellular adhesion molecule 2"</i> o CD102
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
INF B	Interferon beta
ITAM	Inmunoreceptor motivo de activación basado en tirosina abreviado del inglés, inmunoreceptor tyrosine-based activation motif)
MACP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MHC-1	Complejo mayor de histocompatibilidad clase 1
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase 2
MIP-I	Proteínas inhibitoras de macrófagos tipo 1
MOI	Multiplicidad de infección, del inglés " <i>Multiplicity of infection</i> "
mRNA	Molécula de ácido ribonucleico mensajero
NF-KB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas del inglés " <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> "
NK	Células asesinas naturales del inglés " <i>natural killer</i> "
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBA	Solución amortiguadora de fosfatos con albumina sérica bobina
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de polimerasa del inglés "polymerase Chain reaction"
PE	Ficoeritrina
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein Complex</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
Raf	Proteína Raf
Rak	Proteína Rak
Ras	Proteína Ras
Rho	Proteína Rho
RNA	Ácido ribonucleico del inglés "Ribonucleic acid"
RT	Transcriptasa reversa del inglés " <i>reverse transcriptase</i> "
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SE	Sin estímulo

SFB	Suero fetal bovino
sNS1	Proteína no estructural 1 soluble
Src	Proteína Src tirosina cinasas
TCR	Receptor de linfocitos T
Th1	linfocitos T
TLRs	Receptores tipo Toll
TM	Transmembranal
TMB	Tetrametilbencidina
Tyr	tirosina
UFP	unidades formadoras de placas

### Índice de figuras.

Figura	Título	Página
1	Modelos virales a diferentes pH y esquema del virus del dengue	14
2	Genoma y poliproteína del DENV	15
3	Modelo de Replicación del DENV	17
4	Distribución del DENV en el mundo	18
5	Distribución del DENV en México.	19
6	Estructura de la DC-SIGN y dominio CRD	24
7	La señalización DC-SIGN por micobacterias, virus y hongos	25
8	La estructura del complejo DENV-CR	27
9	Diseño experimental	30
10	Resultados de la titulación del DEV2.	39
11	Población de monocitos purificados por MACS	40
12	Prueba de <i>primers</i> de DC-SIGN y GAPDH.	40
13	Tinciones de citometría de flujo en células THP-1 infectas por DENV	41
14	Cultivo primario de monocitos a las 72 horas posinfección	42
15	Grafica de niveles de IL-8 en el experimento	44
16	Niveles de detección de sNS1	45
17	Curvas de amplificación	47
18	Validación de resultados	48
19	Niveles de expresión de DC-SIGN en monocitos infectados con DENV	49

### Índice de tablas.

Tabla	Nombre de la tabla.	Pág.
1	Clasificación realizada del dengue por gravedad de caso	13
2	Tipos de células susceptibles por la infección por virus del dengue	22
3	Secuencia de primers empleados	41

## Resumen

El virus del dengue es una de las enfermedades virales transmitidas por vector más importante del mundo ya que afecta a millones de personas en aproximadamente 112 países., En el caso particular de México los reportes del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, durante el 2012, identificaron la circulación de los 4 serotipos, para la semana epidemiológica número 30 del 2013, se reportaron 646 casos de DENV-1, 684 de DENV-2, 3 de DENV-3 y 26 del DENV-4, con un total de 1359 casos confirmados, estos datos ubican a la enfermedad del dengue como un problema de salud pública muy importante en nuestro país.

En la replicación del el virus del dengue, uno de los pasos más importantes es la unión a su receptor específico, existen varias moléculas las cuales han demostrado la capacidad de reconocer el virus del dengue e internalizarlo, entre estas moléculas la más estudiada es la glicoproteína CD 209 o DC-SIGN, esta proteína puede ser utilizada por diferentes patógenos para infectar a la célula portadora como a otras células, la glicoproteína CD 209 o DC-SIGN ha sido caracterizada como un marcador específico de células dendríticas, lo cual implica que las células dendríticas sean unas de las principales células diana del virus del dengue, las células dendríticas al ser células de origen mieloide al igual que los monocitos y los macrófagos comparten varias funciones, como la de fagocitar y ser células presentadoras de antígenos, se ha descrito que los monocitos son las principales células blanco de la infección del virus del dengue en circulación, por lo cual se desarrolló la siguiente hipótesis “la infección de monocitos con el virus del dengue, promueve la expresión de CD209 en estas células”.

En este trabajo se analizó la inducción en la expresión de CD209 en dicha población celular durante la infección por virus del dengue a nivel de mRNA, también se analizó la expresión de IL-8 como un marcador de la activación celular y se verificó que los monocitos estuvieran infectados analizando la expresión de sNS1, en donde se encontró que La infección por el virus del dengue 2 en cultivo primario de monocitos NO tiene la capacidad de regular la expresión del DC-SIGN.

## Introducción

### El dengue

Es una enfermedad infecciosa producida por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, -2, -3 y -4), que son transmitidos al humano mediante la picadura de mosquitos vectores (*Aedes aegypti* y *Ae. albopictus*). Es una de las virosis más importantes y se caracteriza por la aparición de un cuadro de fiebre indiferenciada, presentando tres formas clínicas principales:

- Dengue clásico o fiebre por dengue (FD), también denominada fiebre quebrantahuesos, en la cual hay presencia de fiebre, cefalea, mialgia, artralgia, dolor retroocular, exantema y vómito, principalmente.
- Dengue hemorrágico o fiebre hemorrágica por dengue (FHD), que se caracteriza por las manifestaciones de la FD acompañadas de un aumento de la permeabilidad vascular, lo que promueve la presencia de petequias, hematomas y hemorragias en mucosas, trombocitopenia y dolor abdominal.
- Síndrome de choque por dengue (SCD), la forma más grave de la enfermedad, en la que hay presencia de hepatomegalia, insuficiencia circulatoria, trombocitopenia y hemoconcentración, hipotensión, edema y choque, lo que puede llevar a la muerte del paciente (Souza y Ribeiro, 2004; Tsai y Vaughn, 2006; Souza y Reis, 2008).

En el 2009 la organización mundial de la salud realizó una nueva clasificación de los casos de dengue en función de la gravedad de la forma clínica (tabla 1). En este trabajo se usará la clasificación de la organización mundial de la salud

Tabla 1. Clasificación realizada del dengue por gravedad de caso.

Dengue con signos de alerta		→	Dengue Grave
Sin signos de alerta	Con signos de alerta		1. permeabilidad vascular severa 2. Hemorragia severa 3. Disfunción severa de órganos
Sospecha de Dengue	Signos de alerta		1. Permeabilidad vascular severa que conlleva a:
Zonas endémicas de dengue con FIEBRE + dos los siguientes criterios <ul style="list-style-type: none"> <li>• Náuseas, vómitos</li> <li>• Exantema</li> <li>• Dolores articulares</li> <li>• Prueba del torniquete positiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dolor abdominal</li> <li>• Vómitos persistentes</li> <li>• Hemorragia de mucosas</li> <li>• Edema</li> <li>• Letargo o agitación</li> <li>• Hepatomegalia &gt; 2 cm</li> <li>• LAB: aumento de HTD con disminución de plaquetas</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Choque (SSD)</li> <li>• Acumulación de fluidos a causa de fallo respiratorio</li> </ul>
			2. Hemorragia severa.
			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluada por el clínico</li> </ul>
			3. Disfunción severa de órganos.
			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hígado AST o ALT &gt;100</li> <li>• SNC pérdida de conciencia</li> <li>• Disfunción cardíaca y de otros órganos</li> </ul>
<b>CONFIRMACION DEL LABORATORIO</b>	<b>REQUIERE OBSERVACIÓN INTERVENCIÓN MÉDICA</b>		

(OMS; 2009)

### Agente etiológico

Los DENV pertenecen al género *Flavivirus* y a la familia *Flaviviridae*, para los cuales se ha reportado una homología del 70% en su estructura genómica (Chambers y cols., 1990, Putnak y cols., 1991; Leong y cols., 2007). Se trata de un virus envuelto, con apariencia esférica y de tamaño aproximado a 50nm (figura 1).

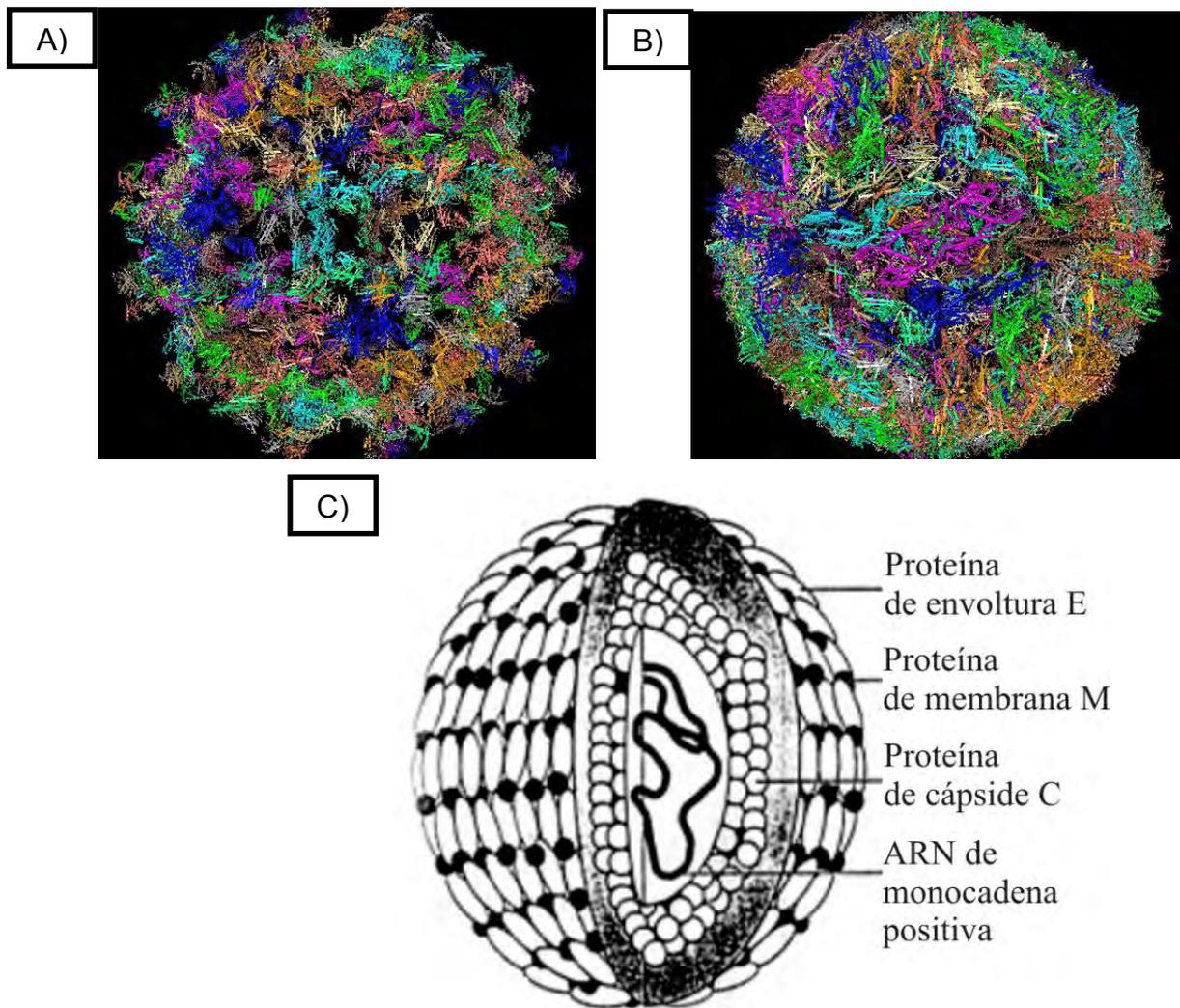


Figura 1. Modelos virales a diferentes pH y esquema del virus del dengue (A) Modelo del virus de dengue inmaduro a pH bajo B) modelo del virus del dengue maduro e infeccioso C) esquema del virus infeccioso (Wang y cols., 2011; Madej y cols., 2012) (<http://gsdl.bvs.sld.cu/greenstone/collect/clinicos/index/assoc/HASH7269.dir/fig01a02.png> consultada 04/08/2013).

Tiene RNA en su genoma con polaridad positiva, lo que le confiere la propiedad de comportarse como RNA mensajero, en sus extremos 5' y 3' contiene secuencias no codificantes o no traducibles (NCR o UTR, del inglés *noncoding regions* o *untranslated region*) (Carlos Yábar V. 2003). Posee un solo marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína, que es procesada en tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C), la de membrana (M), la cual se forma durante la maduración a partir del precursor denominado prM, y la proteína de envoltura (E), además de siete proteínas no estructurales, denominadas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5 (Brooks y col., 2002; Carlos Yábar V. 2003) (figura 2).

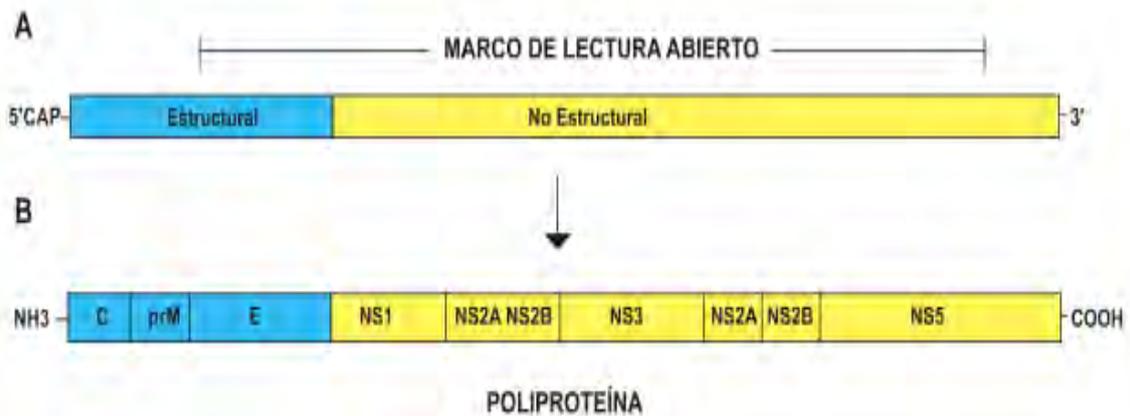


Figura 2. Genoma y poliproteína del DENV (Obtenido de <http://www.science.mcmaster.ca/Biology/Virology/23/ricky.htm> consultado el 15/07/2013)

## Replicación viral

Inicialmente ocurre la unión entre el virus y su receptor celular, de éstos se han descrito varios (heparán sulfato, CD14, proteínas de choque térmico de 70 y 90 kDa [Hsp70 y Hsp 90], el receptor de alta afinidad de laminina de 37/67 kDa y a la proteína GRP78/BiP). El receptor mejor caracterizado es la molécula DC-SIGN (del inglés "*Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin*") o CD209, en las células dendríticas (DCs) (Clyde y cols., 2006; Del Ángel, 2006). Posterior al reconocimiento se lleva a cabo la entrada del virus a la célula, por un proceso de endocitosis mediado por receptor, formando una vesícula endosomal en la que el pH ácido del medio promueve la exposición del péptido fusogénico en la proteína E viral, dando lugar a la fusión de las membranas viral y celular, lo que conlleva a la liberación de la nucleocápside al citoplasma y la posterior liberación del RNA viral (Mukhopadhyay y cols., 2005; Bartenschlager y Miller, 2008; Sierra Vázquez 2010; Wasinpiyamongkol y cols., 2010; Velandia y Castellanos 2011).

Una vez que el genoma viral se libera en el citoplasma de las células infectadas, se traduce en el retículo endoplásmico rugoso, debido a que el RNA viral actúa como RNA mensajero. Como resultado de la traducción se sintetiza la poliproteína que, luego de varias modificaciones post-traduccionales, da lugar a los componentes proteicos virales (Bartenschlager y Miller, 2008; Perera y Kuhn, 2008; Rodenhuis-Zybert y cols., 2010).

La replicación del RNA comienza con la síntesis de una cadena negativa complementaria que se emplea como molde para la síntesis de nuevas moléculas de RNA de polaridad positiva, que pueden ser usadas para la traducción de nuevas poliproteínas, síntesis de cadenas negativas o pueden ser empleadas para la formación de nuevos viriones (Talarico y cols., 2008; Acosta y cols., 2008).

El ensamblaje de la nucleocápside a partir de la proteína C, así como la adquisición de la envoltura ocurre intracelularmente. Los viriones son llevados en vesículas de transporte que salen de la membrana del retículo endoplasmático y son translocados al pre-Golgi pasando posteriormente al aparato de Golgi, en este organelo se realiza un corte proteolítico en la proteína prM originando la forma madura de la proteína M. En las vacuolas de pre y post Golgi opera un transporte exocítico de glicoproteínas de membrana a la superficie celular. Finalmente, cuando el virus se libera por exocitosis la proteína E adquiere la conformación final la cual puede ser reconocida por las moléculas receptoras de la célula blanco e iniciar un nuevo ciclo de infección en otra célula (figura 3) (Mukhopadhyay y cols., 2005; Bartenschlager y cols., 2008).

