



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“EXPRESIÓN DE TLR-3, -7 Y -8 EN CÉLULAS  
FAGOCÍTICAS MONONUCLEARES HUMANAS  
INFECTADAS CON VIRUS DEL DENGUE”:**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:**

**RUBÉN ROBERTO GONZÁLEZ FERNÁNDEZ**

**ASESOR: DR. SALVADOR FONSECA CORONADO**

**COASESORA: M. EN C. KARINA RUIZ TOVAR**

**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 CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe 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 comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Expresión de TLR-3,-7 y -8 en células fagocíticas mononucleares humanas infectadas con virus del dengue

Que presenta el pasante: Rubén Roberto González Fernández  
Con número de cuenta: 409081835 para obtener el Título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Mayo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
VOCAL	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	

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

IHM/mmgm

## DEDICATORIAS

A **MIS PADRES** porque si su apoyo, educación, consejos y amor no sería lo que soy ahora, por apoyarme en todo momento y por estar ahí siempre que los necesito, soy su obra y no lo niego.

A **MI HERMANO**, por ser mi mejor amigo y compañero durante toda la vida, por estar ahí siempre, y porque siempre hemos enfrentado juntos buenos y malos momentos.

A **DIANA**, por todo el apoyo incondicional, por tu amor, por tus consejos y por aguantarme en los malos momentos. Te amo pururun.

A **TODOS MIS FAMILIARES**, que siempre estuvieron al pendiente para ver que necesitaba o solo para darme una palmada en la espalda de ánimo.

A **MIS AMIGOS, Alejandro, Efrén, Axel, Chucho, Karina, Mara, Israel, Robert, Vero** y todos con lo que compartí momentos durante la carrera.

A ti **ADAL** que te nos adelantaste en el camino, y a quien siempre recordare, no olvido lo último que me dijiste: “tú eres el siguiente en titularse”.

De igual forma **A TODOS MIS PROFESORES** de la FESC, que con sus enseñanzas me ayudaron a crecer como persona y como profesional.

Y Principalmente a **DIOS**, por permitirme vivir esta vida y a quien le agradezco cada una de sus bendiciones y cada una de sus decisiones, gracias por permitirme cumplir con una meta más y por todo lo que **EL** me ha dado.

## **AGREDECIMIENTOS**

Al **Dr. Salvador Fonseca Coronado** por aceptarme en el laboratorio, por todas sus enseñanzas, consejos, paciencia y recomendaciones para concluir de la mejor manera mi trabajo de tesis, sobre todo por permitirme aprender mucho de él.

A la **M. en C. Karina Ruíz Tovar** por todo el apoyo recibido, por sus consejos, amistad y apoyo cada que lo necesite, por compartirme sus conocimientos y experiencias. Sin su apoyo el laboratorio no sería lo mismo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Inmunobiología de enfermedades infecciosas: a **Jerusalén, Angie, Ali, Christopher y Jaqueline** que siempre me brindaron apoyo cuando lo necesite y con los cuales compartí muchas experiencias durante mi estancia en el laboratorio.

Al **Dr. Alejandro Escobar** y a todo el personal del Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas del InDRE, por sus consejos, enseñanzas y paciencia durante el tiempo que estuve.

A la **Dra. Laura Adalid Peralta**, que de manera incondicional me abrió las puertas de su laboratorio para participar en temas de actualidad y capacitarme en técnicas de vanguardia dentro del área de la Inmunología.

Al **Lic. Luis Tapia Castillo**, por compartir sus experiencias y consejos conmigo, y ayudarme a crecer profesionalmente, gracias por el apoyo recibido.

## **APOYOS RECIBIDOS**

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunobiología de Enfermedades Infecciosas de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, bajo la supervisión del Dr. Salvador Fonseca Coronado en conjunto con el Laboratorio de Inmunología Especial del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, de la Secretaría de Salud, bajo la supervisión de la M. en C. Karina Ruiz Tovar.