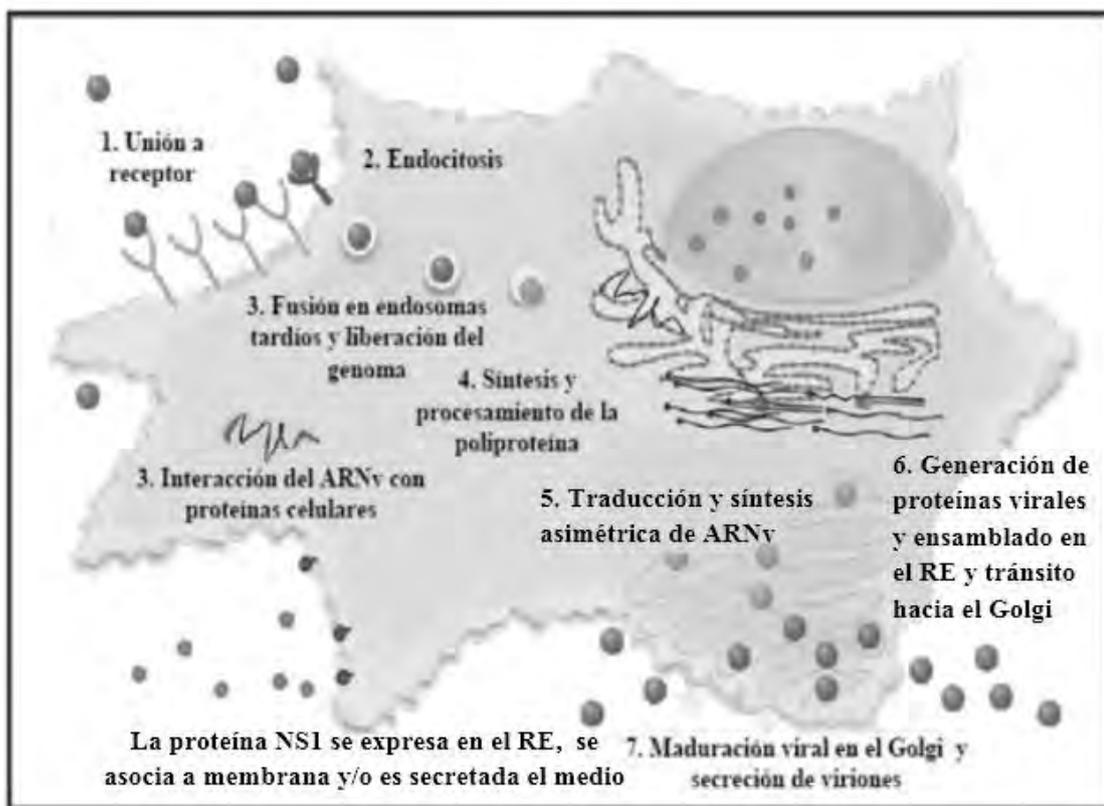


Figura 3 Modelo de Replicación del DENV (Adaptada de Clyde y cols., 2006)

## Epidemiología

El dengue es una de las enfermedades virales transmitidas por vector más importantes en el mundo y su distribución geográfica abarca las regiones tropicales y subtropicales (*World Health Organization, 2009*).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que la población en riesgo es del 40% al 50% a nivel mundial y esto se debe a la tasa de crecimiento poblacional de los países afectados, ya que los países ubicados en la región de amenaza son más de 100 (figura 4) (*Halstead, 2007; OMS, 2009 Guzmán y cols., 2010*).

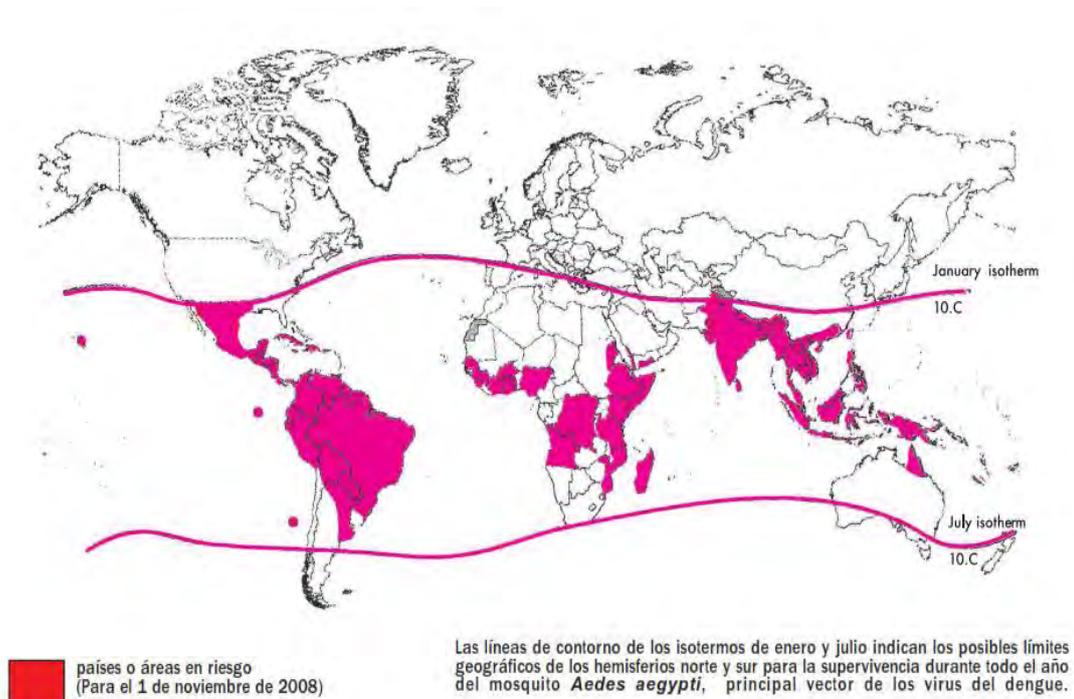


Figura 4. Distribución del DENV en el mundo (OMS; 2009 en esta figura se muestran los países en donde el vector *Aedes aegypti* se encuentra vivo durante todo el año)

En el caso de México, los reportes del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, durante el 2012, identificaron la circulación de los 4 serotipos; siendo los principales DENV-1 y -2, seguidos de un número menor de casos de DENV-4 y -3. El total de casos confirmados reportados fue de 50,013, con 64 defunciones, lo que correspondió a un incremento del 225.4% respecto a 2011, siendo el estado de Veracruz la entidad con mayor número de reportes.

Para la semana epidemiológica número 30 del 2013, se reportaron 646 casos de DENV-1, 684 de DENV-2, 3 de DENV-3 y 26 del DENV-4, con un total de 1359 casos confirmados (Figura 5).

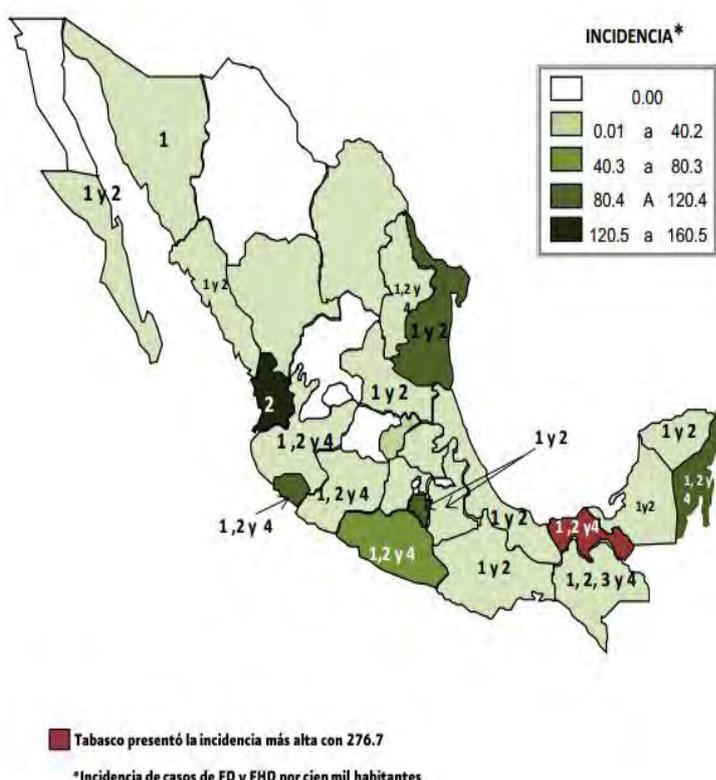


Figura 5. Distribución del DENV en México (tomada de [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANO\\_RAMAS\\_2013/Pano\\_dengue\\_sem30\\_sem2013.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANO_RAMAS_2013/Pano_dengue_sem30_sem2013.pdf) consultada el 04/08/2013)

En esta figura se muestran los serotipos del DENV presentes en cada estado).

## **Métodos de diagnóstico**

El diagnóstico eficiente y preciso del dengue es fundamental para la atención temprana y confirmación de casos, este se puede realizar de manera directa con diferentes técnicas, buscando ya sea proteínas o material genético del propio virus o de forma indirecta, mediante la detección de anticuerpos.

### **1. Detección de la proteína viral sNS1**

Actualmente, el algoritmo de diagnóstico de dengue, implementado por la Secretaría de Salud en México, indica como primera opción la detección de la proteína viral sNS1 en los sueros de los pacientes, ya que es la única proteína viral que es secretada por las células infectadas. Se puede detectar en el suero desde el día 1 posterior al inicio de la fiebre y hasta el día 9, por lo que es considerada como marcador de la fase aguda de la infección. Por lo anterior, se han desarrollado diferentes métodos para la detección del antígeno viral sNS1, que van desde pruebas rápidas de inmunocromatografía hasta procedimientos más complejos como el ELISA de captura. Este último método, se realiza en poco tiempo pero tiene la desventaja de no ser serotipo-específico y un resultado negativo no es totalmente excluyente de la infección viral (Leong y cols., 2002; Cardier y cols., 2005; Peeling y cols., 2010; Puttikhunt y cols., 2011).

### **2. Detección de anticuerpos específicos**

La respuesta inmune adquirida por la infección del DENV consiste en la producción de anticuerpos (IgM e IgG) que son específicos para la proteína E. Los anticuerpos IgM pueden ser detectables desde los días 4–6 después del inicio de los síntomas, con títulos más altos en infecciones primarias que en infecciones secundarias, por lo que en un pequeño porcentaje de los pacientes no se detectan anticuerpos IgM en la fase aguda de la enfermedad, pero sí se pueden encontrar IgG al igual que en los pacientes convalecientes con infección primaria. En la actualidad, ambas clases de anticuerpos son detectados mediante ELISA con altos valores de sensibilidad y especificidad, sin embargo, es un método indirecto para confirmar la infección por el virus y por lo tanto, no es posible la serotipificación del mismo (Oliveira y Lopes da Fonseca, 2004; Shu y Huang, 2004; Peeling y cols., 2010).

### 3. Aislamiento viral

El aislamiento viral se considera el “estándar de oro” para el diagnóstico y serotipificación de las infecciones por DENV y se realiza en muestras de pacientes que cursan la fase aguda de la infección. La forma más común es la inoculación en cultivos de líneas celulares de mamíferos como Vero, LLCMK2, BHK21 y la inoculación en cultivos de líneas celulares de mosquito como son C6/36, AP61 y TRA-284, para la identificación del serotipo viral, los resultados se obtienen en un periodo de 6 a 10 días post-inoculación mediante inmunofluorescencia de los cultivos infectados (Oliveira y Lopes da Fonseca, 2004; Shu y Huang, 2004; Peeling y cols., 2010).

### 4. Detección molecular del genoma viral

El método empleado para la detección del genoma viral es la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa o RT-PCR, del *inglés Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, de punto final o de tiempo real mediante la amplificación de diversas regiones del genoma (You y col., 2001; Shu y Huang, 2004; OMS, 2009; Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización de los virus del dengue 2010; Peeling y cols., 2010).

## **Antecedentes**

### **Células blanco del DENV**

Se han reportado una gama de células que soportan la infección por virus del dengue varias especies incluyendo al humano; en éste, las principales células blanco de la infección son las células del sistema inmune como los monocitos, macrófagos, células dendríticas y otras células del sistema retículo endotelial, aunque también se ha descrito que los fibroblastos y las células B pueden infectarse con DENV *in vitro*. Además se ha reportado que las células endoteliales y los hepatocitos pueden ser infectados por el DENV *in vivo* en pacientes con FHD, y de se han encontrado evidencias sobre la posible interacción entre el virus y otros tejidos como el cerebro, el intestino y el pulmón (Kouy col., 1992 Lin y cols., 1999; Courageot y cols., 2003; Lozach y cols., 2005)

En todas estas células se ha reportado la presencia de moléculas en su superficie las cuales pueden reconocer al virus y funcionar como un receptor viral o correceptores; estas moléculas, en su mayoría, se caracterizan porque tienen la capacidad de reconocer carbohidratos, este hecho es muy importante ya que la proteína E viral es una glicoproteína. En la tabla #2 se muestran tipos de células susceptibles a la infección del dengue, además de la molécula identificada como receptor viral (Chen y cols., 1999; Lin y cols., 2000; Wu y col., 200; Clyde y cols., 2006; Del Ángel y cols., 2006)

Tabla 2 Tipos de células susceptibles a la infección por virus del dengue.

Especie	Tipo celular	Descripción celular	Receptor del DENV
Mono	Vero	Células epiteliales renales	Heparan sulfato (HS) Glicoproteína (74kDa)
	LL-MK2	Células epiteliales renales	Glicoesfingolípidos
Humano	<b>monocito</b>	<b>Células mieloides primarias</b>	<b>CD14/LPS</b> <b>HSP70/HSP90</b> <b>Fc- receptor</b>
	<b>células dendríticas</b>	<b>Células mieloides primarias</b>	<b>DC-SIGN</b>
	macrófago	Células mieloides primarias	receptor de Manosa CLEC5A
	Huh	Hepatocito	HS
	HepG2	Hepatocito	Receptor laminar GRP78, HS
	HMEC-1	Epitelio dérmico	b3 integrina
	Hámster	BHK	Fibroblastos renales
CHO		Células ováricas	HS
Insecto	C6/36	Células de larva de <i>A. albopictus</i>	Receptor laminar (37/67kDa) HSP afin (45kDa) Prohibitina (35kDa)
	CCL-125	Células de larva de <i>A. aegypti</i>	Prohibitina (35kDa)
	AP-61	Células de larva de <i>A. pseudoscutellaris</i>	Glicoesfingolípidos

(Adaptado de Pierre-Y y cols., 2005)

Entre las moléculas que pueden desempeñar el papel de receptor para el virus del dengue se encuentra DC-SIGN o CD209, el cual es el más estudiado y caracterizado, esta proteína se encuentra en las células dendríticas conocidas como células de Langerhans, así como las células dendríticas dérmicas e intersticiales. (Pierre-Y y cols., 2005)

### **Células dendríticas y DC-SIGN (CD209).**

Estas células son una parte fundamental en la unión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, ya que la regulación inmune depende de la capacidad de las DCs de reconocer PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) por medio de los PRR (receptores de patrones de reconocimiento), entre los que se encuentran las lectinas tipo C (CLR) (Backovic M, Rey F 2005). El reconocimiento de patógenos por las lectinas de tipo C, conduce a la internalización de los agentes patógenos por la célula y al posterior procesamiento y presentación antigénica mediante moléculas del MHC de clase II a las células T a través del TCR (receptor de células T) (Kou y cols., 2008; Nielsen y cols., 2009; Marijeke y Schols 2012).

Entre las CLR mejor caracterizadas se encuentra la molécula DC-SIGN (CD209), la cual se encuentra codificada en el cromosoma 19p13.2-3 en el humano. DC-SIGN es una proteína de membrana que posee una secuencia de 404 aminoácidos y tiene un peso molecular de 44 kDa. Estructuralmente posee un dominio intracitoplásmico, una región transmembranal (TM) y un dominio extracelular. Este último contiene, a su vez, un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y el dominio del cuello repetido (se llama así porque en este dominio se repite 7 veces una secuencia de aminoácidos específicos). El dominio citoplásmico contiene un ITAM incompleto (en inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) (Sonja y cols., 2007)

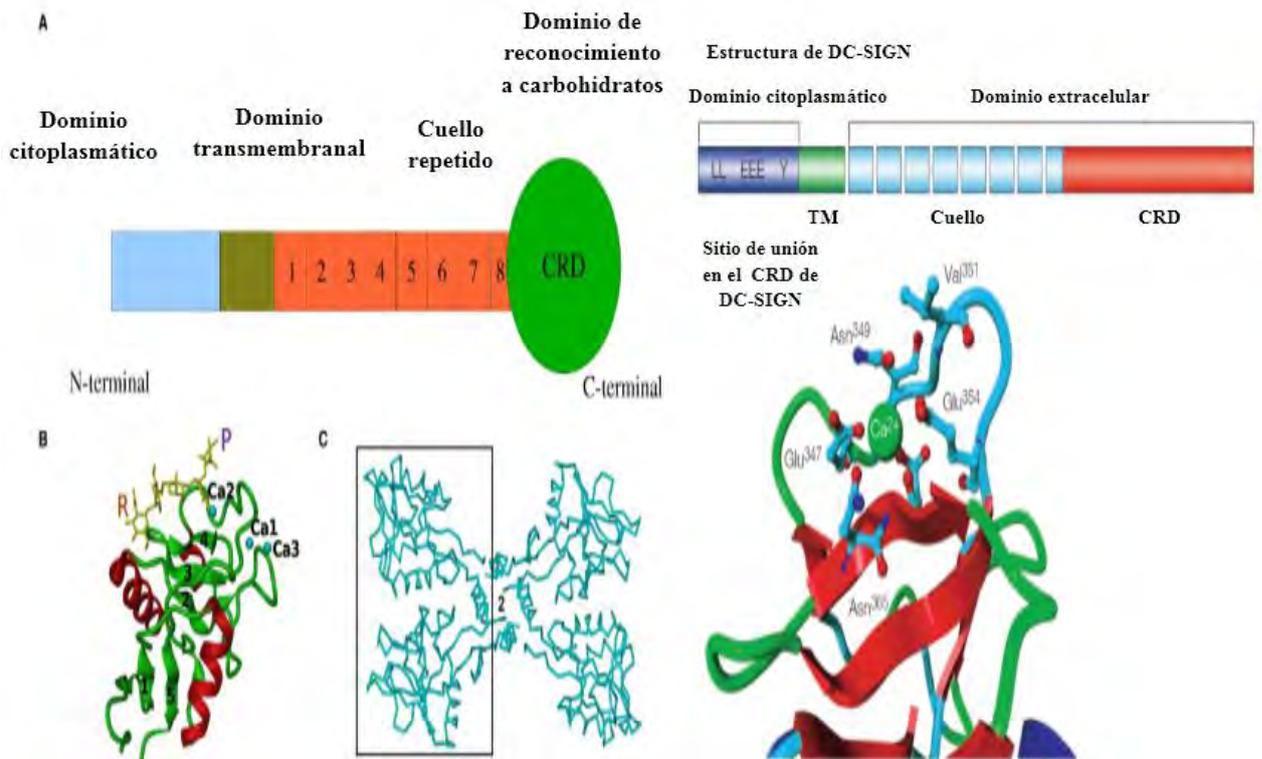


Figura 6. Estructura de la DC-SIGN y dominio CRD (tomado de Pokidysheva y cols., 2005)

En la figura 6 (A) se muestra la estructura de DC-SIGN; en (B) la estructura cristalina del monómero CRD se muestra como un diagrama de cintas. El oligosacárido unido (GlcNAc-manosa GlcNAc) se representa en amarillo, los tres ligados iones  $\text{Ca}^{+2}$  en azul, las hélices  $\alpha$  en rojo y el resto de la estructura, incluyendo las dos cadenas  $\beta$  plagadas en verde. El sitio aproximado de unión de los hidratos de carbono asociados con Asn67 en las moléculas rojas y moradas se marca con R y P, respectivamente. En (C) se observan los fragmentos usados como esqueleto para diseñar la forma tetramérica DC-SIGNR (Tassaneetrithe y cols., 2003)

El reconocimiento de varios patógenos, incluyendo *M. tuberculosis*, *C. albicans*, DENV y VIH 1 se lleva a cabo por su unión a DC-SIGN, éste a su vez activa tres rutas que convergen para activar Raf-1: la activación de Ras conduce a la unión a Raf-1 e induce cambios conformacionales que le permiten la posterior fosforilación de Raf-1 y las Src cinasas, Pak; estas cinasas generan la fosforilación de Raf-1 en el residuo Tyr340/341, mientras que Rho GTPasa es dependiente de la activación de cinasas Pak, resultando en la fosforilación de Raf-1 en Ser338. Seguida de la posterior translocation de NF- $\kappa$ B al núcleo celular, la fosforilación de NF- $\kappa$ B en la subunidad p65 en Ser276, que a su vez conduce a la acetilación de p65. La acetilación de p65 aumenta la transcripción de IL-10, lo que resulta en el aumento de la producción IL-10 (Sonja y cols., 2007).

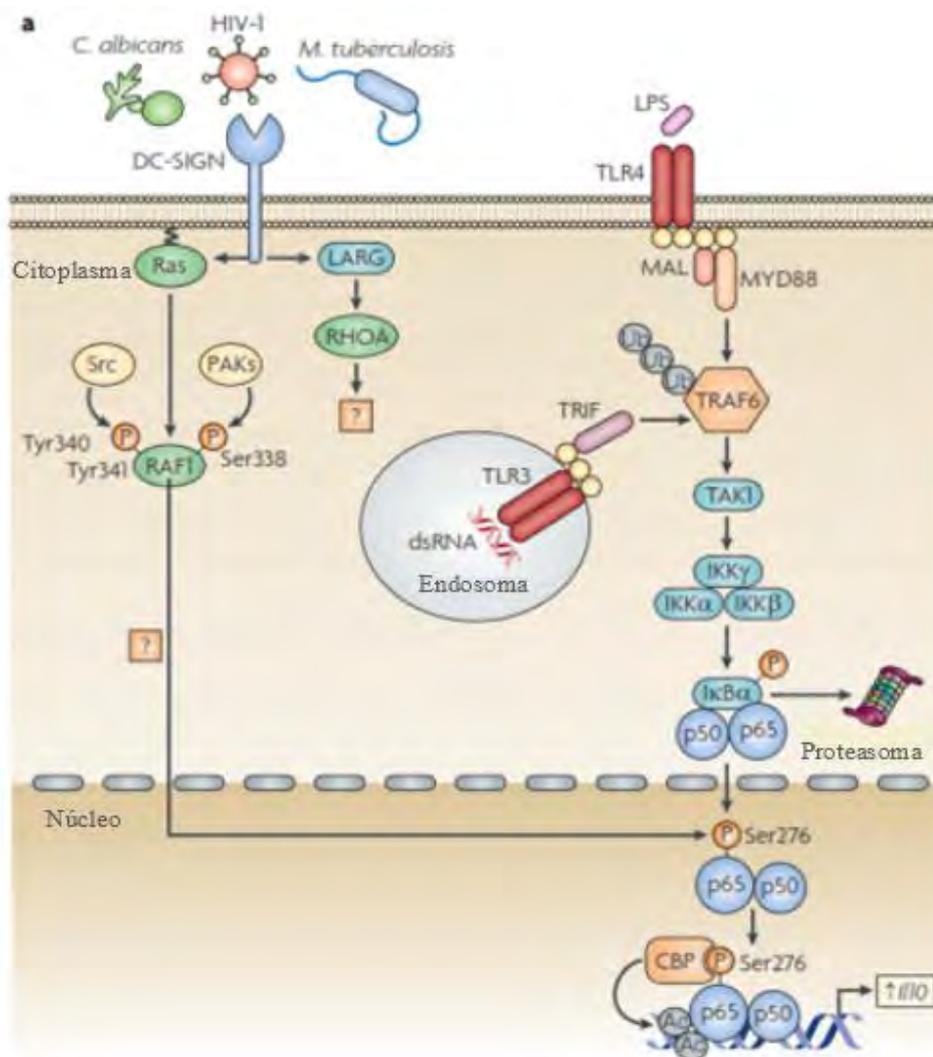


Figura 7. La señalización DC-SIGN por micobacterias, virus y hongos (tomado de Sonja y cols., 2007)

## Relación DC-SIGN –dengue

Como ya se mencionó la proteína DC-SIGN o CD-209 puede fungir con receptor del virus del dengue, esta información se obtuvo por medio de una serie de experimentos en donde se insertó el gen que codifica para DC-SIGN en células que no son permisibles a la infección por el DENV, con estos experimentos, se comprobó que las células que expresan DC-SIGN en su superficie son permisibles a la infección por DENV, demostrando el papel fundamental de esta molécula, sirviendo como receptor en la célula hospedera (Pokidysheva y cols., 2005)

Se han descrito también las interacciones entre la proteína E viral y el dominio CRD de DC-SIGN (Wahala W, Silva A 2011), donde el dominio CRD de DC-SIGN se une con gran afinidad a los residuos de manosa que están presentes en la proteína E del virus del dengue (Navarro y cols., 2003; Tassaneetrithep y cols., 2003; Nielsen y cols., 2009).

En la figura 8 se muestra en (A) la superficie sombreada representación del complejo DENV-CRD a  $25 \text{ \AA}$  (Amstrong  $\text{\AA} = 10^{-10} \text{ m}$ ) de resolución. Se muestran los tres dominios de la proteína E de color naranja, verde y rojo, el dominio CRD de DC-SIGN se muestra de color azul verdoso. Se delinean en negro las unidades de repetición de la proteína E en un esquema con una resolución de  $50 \text{ \AA}$ . En (B) el diagrama esquemático que muestra las posiciones de los sitios de glicosilación unidos a los aminoácidos Asn67 (●) y Asn153 (x) y en (C) el diagrama que muestra la vista lateral del dominio CRD acoplado a la proteína E del DENV. Donde se muestran las regiones en donde se lleva a cabo el reconocimiento de la proteína E entre las regiones marcadas como P y R en los aminoácidos N67 y N67 todo esto con una resolución de  $14 \text{ \AA}$  (Navarro y cols., 2003; Tassaneetrithep y cols., 2003; Yorgo y cols., 2003; Guo y cols., 2004; Zelensky y Gready 2005; Nielsen y cols., 2009).

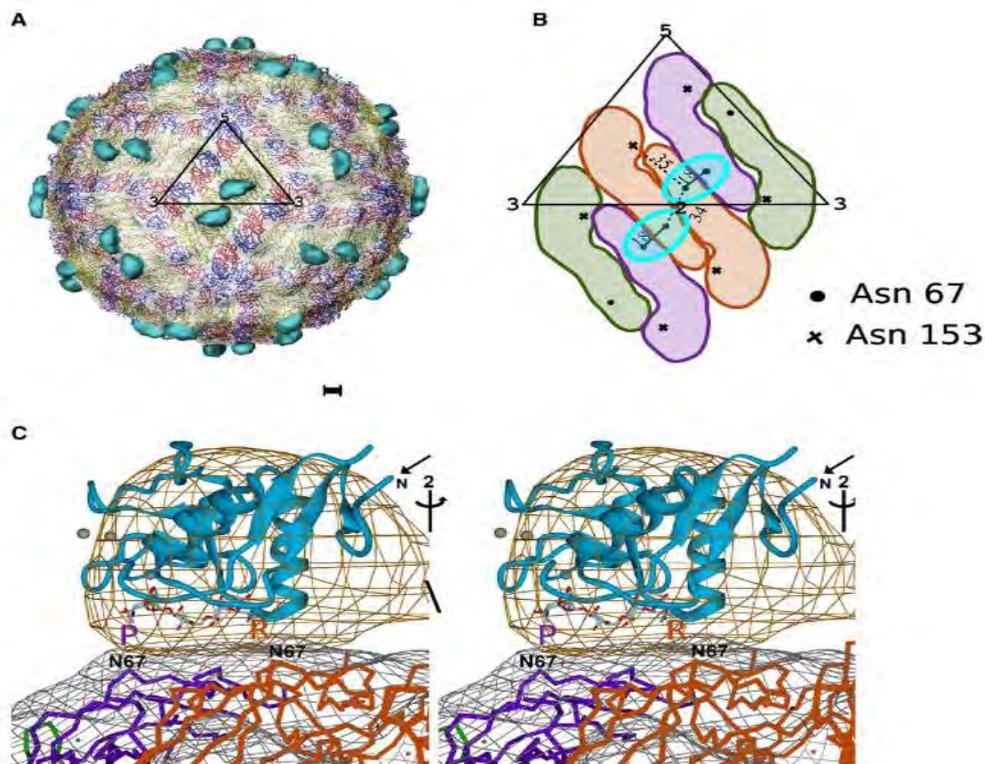


Figura 8. La estructura del complejo DENV-CR (tomada de Pokidysheva y cols., 2005)

### Relación monocito CD 209 y dengue

La gran mayoría de los estudios del dengue señala que las principales células blanco del DENV en sangre son los monocitos y también se ha reportado la plasticidad del monocito *in vitro* para transformarse a célula dendrítica por medio de la estimulación con IL-4 y GM-CSF, (Navarro y cols., 2003).

Lo anterior indica que hay una relación entre los monocitos y las células dendríticas ya que comparten origen mieloide y bajo ciertos estímulos presentan plasticidad; además, los monocitos y las DC son susceptibles a la infección por virus del dengue; sin embargo, a pesar de estos reportes, la molécula CD209 no está caracterizada como receptor que permita la infección de monocitos por DENV debido que se reporta baja o nula expresión en estas células (Navarro y cols., 2003; Tassaneetrithep y cols., 2003; Yorgo y cols., 2003; Guo y cols., 2004; Zelensky y Gready 2005; Nielsen y cols., 2009).

### **Línea celular THP-1**

La línea celular THP-1 proviene de un varón de 1 año de edad con leucemia monocítica aguda, esta línea celular ha sido usada para estudios inmunohistoquímicos de leucemia, además esta línea celular es un buen anfitrión de transfección de distintos genes para el estudio de interacciones proteína –proteína (<https://www.atcc.org/en/Global/Products/1/6/6/6/TIB-202.aspx> consultada el 30/10/13).

Estas células presentan una morfología redonda grande, de una sola célula, expresan en superficie receptores Fc y receptores de C3b, generan IL-1, expresan, HLA A2, A9, B5, DRw1, DRw2, se tiñen positivamente para esterasa butirato alfa-naftilo producen lisozimas y son fagocíticas (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/88081201?lang=es&region=MX> consultada el 30/10/13).

Se pueden diferenciar a monocitos y macrófagos utilizando éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) o PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetat), cabe mencionar que este cambio es dependiente del tiempo y de la concentración del estímulo ya sea PMA o TPA.

Se ha reportado que esta línea celular responde al estímulo de IL-4 y GM-CSF para diferenciarse a células dendríticas, por este hecho esta línea celular es una de las más utilizadas para el estudio de células dendríticas, además fue utilizada en amplios estudios del sistema monocito-macrófago (<http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/VIII/carteles/CVIII-35.pdf> consultada el 30/10/13).

Por su amplio uso en el estudio de interacciones proteína –proteína se decidió usar esta línea celular como un sistema premonocítico sin el estímulo para la diferenciación a monocitos ya que en este proceso de estimulación las células THP-1 pueden llegar a diferenciarse a macrófagos en donde las características que se estudió son muy diferentes, además de que al estimular a las células THP-1 se estaría aumentando las variables a controlar y por ende la reproductibilidad de los experimentos.

## **JUSTIFICACIÓN**

Ya que los monocitos son células de origen mieloide que se encuentran dentro de las principales células blanco del DENV en circulación, en este trabajo se analizará la inducción en la expresión de CD209 en dicha población celular durante la infección por virus del dengue.

## **HIPÓTESIS**

La infección de monocitos con el DENV, promueve la expresión de CD209 en estas células.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar la expresión de CD209, tanto a nivel mRNA como a nivel de proteína, en cultivos primarios de monocitos humanos y en la línea celular THP-1, ambos infectados con DENV-2.

### **Objetivos particulares**

- 1) Realizar cinéticas de infección con DENV-2, en cultivos primarios de monocitos humanos y en la línea celular THP-1.
- 2) Evaluar los niveles de mRNA de CD209 en las células infectadas mediante PCR en tiempo real.