Fui beneficiado con apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) debido a mi participación como estudiante asociado del proyecto Salud-2011-C01-161716 “Desarrollo de un modelo predictivo de cuadros hemorrágicos debidos al virus del dengue basado en el análisis de polimorfismos de nucleótidos únicos presentes en el promotor de DC-SIGN y TNF-alfa y en la secuenciación completa del gen E viral”, durante el periodo de Septiembre del 2012 a Agosto del 2013.

Así mismo, fui beneficiario del programa de Becas de Titulación 2013 por parte de la Secretaría de Educación Pública.

## CONTENIDO

<b>i).- INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>ii).- INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>8</b>
<b>iii).- ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>iv).- RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>2.- OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>3.- JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>4.- GENERALIDADES</b> .....	<b>15</b>
<b>5.- CLASIFICACIÓN DEL DENGUE</b> .....	<b>16</b>
5.1.- CURSO DE LA ENFERMEDAD.....	18
5.1.1.- Fase febril:.....	19
5.1.2.- Fase crítica: .....	19
5.1.3.- Fase de recuperación: .....	19
<b>6.- EPIDEMIOLOGIA DEL DENGUE</b> .....	<b>20</b>
<b>7.- VIRUS DEL DENGUE</b> .....	<b>23</b>
7.1.- PROTEINAS VIRALES .....	24
7.1.1.- Proteínas estructurales: .....	24
7.1.2.- Proteínas no estructurales: .....	26
<b>8.- CICLO DE REPLICACIÓN</b> .....	<b>29</b>
<b>9.- PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD</b> .....	<b>33</b>
9.1.- Virulencia de los DENV:.....	33
9.2.- Potenciación de la infección mediada por anticuerpos (ADE): .....	33
9.3.- Anticuerpos contra proteínas no estructurales:.....	34
9.4.- Inmunidad celular y producción de citocinas:.....	34
<b>10.- SISTEMA INMUNE INNATO</b> .....	<b>36</b>
10.1.- PAMPs y PRRs.....	36
• 10.1.1.- PRRs solubles: .....	37
• 10.1.2.- PRRs de membrana celular .....	37
• 10.1.3.- PRRs de señalización.....	38

<b>11.- RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs)</b> .....	<b>40</b>
11.1.- VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS TLRs .....	44
<b>12.- RESPUESTA INMUNE CONTRA EL DENV</b> .....	<b>46</b>
12.1.- CASCADAS DE SEÑALIZACION ACTIVADAS POR TLRs DURANTE LA INFECCION POR DENV .....	47
12.1.1.- VÍA DEL NF- $\kappa$ B .....	47
12.1.2.- VÍA DE LAS MAPK .....	49
12.1.3.- VÍA DE IRFs .....	51
<b>13.- OTROS RECEPTORES QUE PUEDEN RECONOCER A LOS DENV</b> .....	<b>57</b>
13.1.- NLRs (Receptores tipo NOD) .....	57
13.2.- RLRs (Receptores tipo RIG-I) .....	60
<b>14.- CONCLUSIONES</b> .....	<b>63</b>
<b>15.- REFERENCIAS</b> .....	<b>64</b>

<b>i).- INDICE DE FIGURAS</b>	<b>Págs.</b>
<b>Figura 1.-</b> Mosquitos del genero Aedes, vectores del virus del dengue. _____	15
<b>Figura 2.-</b> Criterios para la clasificación clínica del dengue. _____	17
<b>Figura 3.-</b> Curso de la enfermedad del dengue. _____	18
<b>Figura 4.-</b> Incidencia y serotipos virales aislados en casos confirmados de dengue por estado en México durante el año 2013. _____	21
<b>Figura 5.-</b> Estructura y genoma del virus del dengue. _____	23
<b>Figura 6.-</b> Distribución y procesamiento de la poliproteína viral en el RE durante la replicación del DENV. _____	30
<b>Figura 7.-</b> Ciclo de replicación del virus. _____	32
<b>Figura 8.-</b> Principales PRRs de señalización (TLRs, NLRs y RLRs). _____	38
<b>Figura 9.-</b> TLRs intra y extracelulares. _____	42
<b>Figura 10.-</b> Estructura general de los TLRs. _____	42
<b>Figura 11.-</b> Vía de señalización de los TLRs. _____	45
<b>Figura 12.-</b> Funciones principales de los TLRs. _____	46
<b>Figura 13.-</b> Vía del NF- $\kappa$ B. _____	48
<b>Figura 14.-</b> Vía de las MAPK. _____	50
<b>Figura 15.-</b> Vía de IRFs. _____	52
<b>Figura 16.-</b> Efecto citopático causado por la infección por DENV-2 en células C6/36. _____	55
<b>Figura 17.-</b> Proteínas NOD, proteínas NALP, proteínas IPAF y proteínas NAIP, pertenecientes a la familia de los NLRs. _____	59
<b>Figura 18.-</b> Estructura de MDA-5 y RIG-1 con sus respectivos ligandos. _____	61
<b>Figura 19.-</b> Cascadas de señalización de IRFs y NF- $\kappa$ B. _____	62

<b>ii).- INDICE DE TABLAS</b>	<b>Págs.</b>
<b>Tabla 1.-</b> Casos confirmados y defunciones en México durante 2012 y 2013 _____	22
<b>Tabla 2.-</b> Factores del hospedero que pueden influir en la evolución a formas graves de la enfermedad. _____	35
<b>Tabla 3.-</b> TLRs y sus ligandos. _____	43

### iii).- ABREVIATURAS

CARD	Dominio de reclutamiento y activador de caspasas (del inglés <i>Caspase Activation and Reclutment Domain</i> ).
CR	Complejo de replicación.
CARDIF	Adaptador de CARD inductor de Interferón beta (del inglés <i>CARD adaptor inducing IFN-<math>\beta</math></i> ).
DC-SIGN	Molécula no integrina de unión al ICAM-3 específica de células dendríticas (del inglés <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i> ).
DD	Dominios de muerte (del inglés <i>Death Domains</i> ).
DENV	Virus del dengue.
dsRNA	RNA de doble cadena.
FD	Fiebre por dengue.
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue.
FR	Forma replicativa.
HSP	Proteína de choque térmico (del inglés <i>Heat-Shock Protein</i> ).
IKK	I $\kappa$ B cinasa (el inglés <i>I<math>\kappa</math>B Kinase</i> ).
IL	Interleucina.
IFN	Interferón.
IR	Intermediario o forma de replicación.
IRAK1	cinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (del inglés <i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1</i> ).
IRAK2	cinasa 2 asociada al receptor de IL-1 (del inglés <i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 2</i> ).
IRAK4	cinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (del inglés <i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4</i> ).
IRFs	Factores Reguladores del Interferón (del inglés <i>Interferon Regularory Factor</i> ).
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> ).
IPS-1	Estimulador 1 promotor de Interferón beta (del inglés <i>Interferon-<math>\beta</math> Promoter Stimulator 1</i> ).
MAPK	Proteín cinasas activadas por mitógenos (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> ) .