## Diseño experimental

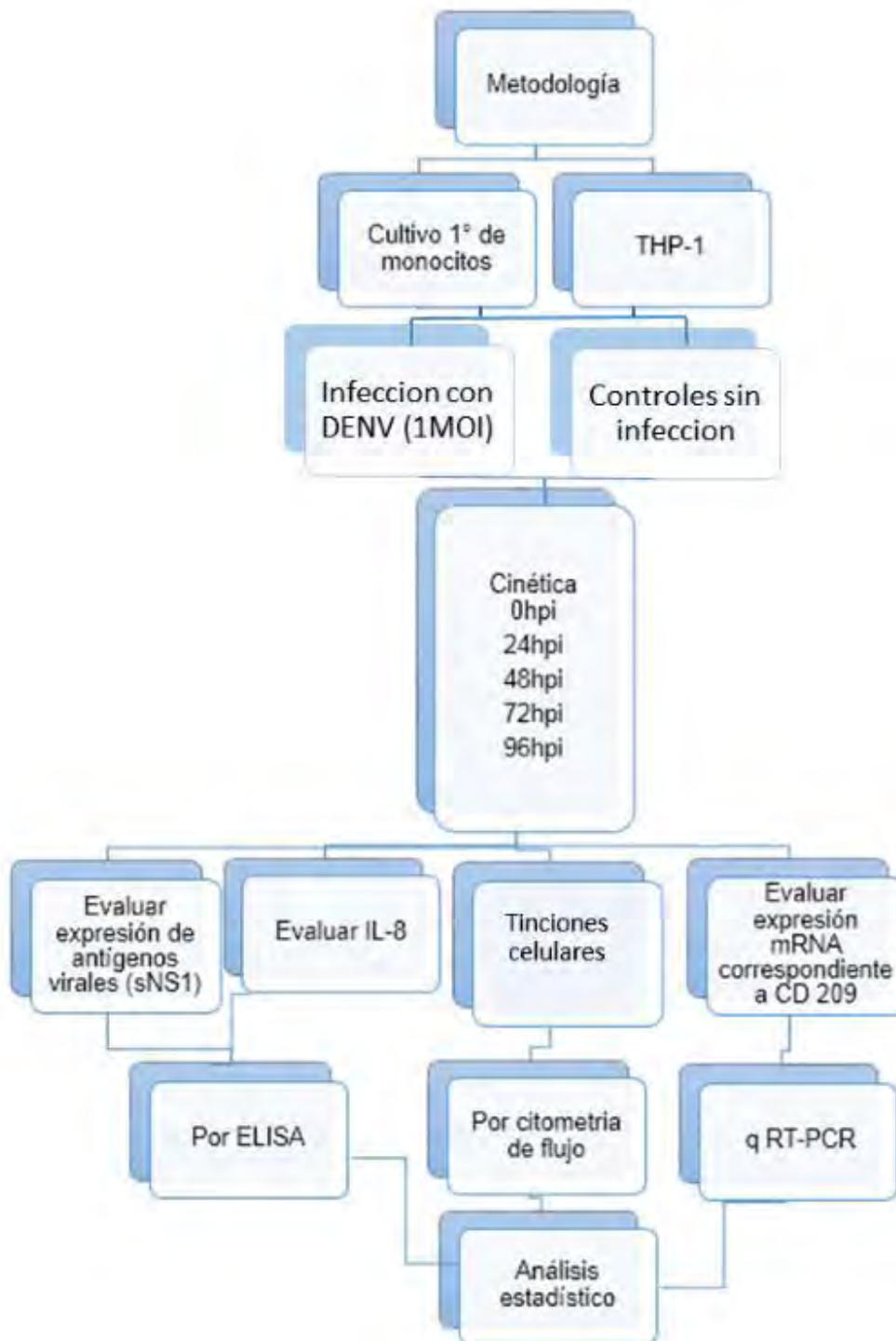


Figura 9. Diseño experimental (Se emplearon los cultivo primarios de monocitos y células THP- 1, se realizaron cinéticas de infección y se compararon con las células sin infección, se evaluaron los niveles de IL8 como un indicador de activación celular, se determinó los niveles de sNS1 como un indicador de la infección viral, la citometría de flujo se realizó para evaluar el comportamiento de CD-14 en superficie celular, se realizó la evaluación de la expresión de DC-SIGN a nivel de mRNA).

## **Metodología y materiales**

### **Células C6/36**

Para el crecimiento de las células C6/36 se utilizó medio MEM (*Minimum Essential Medium*) suplementando con SFB (Suero Fetal Bovino) [Gibco® E.U.A.] al 6%, 1% de vitaminas, aminoácidos no esenciales, L-glutamina [Gibco® E.U.A.] y antibióticos (penicilina-estreptomina Gibco® E.U.A.). En todo momento la línea celular se incubó a 28°C en atmósfera de aire.

### **Obtención de abasto viral**

Se utilizó la cepa prototipo de DENV-2 Nueva Guinea, la cual se cultivó en la línea celular C6/36 con medio MEM de mantenimiento (1% de suero fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomina, aminoácidos no esenciales, vitaminas y L-glutamina). Para lo anterior, a las botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con una monocapa confluyente al 80% de células C6/36, se les retiró el medio de crecimiento por decantación, posteriormente se adicionaron 4 mL de medio MEM de mantenimiento y 1 mL de DENV2 (con 1 MOI) y el sistema se dejó incubando a 28°C hasta que el efecto citopático fue evidente. En ese momento, se cosecharon las células y el sobrenadante infectado y se centrifugaron a 500 xg durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -70°C en fracciones de 1 mL hasta su uso.

### **Cuantificación del DENV**

El DENV se cuantificó por el método de formación de placas líticas sobre células BHK-21, incubando diluciones del DENV ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) sobre una monocapa de células BHK-21 ( $150$ - $300 \times 10^5$  células) en placas de cultivo de 24 pozos y con medio DMEM de crecimiento. El sistema se incubó durante 2 horas a 37°C y se adicionó medio semisólido *Overlay* (MEM 2x sin rojo de fenol al 3% de carboximetilcelulosa) para inmovilizar el cultivo. Se incubó durante 5 días a 37°C en atmósfera parcial de CO<sub>2</sub> (5%). Finalmente, la placa fue lavada con agua corriente, se adicionó colorante naftol azul-negro, se incubó durante 20 min. a temperatura ambiente y se realizaron 5 lavados con agua. Las placas líticas se contaron en cada dilución del virus y se aplicó la siguiente fórmula para cuantificar UFP/mL

$$UFP_{ml} = \frac{P \times 10^x}{V}$$

Dónde:

**P:** es el promedio del número de placas obtenido en la dilución en que se contaron las placas.

**10<sup>x</sup>:** es la dilución en que se contaron entre 10 y 100 placas (Factor de dilución).

**V:** es el volumen del inóculo expresado en mL

$$UFP \text{ mL} = P10^x \times 20$$

#### **Cultivo viral en cerebro de ratones neonatos:**

Con la finalidad de incrementar los títulos virales se inocularon 0.02 mL del virus del dengue por vía intracerebral en 7 ratones lactantes de 1 a 2 días de edad. Los ratones se vigilaron hasta que aparecieron signos característicos de la infección viral (parálisis o movimientos involuntarios en extremidades y pérdida de peso), en ese momento, los ratones se sacrificaron y se almacenaron a -70°C. Posteriormente, se realizó la disección del cerebro de los animales en condiciones de esterilidad, éste se maceró en un mortero frío con medio MEM o RPMI (Gibco® E.U.A.) con antibiótico y 5% de SFB. El macerado se centrifugó a 800 xg durante 5 min y se recuperó el sobrenadante, que se guardó a -70°C hasta su uso. Cabe señalar que el DENV obtenido se tituló por formación de placas líticas en células BHK-21.

#### **Purificación de monocitos**

La purificación de monocitos se realizó mediante selección positiva de células CD14 con perlas magnéticas (MACS, Miltenyi Biotechnologies, Alemania) a partir de concentrados leucocitarios donados por los bancos de sangre del Hospital General "Dr. Rubén Leñero" de la Secretaría de Salud del D. F. y del Centro Médico Nacional 20 de noviembre del ISSSTE. A partir de una muestra de sangre anticoagulada se purificaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por gradiente de ficoll (Ficoll-Hypaque, Sigma, E.U.A.). Se realizaron de 3 a 4 lavados con solución balanceada de Hanks o PBS estéril, después se contaron las células en cámara de Neubauer y se preparó una

suspensión celular de  $200 \times 10^6$  células/mL, a las células se les adicionaron 80  $\mu$ L de solución amortiguadora para MACs (PBS con 5% de albúmina sérica bovina y 10% de suero fetal bovino) estéril y 20  $\mu$ L anticuerpos monoclonales anti-CD14 acoplados a perlas magnéticas. Por cada  $10 \times 10^7$  células, el sistema se dejó incubando a 4°C durante 15 minutos, posteriormente se realizó un lavado con solución amortiguadora MACs y las células se resuspendieron en 3 mL de la misma solución. Esta suspensión celular se hizo pasar por una columna midi MACS LS acoplada a un magneto. La columna se lavó 4 veces con 3 mL de amortiguador de MACs, después se separó la columna del magneto y se le adicionaron 5 mL de la misma solución, se aplicó presión a la columna mediante un émbolo para recuperar a las células, las cuales se lavaron con medio RPMI 1640 (Sigma, USA) y se resuspendieron en el mismo medio con 10% de SFB. Las células se marcaron con anticuerpo anti-CD14 PerCP (usando las condiciones especificadas por el proveedor) y se leyeron en un citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson) para verificar su pureza.

#### **Trasformación de monocitos a células dendríticas**

Para contar con un control positivo de células CD209 (+) las células CD14(+) se incubaron en medio completo (RPMI 1640, 1% antibióticos, y 10% SFB) con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y tras 11 días de cultivo en presencia de 100 ng/mL interleucina 4 (IL-4 Peprotech E.U.A.) 100 ng/mL y de 100 ng/mL de factor estimulador de colonias granulocito/macrófago (GM-CSF Peprotech E.U.A.), se obtuvieron células dendríticas derivadas de monocitos; cabe mencionar que cada 72 horas se retiró el 50 % del medio de cultivo y se agregó un 50% de medio de cultivo nuevo con las mismas cantidades de citocinas.

#### **Infección de la línea celular THP-1 y de cultivos primarios de monocitos**

Tanto la línea celular como los cultivos primarios de monocitos y DC transformadas, se cultivaron en placas de 48 pozos a razón de  $5 \times 10^5$  células por pozo y se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 con medio RPMI de crecimiento (10% se SFB y 1% de antibióticos) y se incubaron a 37°C con atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24, 48, 72 y 96 horas postinfección. Por cada tiempo se generaron 4 sistemas:

1. Células sin estímulo (SE).
2. Células con 100 ng/mL de IL-4 y 100 ng/mL GM-CSF( IL-4 GMCSF).
3. Células infectadas con DENV 2 (DENV).
4. Células infectadas con virus “*mock*” (MOCK).

### **Cuantificación de IL-8**

Para esta determinación se empleó un “Kit” comercial de la marca Peprotech, *Human IL-8 Standard ELISA Development Kit*. Lo primero que se realizó fue una dilución del anticuerpo de captura (policlonal) con PBS a una concentración de 1µg/mL. Inmediatamente, se añadieron 100µl de cada pozo de la placa ELISA, se incubó la placa durante la noche a temperatura ambiente. Se aspiró el líquido de los pozos y se lavaron las placas 4 veces. Cada lavado consistió en la adición de 300µL de solución amortiguadora de lavado por pocillo, seguido de su eliminación por decantación. Después del último lavado, se añadieron 300 µL de solución amortiguadora de bloqueo a cada pocillo incubando por 1 hora a temperatura ambiente se lavó la placa 4 veces. La muestra patrón del *kit* se diluyó a 0.01 µg/mL con solución amortiguadora del diluyente. Añadiendo 100 µL de estándar o muestra problema a cada pocillo por triplicado. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas. Para la detección se lavó la placa cuatro veces. Se diluyó el anticuerpo de detección (biotinilado) en diluyente a una concentración de 0.5µg/mL (500ng/mL). Inmediatamente después, se añadieron 100µL por pocillo. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavó la placa 4 veces y se diluyó el conjugado avidina-HRP a una dilución 1:2000 en diluyente. Agregando 100µL por pocillo e incubando 30 min. a temperatura ambiente, se lavó la placa 4 veces y se añadieron 100µL de solución de sustrato ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) a cada pocillo finalmente se incubó a temperatura ambiente durante el desarrollo del color. El desarrollo de color se midió con un lector de placas de ELISA a 405 nm con corrección de longitud de onda fija en 650 nm se obtuvieron los resultados y se realizaron los análisis pertinentes, los cuales abarcaron la separación de los resultados por tiempo y estímulo para reportar el promedio de cada triplicado y calcular los resultados de cada problema o experimento.

### **Detección de NS1 por la técnica de ELISA**

Para esta determinación se empleó un Kit comercial de la marca Panbio N° E-DEN02P (Inverness medical Australia), se realizó una dilución 1 en 1 del Control Positivo, el Control Negativo, el Calibrador y las muestras problema. Añadiendo 75 µL del diluyente a 75 µL de muestra, se mezcló bien esta dilución después se añadieron 100 µL de las muestras de valoración y los controles diluidos en sus respectivos micro-pocillos de la placa del kit y se incubó la placa durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  transcurriendo el tiempo se lavó seis veces con la solución amortiguadora de lavado, después del último lavado se añadieron 100 µL de Mab anti-NS1 conjugado con HRP en cada pocillo, incubando la placa durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  se lavó seis veces con la solución amortiguadora de lavado. Al terminar los lavados se añadieron 100 µL de TMB en cada pocillo incubando la placa por 10 minutos a temperatura ambiente ( $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ ), cronometrando desde la primera adición esperando un color azul terminando el tiempo se añadieron 100 µL de la solución de paro en todos los pocillos en el mismo orden y tiempo que cuando se añadió el TMB (3,3',5,5' tetrametilbencidina) el color azul cambió a amarillo leyendo las absorbancias, de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm. Después de la lectura de la microplaca se realizaron las operaciones pertinentes el promedio del triplicado de la muestra y calcular los resultados de cada problema o experimento.

### **Realización de las tinciones para citometría de flujo (CMF) a partir de línea celular, cultivos primarios de monocitos y sangre total**

Se propusieron sistemas de tinción en los cuales siempre deben estar presentes un sistema sin ningún tipo de tinción como un control de autofluorescencia, además, de este control se requirieron de controles positivos por cada uno de los fluorocromos a utilizar, es decir, células en las que esté presente la proteína a identificar y que estén debidamente teñidas como controles de compensación. Teniendo en cuenta lo anterior, se colocaron aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por condición o sistema en tubos para CMF debidamente identificados (tipo de células, tiempo, estímulo, anticuerpos y fluorocromo) teniendo los tubos identificados se realizó un lavado a cada uno añadiendo 1 mL de PBA (PBS con 1% de albúmina sérica bovina) y

centrifugándolos a 500 xg decantando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla después se les agregaron los anticuerpos y se incubó a temperatura ambiente en una cámara oscura por 1 hora después se realizó de nuevo un lavado con 1 mL de PBA recolectando la pastilla agregando 300 mL de PBS, tratando de leer inmediatamente los tubos en el citómetro de flujo realizando los ajustes pertinentes para una correcta lectura.

Cabe señalar que se realizaron tinciones de superficie con anticuerpos anti-CD 209 con Ficoeritrina (PE) y anti-CD 14 marcado con (PerCP Santa Cruz Biotechnology CA EUA) y un kit para la detección de la proteína E del DENV marcado con isotiocianato de fluoresceína FITC (Becton- Dickinson, EUA). Todas las tinciones fueron evaluadas en un citómetro de flujo FASCsort de Becton-Dickinson (EUA) con su respectivo software. Aunado a esto se realizó un segundo análisis con el software Summit v4.3.

### **Purificación de RNA**

La purificación del RNA total se realizó a partir de los cultivos primarios de monocitos humanos, se utilizó el método de purificación por afinidad en columna, con el estuche comercial QIAamp® EasyRNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemania)

En un microtubo de 1.5 mL se colocaron 560 µL de la solución amortiguadora AVL y 5.6 µL de acarreador de muestra. Posteriormente, se adicionaron 140µL del lisado celular y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregaron 560 µL de etanol al 96-100% y se mezcló en vórtex por 15 segundos. Se adicionaron 630µL de la mezcla anterior a una minicolumna con tubo colector y se centrifugó a 6,000 xg por 1 minuto a 4°C, la mezcla restante se procesó de la misma forma y en la misma columna. La columna se lavó con 500 µL de la solución amortiguadora AW1, centrifugando a 6,000 xg por 1 minuto a 4°C cambiando el tubo colector y después con 500 µL de la solución amortiguadora AW2, centrifugando a 20,000 rpm por 3 minutos a 4°C cambiando el tubo colector nuevamente. Para la elución, la columna se colocó dentro de un micro tubo de 1.5mL libre de RNAasas y se adicionaron 60µL de la solución amortiguadora AVE dentro de ésta. El sistema se centrifugó a 6,000 xg por 1 minuto a 4°C. El producto eluído (RNA total) fue empleado inmediatamente o almacenado a -70°C hasta su uso.

## **Transformación de RNA total a cDNA (DNA complementario) total**

En esta etapa de la metodología se empleó un kit comercial SuperScript™ III Reverse Transcriptase (california EUA) siguiendo los pasos indicados por el fabricante en el inserto de este kit. Lo primero en este protocolo fue etiquetar correctamente tubos de 200µL (tiempo, condición y estímulo) a estos tubos se les añadió 5 µl del RNA total, con 50 ng de “*random primers*” al 2 pmol y 1 µL de oligo (dT) con una concentración de 5 µM llevando a un volumen de 13 µL. Esta mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos transcurrido el tiempo los tubos se colocaron en hielo durante 1 minuto después se les colocó a cada tubo 4 µL de First-Strand solución amortiguadora, 1 µl de DTT a una concentración de 0.1M, 1 µl de SuperScript™ IIRT ( 200 unidades/µl) después de añadir estos reactivos se incubaron los tubos a 50°C por 50 se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

### **Integridad y cuantificación**

Los productos obtenidos del paso anterior fueron analizados y cuantificados por espectrofotometría con el equipo *Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System* (BioTek®, San Francisco CA, USA). Se realizaron lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm y se obtuvo la relación 260/280 para verificar la pureza correspondiente (óptima de 1.5-2.0) teniendo esos datos se generaron alícuotas de cada cDNA con una concentración de 25 ng/µL diluyendo el cDNA con agua grado PCR.