MAVS	Proteína mitocondrial de señalización antiviral (del inglés <i>Mitochondrial Antiviral Signaling Protein</i> ).
MDA-5	Gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma (del inglés <i>Melanoma-Differentiation-Associated gene 5</i> ).
MyD88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloides 88 (del inglés <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i> ).
NEMO	Modulador esencial de NF- $\kappa$ B (del inglés <i>NF-<math>\kappa</math>B Essential Modulator</i> ).
NF- $\kappa$ B	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> ).
NLRs	Receptores tipo NOD (del inglés <i>NOD Like Receptors</i> ).
NOD	Dominio de oligomerización de unión a Nucleótido (del inglés <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i> ).
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> ).
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés <i>Pattern Recognition Receptors</i> ).
RIG-1	Gen 1 inducible de ácido retinoico (del inglés <i>Retinoic-Acid-Inducible Protein 1</i> ).
RLRs	Receptores tipo RIG-I (del inglés <i>RIG-I Like Receptors</i> ).
RNA	Ácido Ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic Acid</i> ).
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i> ).
SCD	Síndrome de choque por dengue.
ssRNA	RNA de cadena sencilla.
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés <i>Transforming Growth Factor Beta</i> ).
TAK1	Cinasa 1 activada por TGF- $\beta$ (del inglés <i>TGF-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i> ).
TAB1	Proteína 1 de unión a TAK (del inglés <i>TAK Binding Protein 1</i> ).
TAB2	Proteína 2 de unión a TAK (del inglés <i>TAK Binding Protein 2</i> ).
TAB3	Proteína 3 de unión a TAK (del inglés <i>TAK Binding Protein 3</i> ).
TLRs	Receptores tipo Toll (del inglés <i>Toll Like Receptor</i> ).
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés <i>Tumor Necrosis Factor</i> ).
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor de TNF (del inglés <i>TNF Receptor Associated Factor 6</i> ).
VISA	Adaptador de señalización inducido por virus (del inglés <i>Virus-Induced Signaling Adaptor</i> ).

#### **iv).- RESUMEN**

El dengue es un padecimiento viral, sistémico, agudo, y autolimitado que constituye un importante problema de salud pública en el mundo. Esta enfermedad es producida por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1 a -4), que es transmitido al humano a través de la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes*. Independientemente del serotipo viral infectante, el dengue puede presentar diversas manifestaciones, que pueden ir de un curso asintomático, hasta las formas graves de la enfermedad que pueden causar la muerte del paciente.

Debido a la posible evolución a formas más graves de la enfermedad, el papel que juega el sistema inmune innato resulta muy importante en el control de la infección; la respuesta inmune contra el DENV, se inicia con el reconocimiento del RNA viral por diversos Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), específicamente los TLR-3, TLR-7 y TLR-8 que se encuentran en los endosomas de diversas células blanco de la infección viral. El reconocimiento por parte de los TLR activa diferentes vías de señalización, como la vía de MAP cinasas, la vía de factores reguladores de interferones (IRFs) y la vía de NF- $\kappa$ B, las cuales promueven la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e interferones tipo 1, los cuales han sido asociados con la evolución a formas graves de la enfermedad en infecciones secundarias. El TLR-3 es el receptor más importante de estos, ya que media una fuerte respuesta de interferones tipo I, lo que conlleva a una rápida respuesta antiviral, a esta sobreproducción se le conoce como “tormenta de citocinas”, la cual es asociada con el daño al endotelio y la complicación a formas graves, por su parte, los TLR-7 y TLR-8 se activan de manera tardía, y su activación no induce un aumento tan exacerbado en la producción de citocinas. Otros receptores que también participan son los NLRs y RLRs los cuales están involucrados en la generación de estructuras llamadas inflamasomas y en el reconocimiento del RNA viral en el citoplasma de las células infectadas, respectivamente.

En esta revisión se evalúa el papel de TLR-3, TLR-7 y TLR-8 durante la infección por DENV, así como su relación con la activación de otros receptores como pueden ser los RLRs o los NLRs.

## 1.- INTRODUCCIÓN

El dengue constituye un importante problema de salud pública en todo el mundo, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, produce de 50 a 100 millones de casos anuales en más de 100 países. Esta enfermedad es producida por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1 a -4), que es transmitido al humano a través de la picadura de mosquitos vectores, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Actualmente no existe una vacuna o tratamiento antiviral eficaz para el dengue, por lo que el control de la enfermedad se basa en el control del vector.

Independientemente del serotipo viral infectante, el dengue puede presentar diversas manifestaciones, que van desde solo evidencia serológica hasta complicaciones graves como el choque hipovolémico y/o edema pulmonar, que si no es correctamente evaluado puede llevar a la muerte del paciente. Debido a esta posible evolución, el papel que juega el sistema inmune innato resulta muy importante en el control de la infección, iniciada por el reconocimiento del RNA viral por diversos receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo Toll (TLR) -3, -7 y -8 que se encuentran en el citoplasma y en los endosomas de diversas células blanco de la infección viral, iniciando diferentes vías de señalización, las cuales promueven la producción de citocinas pro-inflamatorias e interferones tipo 1.

La evolución de la enfermedad está estrechamente relacionada con esta sobreproducción de citocinas, por lo que entender que los mecanismos de activación de la respuesta innata contra el virus es de suma importancia para la clínica y la comunidad científica. Ya que entendiendo estos mecanismos, será posible mejorar el tratamiento y avanzar en la posible producción de una vacuna capaz de conferir protección en contra de los cuatro serotipos virales.

## **2.- OBJETIVO GENERAL**

Realizar una revisión actualizada sobre el papel que juega la inmunidad innata en la infección por los virus del dengue, específicamente la mediada por la expresión de los receptores TLR -3, -7 y -8, en células del sistema inmune blanco de la infección como son los monocitos y las células dendríticas.

## **3.- JUSTIFICACIÓN**

Debido a que en infecciones secundarias la enfermedad puede evolucionar a formas más graves que pueden incluso llevar a la muerte del paciente, el papel que juega el sistema inmune innato (principalmente el reconocimiento por PRRs), resulta muy importante en el control de la infección. Por lo que la comprensión de los mecanismos de activación y la consecuente cascada de señalización de estos receptores resulta de suma importancia para entender el papel del sistema inmune en la infección por los virus del dengue.

#### 4.- GENERALIDADES

El dengue constituye un importante problema de salud pública en todo el mundo, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, con un estimado de 50 a 100 millones de casos anuales en más de 100 países (Caballero y cols, 2006). Esta enfermedad es producida por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1 a -4), que es transmitido al humano a través de la picadura de mosquitos vectores, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Figura 1) (Salvatella, 1996; Rodríguez y cols., 2010).

El mosquito vector se infecta tras picar a una persona que está cursando el periodo virémico de la enfermedad (habitualmente los primeros 5 días desde el inicio de la fiebre). Tras un periodo de incubación de 10-12 días en el intestino del vector, el virus aparece en la saliva de la hembra y a partir de ese momento puede transmitir la enfermedad a los seres humanos. Actualmente no existe una vacuna o tratamiento antiviral eficaz para el dengue, por lo que el control de la enfermedad se basa en el control del vector (Salvatella, 1996; Rodríguez y cols., 2010).



Figura 1.- Mosquitos del genero *Aedes*, vectores del virus del dengue. (<http://fme1.ifas.ufl.edu/research/exotic.shtml>, consulta el día 15 de Noviembre del 2013).

## 5.- CLASIFICACIÓN DEL DENGUE

El dengue tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, a menudo con evolución y resultados impredecibles. Aunque la mayoría de los pacientes se recuperan después de un curso clínico benigno y de resolución espontánea, entre un 10 y un 25 % progresa a una enfermedad grave, caracterizada principalmente por aumento de la permeabilidad vascular, con hemorragia o sin ella. Resulta difícil determinar cuál grupo progresa de la forma no grave a la grave de la enfermedad, lo que genera una gran preocupación pues el tratamiento apropiado puede evitar que se desarrollen condiciones clínicas que pongan en riesgo la vida de los pacientes (OPS/OMS., 2010).