### **Detección del mRNA de DC-SIGN y GAPDH por PCR**

Los “*primers*” utilizados se solicitaron a los laboratorios eurofins mwgloperon (Inglaterra) con las secuencias de reportes previos (tabla 2) (Cheong y col., 2010)

Se probaron estos “*primers*” mediante la técnica de PCR punto final, verificando así su correcta funcionalidad; para la determinación cuantitativa del mRNA de DC-SIGN se empleó la técnica de RT-PCR en tiempo real mediante el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  SYBR® Green (ROCHE EUA) en

un termociclador Lighcycler II de Roche. Siguiendo el protocolo del kit 480SYBER Green 1 Master.

Para realizar esta metodología se emplearon placas de 96 micropozos en donde a cada pozo se le colocaron 3  $\mu$ L de agua grado PCR, 2  $\mu$ L de primers específicos DC-SIGN y 10 $\mu$ L del Master mix del kit

Después de tener la placa lista con los reactivos se introdujo en el termociclador utilizado en la etapa de pre- incubación un ciclo de 95°C durante 5 minutos, en la etapa amplificación se emplearon 45 ciclos divididos en fases; para la fase de alineación 55°C por 20 segundos, y para la fase de disociación 95°C por 10 segundos, además, de un ciclo de parado a 95°C por 1 minuto y un ciclo final de enfriamiento a 40°C por 5 minutos. Los resultados obtenidos se analizaron con el “software” Roche LightCycler 480 Version 1.2.9.11 para identificar la expresión relativa de DC209 en relación al gen constitutivo GAPDH.

Tabla 3 secuencia de “primers” empleados

“Primer”	secuencia 5´ a 3´
DC-SIGN FW	TGCACCACCAACTGCTTAGC
DC-SIGN RV	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
GAPDH FW	TTCCTGGCTCTTGACA
GAPDH RV	CCACCACGATGAATACTACA

(Cheong y col., 2010)

## Resultados

Como primer resultado de este trabajo se obtuvo la titulación del stock de DENV 2 empleado en todos los experimentos, es preciso mencionar que para la obtención de un título viral adecuado se realizaron una gran cantidad de titulaciones, pases virales en células C6/36 y pases virales en cerebros de ratón neonato, además, de la modificación y estandarización de la técnica de titulación obteniendo mejores resultados en la titulación, (figura 10)

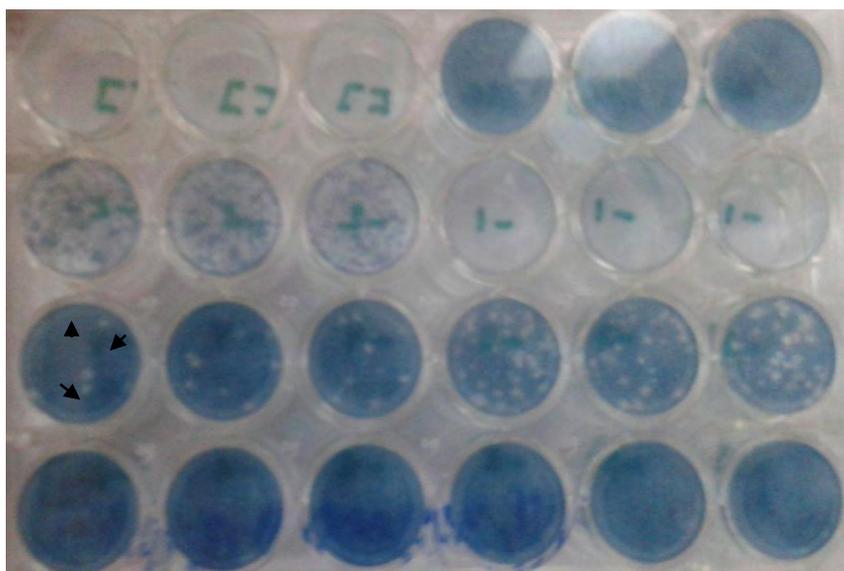


Figura 10. Resultados de la titulación del DEV2 (para la generación del stock UFP/mL =  $14 \times 10^6$ )

Se estandarizaron las condiciones de la purificación celular por el método de perlas magnéticas MACS, en la figura 11 A) se muestra la gráfica de complejidad y tamaño y en la B) la tinción simple con anti-CD14 donde se demostró por este modo que las células purificadas son monocitos y el porcentaje de pureza del 97.14% el cual está en los estándares de esta técnica vale la pena mencionar que se este procedimiento se realizó 3 veces en donde el promedio obtenido fue de 97.14 y la desviación estándar fue de 0.5.

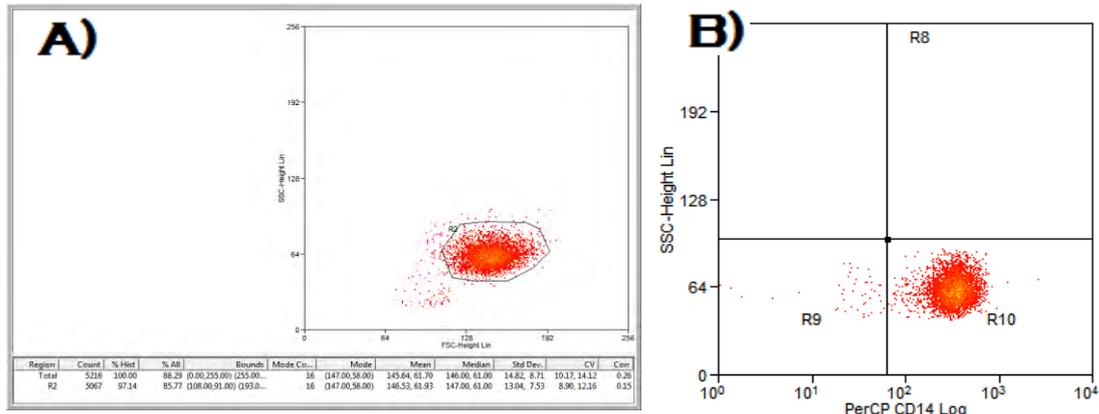


Figura 11. Población de monocitos purificados por MACS (nivel de pureza del 97.14%)

Al contar con los “*primers*” específicos para DC-SIGN y GAPDH, además, de tener estandarizada la purificación de monocitos y las condiciones de cultivo de la línea celular THP-1, se decidió realizar la extracción de RNA total de monocitos purificados, células THP-1 y células THP-1 estimuladas con PMA en el estadio de macrófagos para evaluar los “*primers*”, los resultados se observan en la figura 12.

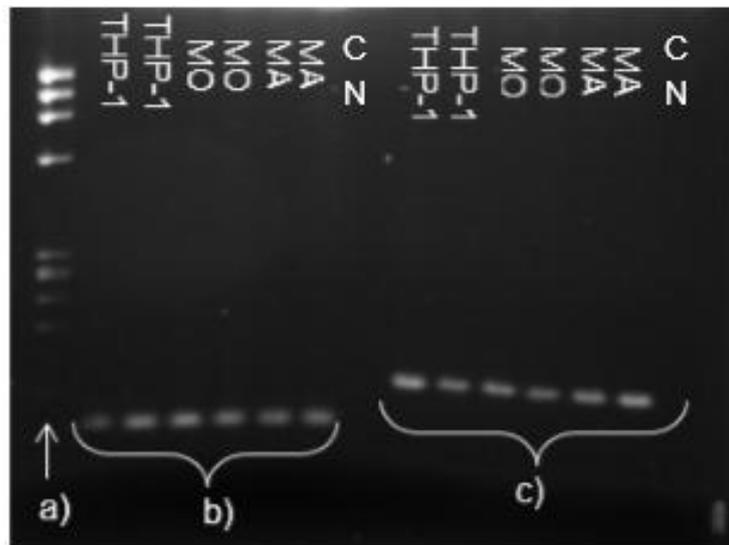


Figura 12. Prueba de primers de DC-SIGN y GAPDH. (En la fotografía se muestra la amplificación a partir de los RNA de Monocitos y la línea THP-1

a) marcador de peso molecular b) primers para GAPDH c) primers para DC-SIGN)

MO= monocitos THP-1=células THP-1 MA= células THP-1 en estado de macrófagos CN=control negativo

Al lograr la detección en DC-SIGN en células THP-1 sin ningún tipo de tratamiento, se decidió realizar experimentos con esta línea celular en los cuales se efectuaron cinéticas de infección tomando células cada 24 horas pos-infección (HPI) a partir del tiempo 0 hasta las 96 horas, después a las células obtenidas se les realizaron tinciones con anticuerpos anti-CD14 como marcador de monocitos, y anti-E como marcador de infección viral por dengue para observar el comportamiento de estos marcadores en esta línea celular, y se analizaron por CF (citometría de flujo) como se muestra en la figura 13.

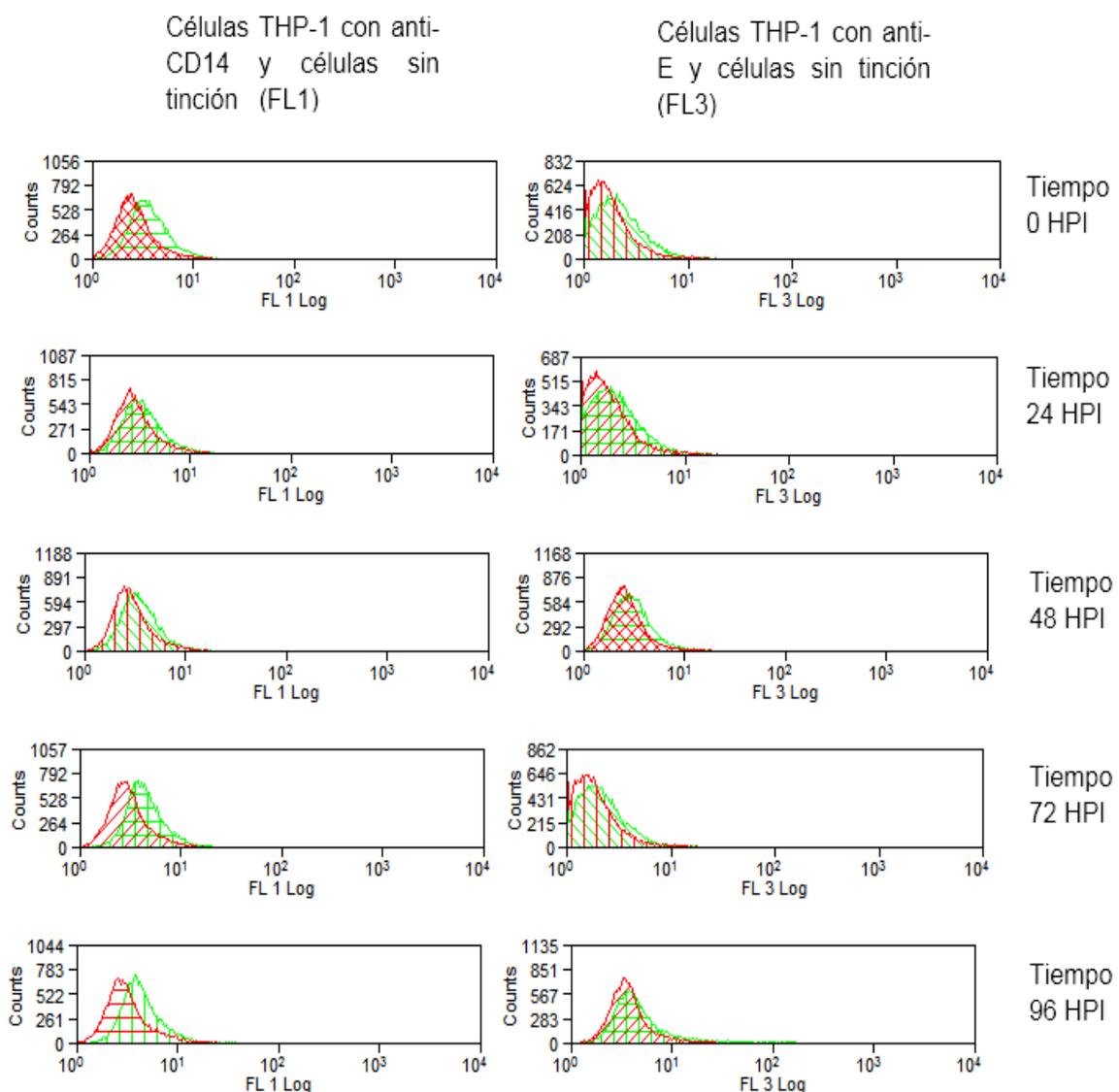


Figura 13. Tinciones de citometría de flujo en células THP-1 infectadas por DENV. (se muestran de color rojo las células sin tinción y de color verde las células con tinción)

La tinción doble a todos los tiempos analizados (0, 24, 48, 72 y 96 horas postinfección) tanto para la detección de la proteína E FITC en la superficie de las células THP- 1 como para el marcador de monocitos CD14 indican que la línea celular THP-1 es muy poco permisible a la infección por el virus del dengue y expresa muy pocos niveles de CD14.

Por estas razones se decidió trabajar en adelante monocitos humanos para la detección del mRNA de DC-SIGN se emplearon los “*primers*” antes citados en la metodología y monocitos purificados por MACS utilizando  $5 \times 10^5$  células por pozo en placas de 48 pozos con 500  $\mu$ L de medio RPMI +10% de SFB +1% de antibióticos y se establecieron 4 sistemas:

1. Células sin estímulo (SE).
2. Células con IL-4 y GM CSF.
3. Células con DENV (1 MOI).
4. Células con MOCK (virus inactivo).

Con base en los sistemas planteados se realizó la cinética de 0, 24, 48, 72, 96 horas pos-infección con cada uno, con 3 sujetos diferentes (donadores sanos del banco de sangre) en donde se midió el nivel del mRNA de DC-SIGN por qRT-PCR, así como la detección de NS1 (ELISA) y la cantidad de IL-8 (ELISA).

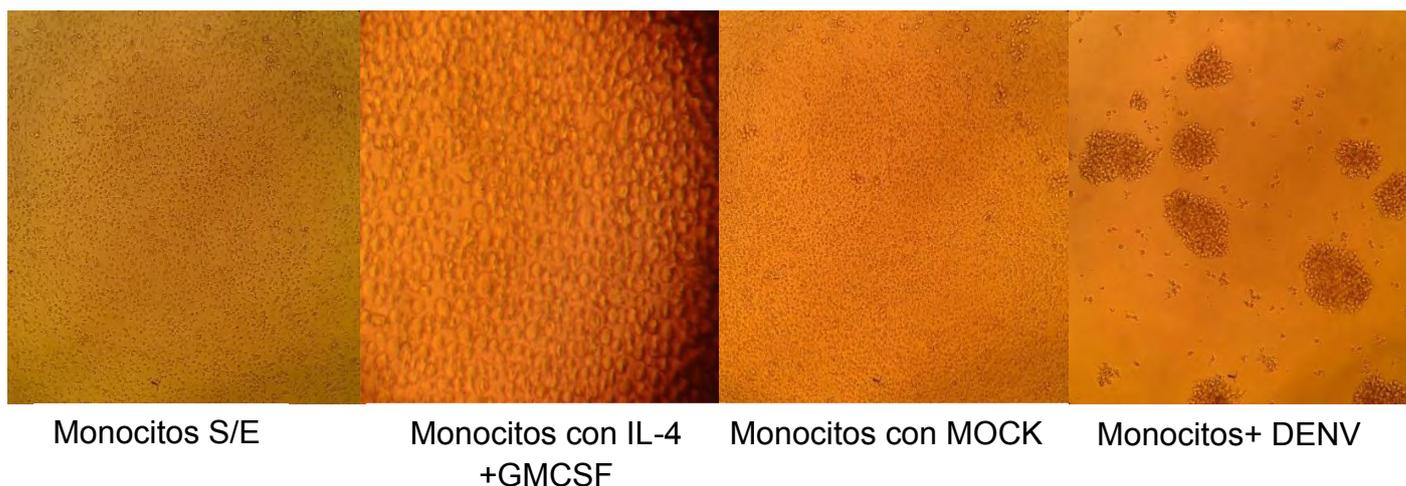


Figura 14. Cultivo primario de monocitos a las 72 horas posinfección en cada sistema en donde se observan la aglutinación celular con el estímulo de dengue

Los cultivos de monocitos presentaron un desarrollo homogéneo en todos los sistemas excepto en el que se infectó con DENV 2 activo, en donde se observó un fenómeno de generación de aglutinación que fue muy evidente a las 72, 96 horas pos-infección, sin llegar a la formación de sincicios característica de la infección sobre algunos tipos celulares como la línea C6/36.