Independientemente del serotipo viral infectante, el dengue puede presentar diversas manifestaciones: (1) enfermedad subclínica, de la cual existe solo evidencia serológica por detección de anticuerpos IgG específicos; (2) fiebre por dengue (FD), la forma más común y que se caracteriza por la presencia de fiebre, cefalea, mialgias, artralgias y dolor retro-ocular; (3) fiebre hemorrágica por dengue (FHD), que además de los síntomas de la FD, presenta petequias, hemorragias y trombocitopenia; y (4) el síndrome de choque por dengue (SCD), con la aparición de edema pulmonar y choque hipovolémico que puede causar la muerte del paciente (Ramírez, 2006). Debido al amplio espectro de manifestaciones clínicas que presenta la enfermedad y a las dificultades que presenta la aplicación de los criterios clínicos para la fiebre hemorrágica por dengue, junto con el aumento en los casos de dengue clínicamente graves que no cumplen con los estrictos criterios para ese diagnóstico, llevaron a solicitar que se reconsiderara la clasificación, por lo que en 2010 la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una nueva clasificación que unifica los criterios clasificándolos en dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave (figura 2), facilitando el diagnóstico clínico de la enfermedad (OPS/OMS., 2010).



Figura 2.- Criterios para la clasificación clínica del dengue (OPS/OMS, 2010).

Donde los criterios para su clasificación son los siguientes:

**Dengue probable:** vivir en áreas endémicas de dengue o viajar a ellas. Presentar fiebre y dos o más de los siguientes criterios:

- Náuseas, vómito
- Erupción cutánea
- Molestias y dolores
- Prueba de torniquete positiva
- Leucopenia

**Dengue con signos de alarma:** presentar dos o más de los criterios de dengue probable y cualquiera de los siguientes signos de alarma:

- Dolor abdominal intenso o abdomen doloroso a la palpación.
- Sangrado de mucosas.
- Letargia, agitación.
- Acumulación clínica de líquidos.
- Hepatomegalia > 2 cm.
- Pruebas de laboratorio: aumento del hematocrito concurrente con rápida disminución en el número de plaquetas.

**Dengue grave:** extravasación grave de plasma que conduce a:

- Síndrome de choque por dengue (SCD).
- Acumulación de líquidos con insuficiencia respiratoria.
- Sangrado intenso según la evaluación del médico tratante.
- Compromiso orgánico grave.

### 5.1.- CURSO DE LA ENFERMEDAD

Después del período de incubación, la enfermedad comienza abruptamente y le siguen tres fases de evolución: la febril, la crítica y la de convalecencia (figura 3):