Se realizó la determinación de IL-8 para verificar la activación de los monocitos en los sistemas MOCK, DENV y SE, puesto que es una de las principales citocinas generada por los monocitos durante la infección por virus del dengue,

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis estadístico de ANOVA y una prueba de Tukey con el 95% de intervalo de confianza en el software (GraphPas Prism versión 5.2) con una  $P < 0.05$  originando así la figura 17.

Se observó que en el tiempo 0 solo hay cambios significativos en el sistema MOCK y este sistema es el único que se mantiene constante durante el experimento.

Mientras que en el sistema DENV se observó un aumento continuo en los valores de IL-8, teniendo como máximo el tiempo 48 horas (H), después de este tiempo los valores de IL-8 en el sistema se mantuvieron constantes.

En el sistema SE se observó un aumento en el tiempo 24 horas (H), el cual se mantuvo constante a lo largo del experimento

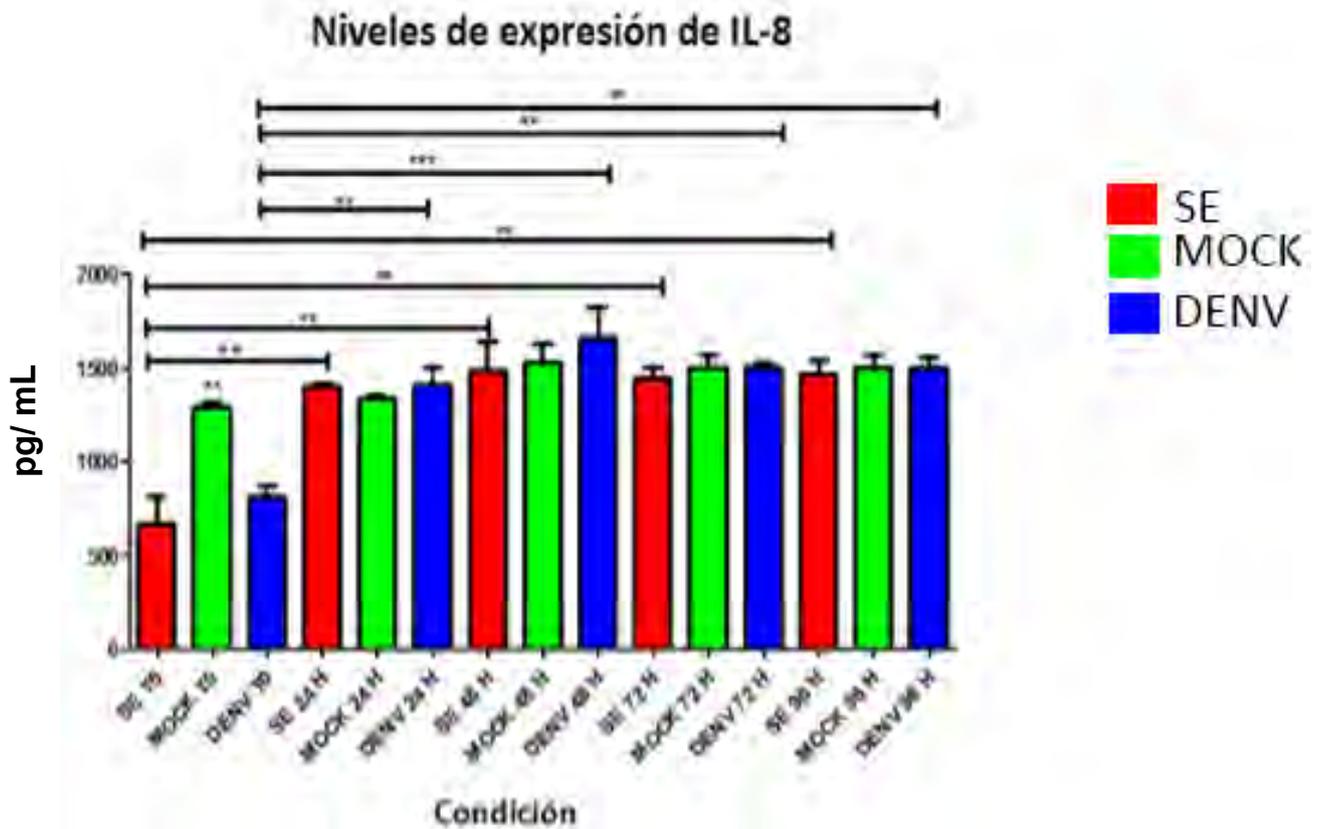


Figura 15. Niveles de IL-8.

(Donde SE son las células sin estímulo, MOCK son los monocitos estimulados con MOCK, DENV son los mocitos infectados con virus del dengue, Las líneas superiores representan la significancia entre la misma condición experimental.

Donde la terminación T0 refiere al tiempo 0 del experimento

Donde la terminación 24 H refiere a las 24 horas del experimento

Donde la terminación 48 H refiere a las 48 horas del experimento

Donde la terminación 72 H refiere a las 72 horas del experimento

Donde la terminación 96 H refiere a las 96 horas del experimento)

Se realizó la determinación de sNS1 por ELISA, este resultado nos indica si los monocitos realmente se infectaron por el DENV. Los resultados de la detección de sNS1 en los sobrenadantes de los sistemas SE, DENV viable, MOCK y IL-4 GM CSF. Se graficaron usando los promedios de las tres determinación por cada tiempo y de cada sistema en cada uno de los tiempos, originando así la siguiente gráfica (figura 18).

En donde se aprecia que el estímulo de 1MOI de DENV fue suficiente para infectar a los monocitos, en otras palabras los monocitos se infectaron teniendo su pico máximo de infección a las 72 horas y una disminución posterior, también se observó que los valores del sistema MOCK se encontraron elevados teniendo su pico máximo a las 48 horas después del estímulo, los sistemas SE y IL-4 GM CSF se encontraron por debajo del nivel de corte.

El valor de corte se obtuvo a partir del valor del control positivo, al cual se sumó tres veces la desviación estándar de los calibradores.

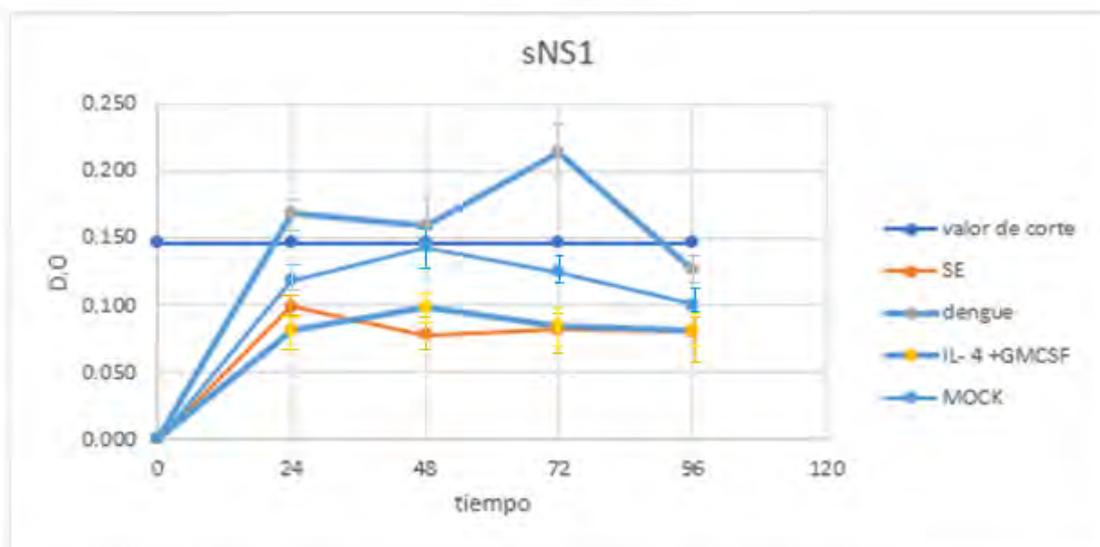
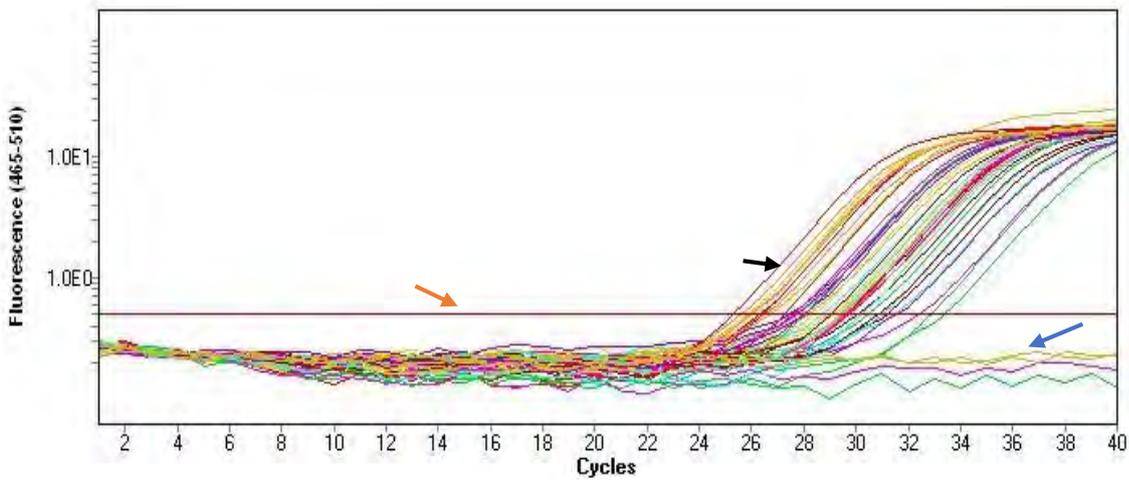


Figura 16. Niveles de detección de sNS1

(Donde SE son los monocitos sin estímulo, dengue son los monocitos infectados con virus del dengue, IL-4 + GMCSF son los monocitos estimulados con IL-4 + GMCSF y MOCK son los monocitos con el estímulo de MOCK.)

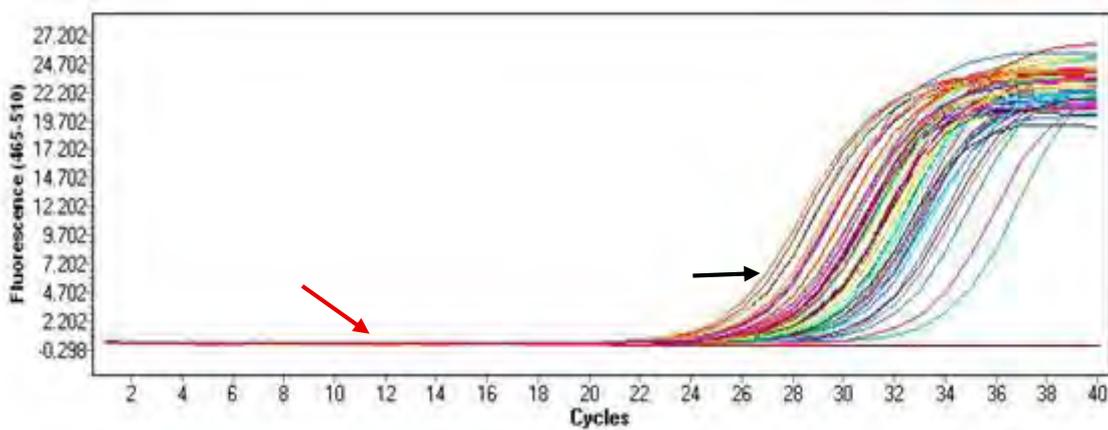
Para obtener los resultados de la variación en la expresión de mRNA de DC-SIGN, se recolectaron células en todos los tiempos de la cinética y todos los sistemas planteados, a estas células se les extrajo el RNA total el cual se convirtió en cDNA, se efectuaron diluciones para tener la misma cantidad de cDNA en todas las muestras, se realizó la técnica de qPCR con Sybr Green con el análisis de cuantificación relativa en donde los valores de Ct de los sistemas MOCK, DENV y IL-4 GMCSF se compararon con los valores de CT del sistema SE, en cada tiempo. Se obtuvieron las gráficas de amplificación para DC-SIGN y GAPDH de todos los sistemas y todos los tiempos, además, de que se obtuvieron los Ct de cada una de las muestras (figura 17).

### Curvas de amplificación de CD-209



- Curvas de amplificación de todos los sistemas y todos los tiempos con los *primes* para CD-209 o DC-SIGN
- Curvas de los blancos (controles negativos)
- Valor de corte (establecido por el equipo)

### Curvas de amplificación de GAPDH



- Curvas de amplificación de todos los sistemas y todos los tiempos con los *primes* para GAPDH
- Valor de corte (establecido por el equipo)

Nota: las curvas de los blancos (controles negativos) no se muestran en este gráfico ya que sus valores son menores al valor de corte.

Figura 17. Curvas de amplificación

A los resultados de la expresión de mRNA para DC-SIGN se les realizó un tratamiento estadístico de detección de error y una prueba de ANOVA unidireccional, en una herramienta del programa Minitab, se eliminaron 3 valores del control positivo en los tiempos 48, 72 y 96 horas pos infección uno en cada tiempo ya que el programa los catalogó como resultados atípicos puesto que duplicaban los valores de los otros dos resultados, eliminado los valores extremadamente altos del control positivo se generó la siguiente gráfica.

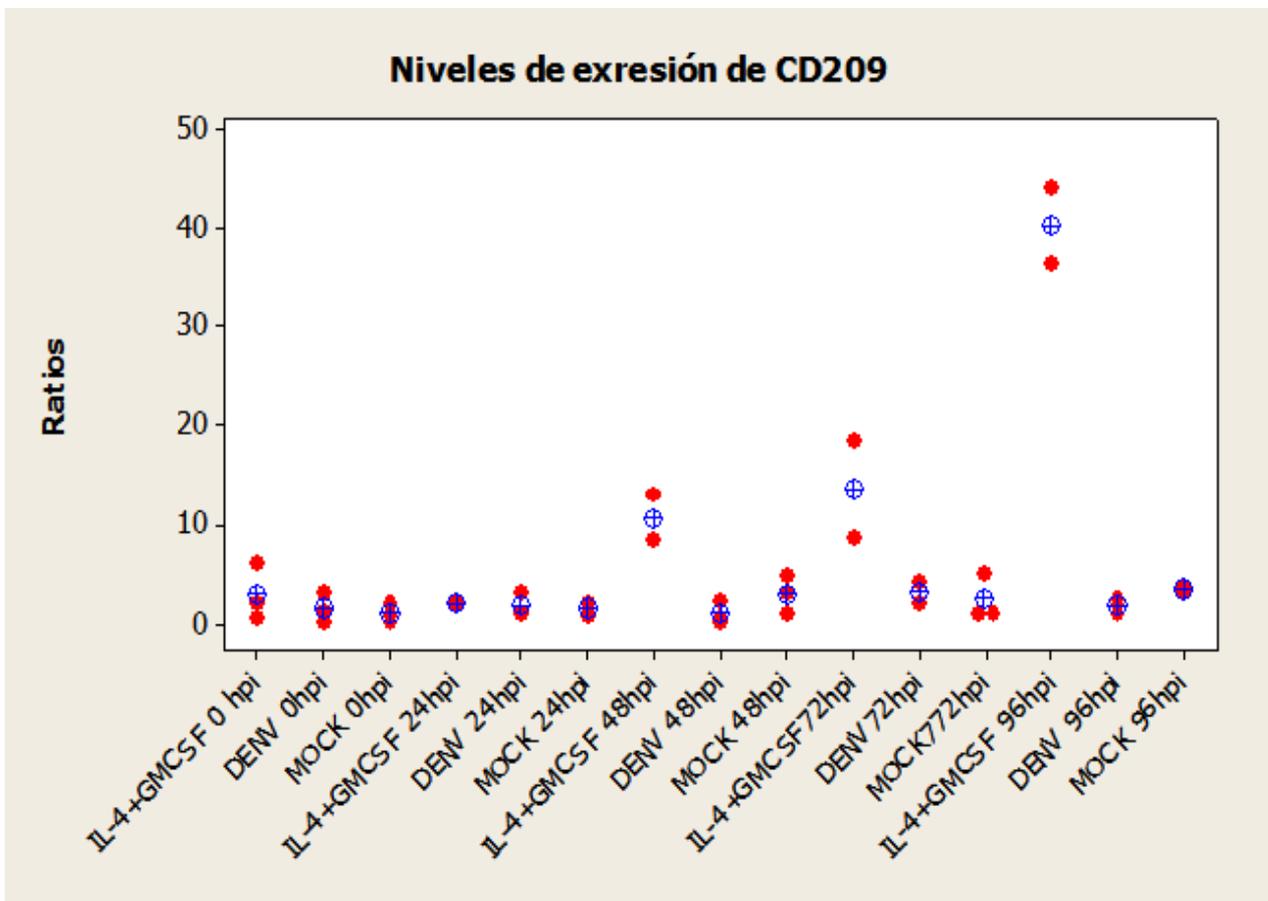


Figura 18. Validación de resultado. (Método estadístico de detección de error en el programa Minitab, los puntos rojos son los valores obtenidos de la cuantificación relativa, los puntos azules son los promedios de cada tiempo y sistema con una n de 3 por cada sistema)

Finalmente después del tratamiento estadístico para eliminar los errores atípicos, los datos eliminados fueron valores muy altos del control positivo es decir los monocitos con IL-4 y el GM CSF ya que estos valores duplicaban la señal con respecto a los otros 2 de mismo tiempo, se realizó otro tratamiento estadístico de ANOVA y una prueba de Tukey con el 95% de intervalo de confianza en el software (GraphPas Prism versión 5.2), con una  $P < 0.05$  para apreciar el comportamiento de los resultados y la significancia entre los sistemas evaluados, el cual se muestra en la siguiente gráfica (figura 19).

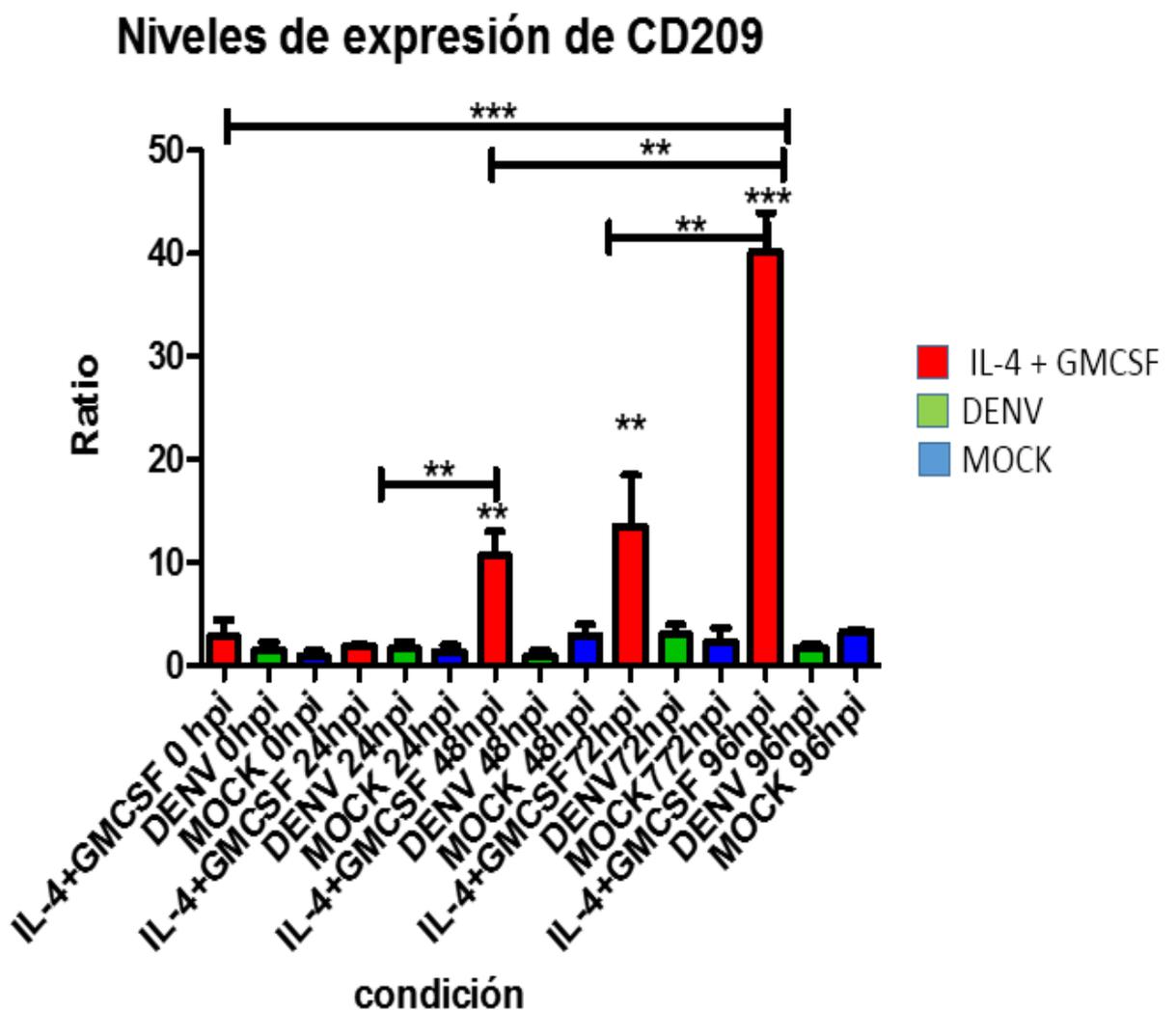


Figura 19. Niveles de expresión de DC-SIGN en monocitos infectados con DENV.

(Donde IL-4+GMCSF son los valores del sistema con IL-4+GMCSF, DENV son los valores del sistema infectado con virus del dengue, MOCK son los valores del sistema estimulados con MOCK y la terminación hpi son la horas pos-infección)

Lo que se puede apreciar en esta gráfica es que no hubo diferencia significativa en ningún tiempo de los sistemas de MOCK y DENV, pero en el sistema que contenía las citocinas IL-4 y el GM-CSF existió un notable incremento, este incremento es dependiente del tiempo, además, es estadísticamente significativo  $P=0.05$  entre los tiempos del mismo sistema y los demás sistemas.

De la figura anterior el dato más importante es que la infección con DENV de los monocitos purificados no induce una sobre-expresión o disminución del mRNA de CD 209. Cabe mencionar que para acreditar estos datos también se utilizó un gen constitutivo el cual fue GAPDH (todas las células con núcleo presentan esta proteína), para verificar que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se haya realizado correctamente.

## Discusión

En primer lugar se generó el suministro viral para la realización de este trabajo, en cultivos de células C6/36 y la cuantificación viral en células BHK-21.

En la identificación de mRNA de DC-SIGN por los “*primers*” específicos, se evaluaron en las extracciones de RNA total en tres diferentes tipos de células, las THP-1 (pre-monocíticas), monocitos y células THP-1 estimuladas con PMA (estadio de macrófagos). Esto se hizo con la intención de evaluar la presencia de mRNA de DC-SIGN con los “*primers*” en diferentes estadios celulares: pre-monocito, monocito y macrófago. En la literatura se menciona (Navarro-Sanchez y cols., 2003; Kwan y cols., 2008) que los macrófagos expresan pocas cantidades de DC-SIGN en superficie, así que las células en este estadio eran un control (+) de la reacción, en cambio los monocitos y células pre-monocíticas eran las muestras problema, en las cuales se logró identificar DC-SIGN a nivel de mRNA (se observó la banda ver la figura 13), el control (-) fue la reacción con los “*primers*” solos.

Cabe mencionar que esta identificación fue visual, es decir, se consiguió ver la banda en el gel de electroforesis después de la PCR punto final. Por estos resultados se decidió trabajar con la línea celular THP-1, además de que esta línea celular se emplea para el estudio de interacciones proteína-proteína y es útil para observar el comportamiento de esta proteína en el transcurso de la infección por virus del dengue.

En las cinéticas de infección de las células THP-1 se encontró que estas células fueron poco susceptibles a la infección por virus del dengue, además, de que estas células expresaron baja concentración CD14 en su superficie, estos resultados se pudieron comparar a los obtenidos por el grupo de Boonrat Tassaneetrithep y colaboradores en 2003, en donde utilizaron la línea celular THP-1 y células THP-1 transfectadas con el gen de DC-SIGN o CD 209, demostrando que las células THP-1 son poco permisibles a la infección de DENV, también, describieron el papel como receptor viral que tiene la proteína DC-SIGN, esto también lo corroboraron a través de la transformación de monocitos en células dendríticas, las cuales expresan una gran cantidad de DC-SIGN y su tasa de infección es muy grande en comparación de las células

dendríticas maduras derivadas de monocitos, las cuales expresan una menor cantidad de este receptor y su tasa de infección era menor.

Al saber que las células en el estadio premonocítico eran muy poco susceptibles a la infección por virus del dengue se decidió trabajar con monocitos.

Con respecto a los sistemas que se decidieron emplear para la parte de detección de mRNA de DC-SIGN en monocitos, se tuvieron varias razones para cada sistema.

1. En el sistema SE: lo que se busca es el mRNA de DC-SIGN y esta molécula se presenta en mayor cantidad en células en estadio de macrófagos y los monocitos en cultivo cambian a macrófagos a razón del tiempo que lleven en cultivo, por esta razón se requiere un sistema sin estímulo como blanco en cada tiempo.

2. En el sistema IL-4+GM-CSF: este sistema se utilizó como control positivo, fue propuesto de esa manera porque en numerosas metodologías antes mencionadas, utilizaron IL-4 y GM-CSF para la transformación de monocitos a células dendríticas y DC-SIGN es una molécula característica de las células dendríticas.

Con respecto al uso de las citocinas IL-4 y GM-CSF, como estímulo positivo para la expresión de DC-SIGN en monocitos, es necesario mencionar que en la bibliografía se encuentran reportados muchos experimentos de diferentes grupos de investigadores por ejemplo: Cheong y cols., 2010, Navarro y cols., 2003, Granelli y cols., 2005, Bullwinkel y cols., 2011, Kwan y cols., 2008, Lozach y cols., 2005, Relloso y cols., 2012. En todos estos grupos de trabajo se realizó el proceso de transformación de monocitos a células dendríticas por medio del estímulo de diferentes cantidades de IL-4 y de GM-CSF y se ha encontrado un aumento significativo de DC-SIGN, DC80 y otros marcadores de células dendríticas, estos marcadores se logran detectar después de 9 a 13 días dependiendo el protocolo de transformación empleado.

En un estudio realizado por el grupo de Bullwinkel y colaboradores, en 2011 encontraron un aumento gradual en el nivel de mRNA de DC-SIGN, en el transcurso de la transformación de monocitos a células dendríticas, este aumento se aprecia después de las 24 horas postestimulación con las citocinas IL-4 y GM-CSF.

3. El sistema DENV: fue propuesto ya que es nuestro sistema problema, la cantidad de 1 MOI de virus para infectar a los monocitos se propuso de este modo ya que en varios artículos (Relloso y cols., 2012, Navarro y cols., 2003) se utilizó este estímulo para obtener resultados entre las primeras 72 horas pos-infección.

4. El sistema MOCK: el MOCK es el mismo sobrenadante con DENV 2 empleado para la infección por DENV, pero con el virus inactivado a través de calor a 56°C durante 60 minutos, puesto que se infectó con DENV2 proveniente del sobrenadante de células C6/36 infectadas con virus del dengue 2, se requiere un sistema para eliminar la actividad de los PAMP's presentes en este sobrenadante y poder atribuir los resultados solamente al virus del dengue.

Con respecto al comportamiento de los monocitos del sistema DENV, en donde se generó un proceso de aglutinación celular la literatura menciona (Chen. Wang S., 2002), que los monocitos al ser infectados por el virus del dengue tienen la capacidad de secretar diferentes citocinas, las cuáles son de importancia clínica, las cuales pueden tener un efecto quimioatrayente en el cultivo que puede ser reflejado por la aglutinación celular observada, sin llegar a la formación de sincicios característica de la infección por DENV. (Mildre y cols., 1996) además de esta razón también se pudiera deber a un proceso de aglutinación mediada por virus.

La determinación de IL-8 se utilizó como un marcador de la activación de los monocitos, se decidió medir IL-8 ya que es una de las principales citocinas generadas por los monocitos tras la infección por virus del dengue, la función del IL-8 es atraer a neutrófilos y linfocitos inexpertos, así como movilizar, activar y provocar la desgranulación de neutrófilos.

En los resultados de la cuantificación de IL-8 se observaron niveles elevados de esta citocina, desde el tiempo 0 esto pudiera deberse al proceso de purificación de monocitos, en el cual se lleva a cabo una reacción antígeno anticuerpo, en la cual se activa la molécula CD14 presentes en los monocitos y esta desencadena una señalización intracelular que da origen a la activación de los monocitos. En los sistemas DENV se aprecia una tendencia de constante aumento hasta el tiempo 48 y después se estabiliza esto se debe a la infección del DENV. En cambio el sistema SE solo hay un aumento a las 24 horas y ese incremento se mantuvo constante a lo largo del experimento, esto pudiera deberse a la activación de los monocitos. En el sistema MOCK hay un aumento desde el principio y ese valor se mantiene constante, este comportamiento pudiera deberse a la activación de los monocitos por causa de la purificación celular y a la gran cantidad de moléculas extrañas PAMP's que se encuentran presentes en el MOCK.

Es necesario mencionar que en experimentos previos realizados por el grupo de Avirutnan y colaboradores, evaluaron los niveles de IL-8 en pacientes con fiebre del dengue y encontraron niveles elevados de IL-8 que van desde 977 a 20,000 pg/mL en circulación, esto nos indica que esta citocina es de suma

importancia en el transcurso de la enfermedad. Por otra parte, el grupo de Bosch y colaboradores, demostraron que los monocitos infectados por virus del dengue *in vitro* producen altos niveles de IL-8, lo que esto nos indica es que los datos encontrados en esta parte experimental son esperados. Algunos de estos autores proponen usar los niveles elevados de IL-8, como un marcador de la gravedad de la enfermedad del dengue.

La detección de sNS1 indicó que el sistema DENV realmente se encontraba infectado y alcanzando su máximo a las 72 horas pos infección, estos resultados concuerda con reportados en la bibliografía (Relloso y cols., 2012, Navarro y cols., 2003).

#### Cuantificación de mRNA de DC-SIGN

Después de obtener los resultados de la cuantificación relativa de mRNA de DC-SIGN, se realizó un procedimiento estadístico en el cual se eliminaron los errores atípicos, estos errores los detectaba el software (Minitab) analizando la varianza entre de los resultados del mismo tiempo eliminando así los puntos catalogados como resultados dispares o erróneos ya estos errores duplicaban le valor de los otros dos valores del mismo tiempo en el control positivo.

Teniendo los resultados validados, se realizó un estudio estadístico de ANOVA y una prueba de Tukey con el 95% de intervalo de confianza en el software (Graphpad Prism versión 5.2), para apreciar si los resultados fueron estadísticamente significativos  $P=0.05$ . En este análisis se encontró que en el sistema DENV no hubo diferencia significativa en ningún tiempo, lo cual indicó que el virus del dengue no promovió la expresión de DC-SIGN ni la regula, en el sistema MOCK tampoco existieron cambios significativos en ningún tiempo, ya que el MOCK es el sobrenadante desnaturalizado de células C6/36 con virus del dengue inactivo.

En contraste, en el sistema IL-4 y GM CSF (control positivo) se observó un constante aumento a partir del tiempo 24 hasta el fin del experimento, este resultado es justo lo que se esperaba ya que la combinación de estas dos citocinas promueve la transformación de monocitos a células dendríticas.

Es importante mencionar que el grupo de trabajo de Bullwinkel y colaboradores en 2011 describieron que existe una relación inversa entre la expresión de DC-SIGN y CD14; así, en la población de monocitos, la molécula que sirve como marcador es CD14 en tanto que DC-SIGN es un marcador de células dendríticas, esta relación tiene que ver con mecanismos de regulación epigenéticos entre la expresión de CD14 y la represión de DC-SIGN (Bullwinkel y cols., 2011), estos mecanismos de regulación son muy amplios, pero el mecanismo responsable de la regulación DC14 y DC-SIGN es la desacetilación de lisinas de las histonas y metilación en diferentes regiones CpG en el promotor de un gen, este mecanismo se le conoce como el “código de histonas” el cual reprime el gen de DC-SIGN cuando ésta activo el gen de CD14 (Bullwinkel y cols., 2011).

El grupo de Bullwinke describió que en el estadio de monocito se encuentra metilado un gran porcentaje del promotor de DC-SIGN, esto quiere decir que se encuentra silenciado este gen y con el estímulo de IL-4 y GM CSF, se desencadenan una serie de respuestas fisiológicas en el monocito entre ellas una desmetilación de regiones CpG en el promotor de DC-SIGN y la hiperacetilación de las histonas del promotor de DC-SIGN (activación del gen) y un aumento en la metilación de regiones CpG y desacetilación de las histonas en el promotor de CD14 (desactivación del gen) de modo tal que existe una represión entre CD14 y DC-SIGN y viceversa, además, en este artículo encontraron que es energéticamente mejor para los monocitos mantener silenciado el gen de DC-SIGN. (Bullwinkel y cols., 2011)

No hay reportes de monocitos DC-SIGN positivos pero existen reportes de macrófagos que expresan un equilibrio entre CD14 y DC-SIGN en su superficie (Reloso y cols., 2012, Navarro y cols., 2003).

Los grupos de trabajo de Navarro y cols., 2003 Bullwinkel y cols., 2011 y Reloso y cols., 2012 han demostrado que no existe la expresión de DC-SIGN

en monocitos pero han encontrado una baja expresión de DC-SIGN en macrófagos y una muy alta expresión en células dendríticas, por lo que era necesario ver si esta molécula podía ser regulada tras la infección con DENV.

Es importante mencionar que se han reportado varios receptores del virus del dengue en monocitos como son las molécula CD14/LPS (complejo LPS-LBP-CD 14-TLR4) (Chen y cols., 1999), HSP70/HSP90, TLR4 (Reyes y col., 2005) y los receptores de Fc (Takada y Kawaoka 2003, Kliks y cols., 1989) que transmiten señalización al interior de la célula que pudieran modular la expresión de otras moléculas, entre ellas DC-SIGN, sin embargo, no se ha reportado que el virus del dengue promueva hiperacetilaciones de histonas y metilaciones de regiones CpG en el promotor de DC-SIGN hasta el momento, por lo que este es un campo muy amplio aún por investigar.

El reconocimiento del virus del dengue por medio de CD14 aún no está muy bien caracterizado, y se ha descrito que diferentes concentraciones de LPS de *E.coli* son capaces de inhibir la infección por virus del dengue en monocitos y macrófagos (Chen y cols., 1999).

El reconocimiento del virus del dengue por medio de HSP70/HSP90 y TLR4 tampoco se ha descrito totalmente (Reyes y col., 2005), en tanto que se conoce que el reconocimiento a través de receptor Fc consta de dos pasos, el primero es la unión de un anticuerpo no neutralizante al DENV y después se lleva a cabo el reconocimiento de la fracción Fc del anticuerpo por el receptor situado en el monocito y de este modo se lleva a cabo la infección facilitada por anticuerpos ( Kliks y cols., 1989; Takada y Kawaoka 2003), los mecanismos de señalización implicados en esta vía de infección no han sido completamente elucidados y su participación en la regulación de moléculas como DC-SIGN es un punto interesante por evaluar.

Por último, cabe mencionar que no se ha reportado ningún artículo en el cual se encuentren monocitos CD14 (+) y DC-SIGN (+) en ninguna patología, además, de que no se han reportado ningún tipo de modulación de DC-SIGN en monocitos con ningún tipo de patógeno ni tipo de cáncer.

## **Conclusiones**

La infección por el virus del dengue 2 en cultivo primario de monocitos NO tiene la capacidad de regular la expresión del DC-SIGN.

- 1) Se realizaron cinéticas de infección con células THP-1 confirmando resultados previamente reportados sobre su baja susceptibilidad a la infección por el virus del dengue.
- 2) Se evaluaron los niveles de expresión de mRNA de la proteína DC-SIGN en cultivo primario de monocito infectados por DENV 2 en donde no se encontraron diferencias significativas comparando con los sistema sin estímulo.

## **Perspectivas**

- Realizar los experimentos in vivo para caracterizar en general el comportamiento de los monocitos en la infección por virus del dengue, ya que no se conoce por completo el papel que estos juegan en los trastornos hemorrágicos de la enfermedad del dengue.

## Referencias

1. **Acosta C, Gómez I.** Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed* 2005; 16:113-137.
2. **Alan L. Rothman** Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic and tropical cytokine storms AUGUST 2011 VOLUME 11 [www.nature.com/reviews/immunol](http://www.nature.com/reviews/immunol).
3. **Avirutnan, P., P. Malasit, B. Seliger, S. Bhakdi, and M. Husmann.** Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J. Immunol.* 1998. 161:6338–6346
4. **Backovic M, Rey FA.** Virus entry: old viruses, new receptors. *Curr Opin Virol.* 2012 Feb;2(1):4-13. doi: 10.1016/j.coviro.2011.12.005. Epub 2012 Jan 2.
5. **Bartenschlager R., Miller, S.** Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiology.* 2008 3(2):155–165.
6. **Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke RV, Fournier MV, Ennis FA, Rothman AL.** Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J Virol.* 2002 Jun;76(11):5588-97.
7. **Bullwinkel J, Lüdemann A, Debarry A and Prim B. Singh** Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells *Epigenetics* 6:1, 45-51; January 2011
8. **Brooks AJ, Johansson M, John AV, Xu Y, Jans DA, Vasudevan SG.** The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional import in beta 1 and import in alpha/beta-recognized nuclear localization signals. *J Biol Chem.* 2002 Sep 27;277(39):36399-407.
9. **Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N,** Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine.* 2005 Jun 21;30(6):359-65.
10. **Carlos Yábar V.** Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus dengue: propuesta de un modelo de replicación del ERN. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2003; 20
11. **Chambers T, Hahn C, Galler R, Rice C.** Flavivirus genome organization, expression, & replication. *Ann Rev Microbiol* 1990; 44: 649- 88.
12. **Chen Y, Wang S.** Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection,

- hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol.* 2002 Oct;76(19):9877-87.
13. **Chen Y-C, Wang S-Y, King C-C.** Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol* 1999; 73: 2650
  14. **Cheong C, Matos I., Jae-Hoon Choi, Bhavani D. Dandamudi R. Shrestha E., M. Longhi P., Jeffrey L., Anthony R., Kluger C., Nchinda G, Koh K, Rodriguez A, Idoyaga J. , Pack M, Velinzon K, Park G., Steinman R.** Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/ CD209+ dendritic cells for immune T cell areas *Cell.* 2010 October 29; 143(3): 416–429. doi:10.1016/j.cell.2010.09.039.
  15. **Clyde, K., Kyle, J., Harris, E.** Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology.* 2006 80(23):11418–11431.
  16. **Condit RC, Knippe DM, Howley PM.** Principles of Virology. In *Fields Virology.* Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
  17. **Courageot M, Catteau A, Despres P.** Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Adv Virus Res.* 2003;60:157-86.
  18. **Del Ángel, R.** Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenicidad viral. *Cinvestav Julio–Septiembre (2006).* 38–43.
  19. **Diamond MS, Shrestha B, Mehlhop E, Sitati E, Engle M.** Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol.* 2003;16(3):259-78.
  20. **Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ.** Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol.* 1991;65(5):2467-75.
  21. **Guesdon JI, Ternynck T, Avrameas S.** The use of avidin-biotin interaction of immunoenzymatic techniques. 1979 *J Histochem Cytochem,* 27:1131-1139
  22. **Guzmán, M., Halstead, S., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H., Martínez, E., Nathan, M., Pelegriño, J., Simmons, C., Yoksan, S., Peeling, R.** Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology.* 2010 S7–S16.
  23. **Holmes EC, Twiddy SS.** The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 2003 May;3(1):19-28.
  24. **Kliks S.C., A. Nisalak, W. E. Brandt, L. Wahl, and D. S. Burke,** Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever, 1989. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* vol. 40, no. 4, pp. 444–451,

25. **Kou Zhihua, Quinn M, Chen H, Shanaka IR, Rose RC, Schlesinger JJ**, Monocytes, But Not T or B Cells, Are the Principal Target Cells for Dengue Virus (DV) Infection Among Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992.30: 545-551
26. **Kou Z, Quinn M, Chen H**. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells, *Journal of Medical Virology*, vol. 80, no. 1, pp. 134–146, 2008
27. **Kwan W-H, Vachon H, Dos Santos, Herve FB, W. Fridman, Rey F, Harris E, Mueller CG, et al**. Dermal-Type Macrophages Expressing CD209/DC-SIGN Show Inherent Resistance to Dengue Virus Growth. *PLoS* (2008) 311:10.1371
28. **Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC**. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 2001 Sep;8(5):377-88.
29. **Leong AS, Wong KT, Leong TY, Tan PH, Wannakrairot P**. The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin Diagn Pathol*. 2007 Nov;24(4):227-36.
30. **Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S**, High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2002 Oct 15;186(8):1165-8.
31. **Lin YL, Liu CC, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, Chen RM**, Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. *J Med Virol*. 2000 Apr;60(4):425-31.
32. **Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL**, DCSIGN-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem*. 2005 Apr 26 <http://sanidadanimal.info/cursos/inmunologia3/ca021.htm>
33. **Madej T, Address KJ, JH Fong, LY Geer, RC Geer, CJ Lanczycki, C Liu, Lu S, A Marchler-Bauer, AR Panchenko, J Chen, PA Thiessen, Y Wang, Zhang D, Bryant SH**. "MMDB: estructuras 3D y las interacciones macromoleculares." *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan; 40 (número de base de datos) : D461-4
34. **Marijke M. F. Dominique Schols** Dengue Virus Entry as Target for Antiviral Therapy *Journal of Tropical Medicine* Volume 2012, Article ID 628475, 13 pages doi:10.1155/2012/628475
35. **Mildre E. Hernández F. y Hun L**. Alteraciones ultraestructurales inducidas por virus dengue en cultivos celulares *Rev. Cost. de Ciencias Médicas*. Vol. 17 / No 1, Marzo de 1996.
36. **McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H**. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect*. 2000 Jul;2(9):1041-50.
37. **Mukhopadhyay, S., Kuhn, R., Rossmann, M**. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 3:13–22.

38. **Murray JM, Aaskov JG, Wright PJ.** Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and CprM. *J Gen Virol.* 1993;74(Pt 2):175-82.
39. **Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L.** Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res.* 2005 Sep-Oct;36(5):425-35.
40. **Navarro-Sanchez, R. Altmeyer, A. Amara** "Dendritic- cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses," *EMBO Reports*, vol. 4, no. 7, pp. 723–728, 2003.
41. **Nelson DA.** The biology of myelopoiesis. *Clin Lab Med.* 1990 Dec;10(4):649-59.
42. **Nielsen DG.** The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Viol J.* 2009 Nov 27;6:211. doi: 10.1186/1743-422X-6-211.
43. **Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG.** Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2000 Jan-Mar;16(1):205-11.
44. **Oliveira, S., Lopes da Fonseca, B** Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. 2004 *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 8(6):390–398.
45. **Organización Mundial de la Salud.** **Dengue:** Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Geneva, Switzerland (2009).
46. **Pierre-Yves L, Burleigh L, Staropoli I. Navarro E. Harriague J Virelizier J, Rey A, Despre P. Arenzana F. and Amara. A** Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN)-mediated Enhancement of Dengue Virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals\* Published, *JBC Papers in Press*, April 26, 2005, DOI 10.1074/jbc.M504337200
47. **Pokidysheva E, Glenn G, Ying Z, Battisti J, Wayne A, Bator-Kelly C.M, Richard J. Kuhn, Chipman P, Rossmann M, Chuan Xiao.** Cryo-EM Reconstruction of Dengue Virus in Complex with the Carbohydrate Recognition Domain of DC-SIGN. *Cell* 2005.11.042
48. **Perera, R., Kuhn, R.** Structural Proteomics of Dengue Virus. *Current Opinion in Microbiology.* 2008 11(4):369–377.
49. **Peeling, R., Artsob, H., Pelegrino, J., Buchy, P., Cardoso M., , Devi, S., Enria, D., Farrar, J., Gubler, D., Guzman, M., Scott B. Halstead, S., Hunsperger, E., Kliks, S., Harold S. Margolis, H., Nathanson, C., Nguyen, V., Rizzo, N., Vázquez, S., Yoksan, S.** (2010). Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology.* S30–S37.
50. **Putnak R, Feighny R, Burrous J, Cochran M, Hackett C, Smith G.** Dengue-1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus-neutralizing antibody in mice and protects them from virus challenge. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 159-67.
51. **Puttikhunt C, Prommool T, U-thainual N, Ong-ajchaowlerd P, Yoosook K, Tawilert C, Duangchinda T, Jairangsri A,**

- Tangthawornchaikul A, Malasit P, Kasinrerak W.** The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus *Journal of Clinical Virology* 50 (2011) 314–319
52. **Rice CM.** Overview of flavivirus molecular biology and future vaccine development via recombinant DNA. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1990;21(4):670-7.
53. **Relloso M, Sánchez P, Corbí Longo AL, Navarro J, Muñoz-Fernández MA, Rodríguez-Fernández L, De la Rosa G,** DC-SIGN (CD209) Expression Is IL-4 Dependent and Is Negatively Regulated by IFN, TGF-  $\beta$  and Anti-Inflammatory Agents, *The Journal of Immunology* 2002;168;2634-2643
54. **Reyes-Del Valle J, S. Chavez-Salinas, F. Medina, and R. M. Del Angel,** Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells, 2005 *Journal of Virology*, vol. 79, no. 8, pp. 4557–4567,.
55. **Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK.** Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol.* 2005 Feb;33(2):131-43.
56. **Rodenhuis–Zybert, I., Wilschut, J., Smith, J.** Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences.* (2010). 67:2773–2786.
57. **Sheel M, Engwerda CR.** The diverse roles of monocytes in inflammation caused by protozoan parasitic diseases. *Trends Parasitol.* 2012 Oct; 28(10):408-16. doi: 10.1016/j.pt.2012.07.008. Epub 2012 Aug 30.
58. **Sierra Vázquez B.** RASA: Factor de riesgo para el desarrollo de la fiebre hemorrágica por dengue. Implicación de la respuesta inmune celular. Tesis (doctor en ciencias). Habana Cuba. Instituto de medicina tropical “Pedro Kouri” departamento de virología. 2010.
59. **Silva C, Lambeth, L. White, R. Johnston and A.** Dengue Virus Flow Cytometry-Based Assay for Titrating de 10.1128/JCM.43.7.3267-3272.2005. 43(7):3267. DOI:J. Clin. Microbiol 2005.
60. **Sonja I. Gringhuis. Jeroen den Dunnen. Teunis B.H. Geijtenbee Manja Litjens, Bert van het Hof,** C-Type lectin DC\_SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF- $\kappa$ B. *Cell press* 2007.03.012
61. **Souza LJ, Reis A.** Alteration in the Erythrocyte Sedimentation Rate in Dengue Patients: Analysis of 1,398 Cases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2008;12:472-475.
62. **Souza LJ, Ribeiro-Nogueira RM.** Aminotransferase Changes and Acute Hepatitis in Patients with Dengue Fever: Analysis of 1,585 Cases. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2004;8:156-163
63. **Shu, P., Huang, J.** Current Advances in Dengue Diagnosis 2004. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 11(4):642–650.

64. **Tassaneetrithe B, Trumfheller C, Pattanapanyasat K, Burgess H, Finke J, Granelli-Piperno A, Wellington S**, DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003 823–829
65. **Talarico L**. La entrada del virus a la célula un potencial blanco antiviral estudio de polisacáridos silfatados como antivirales *Revista Quimica viva* 2-7-agosto 2008
66. **Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización de los virus del dengue** Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” Ministerio de Salud Pública Ciudad Habana, Cuba 2009
67. **Tsai TF, DW Vaughn**. Flavivirus. *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*. Mandell, Bennet y Dolin. 6° Edicion. Cap 149:1926-1950. 2006.
68. **Tsai TT, Chuang YJ, Lin YS, Wan SW, Chen CL, Lin CF** An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 2013 Jun 25;20(1):40.
69. **Takada A. and Y. Kawaoka**, Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications, 2003 *Reviews in Medical Virology*, vol.13, no.6, pp.387–398,.
70. **Velandia M. Castellanos E**. Virus del dengue: estructura y ciclo viral *Dengue virus: structure and viral cycle Infectio*. 2011; 15(1): 33-43
71. **Wahala WM, Silva AM**. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*. 2011 Dec;3(12):2374-95. doi: 10.3390/v3122374. Epub 2011 Nov 25.
72. **Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ**, Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*. 2000;74(7):3227-34.
73. **Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplertlop N, Surasombatpattana P, Doucoure S, Mouchet F, Séveno M, Remoue F, Demettre E, Brizard JP, Jouin P, Biron DG, Thomas F, Missé D**. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics*. 2010 May;10(10):1906-16. doi: 10.1002/pmic.200900626.
74. **World Health Organization**. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition 2009. WHO [online], [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf) (2009).
75. **Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R** Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med*. 2000 Jul;6(7):816-20.
76. **Yang KD, Wang CL, Shaio MF**. Production of cytokines and platelet activating factor in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis*. 1995 Aug;172(2):604-5.

77. **Yorgo Modis\***, **Steven Ogata**, **David Clements** and **Stephen C. Harrison A** ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein *Immunology* 1 April 14, 2003
78. **You S**, **Falgout B**, **Markoff L**, **Padmanabhan R**. In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *J Biol Chem* 2001; 276(19): 15581-91.
79. **Zelensky AN**, **Gready JE**. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 2005 Dec;272(24):6179-217
80. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS\\_2013/Pano\\_dengue\\_sem12\\_sem2013.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2013/Pano_dengue_sem12_sem2013.pdf) consultada 04/08/2013
81. <http://gsdl.bvs.sld.cu/greenstone/collect/clinic/index/assoc/HASH7269.dir/fig01a02.png> consultada 04/08/2013
82. <https://www.atcc.org/en/Global/Products/1/6/6/6/TIB-202.aspx>
83. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/88081201?lang=es&region=MX>.
84. [http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJO S/trabajos/VIII/carteles/CVIII-35.pdf](http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJO%20S/trabajos/VIII/carteles/CVIII-35.pdf).