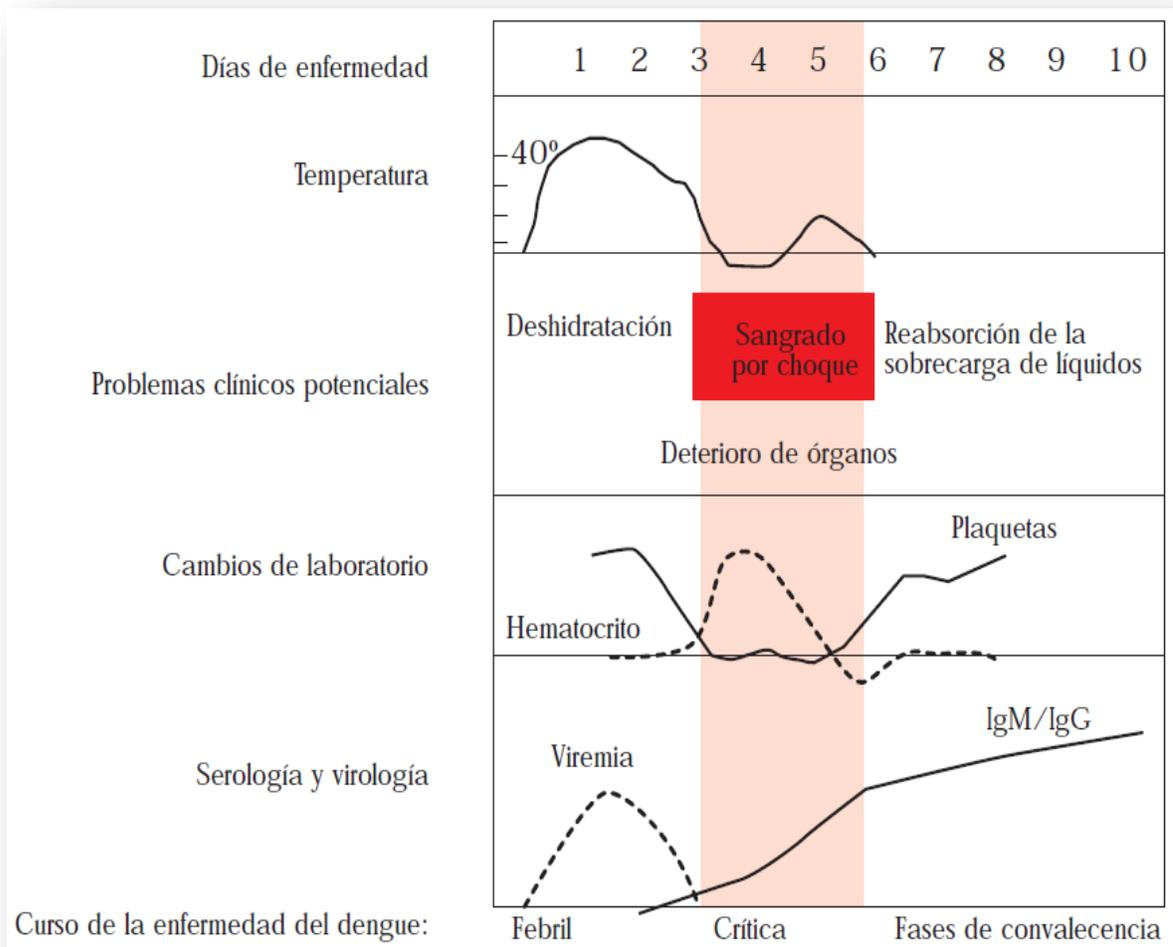


Figura 3.- Curso de la enfermedad del dengue (OMS/OPS, 2010).

**5.1.1.- Fase febril:** En esta, hay desarrollo de fiebre de manera abrupta, tiene una duración de 2 a 7 días y a menudo está acompañada de rubor facial, eritema de la piel, dolor corporal generalizado, mialgias, artralgias y cefalea. Algunos pacientes pueden tener dolor de garganta, infección en faringe e infección conjuntival. Durante el inicio de esta fase resulta complicado distinguir clínicamente el dengue de otras enfermedades febriles, por esto, es indispensable realizar un diagnóstico diferencial y de las características clínicas que presente al paciente.

**5.1.2.- Fase crítica:** Alrededor del momento de la disminución de la fiebre, cuando la temperatura disminuye a 37.5 °C o 38 °C o menos y permanece por debajo de este valor, usualmente en los días 3 a 7 de la enfermedad, se puede presentar un aumento en la permeabilidad capilar acompañada de valores elevados de hematocrito, lo que marca el inicio de la fase crítica. El período de extravasación de plasma dura generalmente entre 24 y 48 horas. Se presenta una disminución en los leucocitos y en las plaquetas lo que precede a la extravasación del plasma, el porcentaje de aumento en el hematocrito reflejara la gravedad de la extravasación del plasma. Al existir una pérdida considerable del volumen plasmático debido a la extravasación es cuando se presenta el choque por dengue.

**5.1.3.- Fase de recuperación:** Si el paciente sobrevive a la fase crítica de 24 a 48 horas, en las siguientes 48 a 72 horas tiene lugar una reabsorción gradual de los líquidos del compartimiento extravascular, mejora el bienestar general, regresa el apetito, disminuyen los síntomas gastrointestinales, se estabiliza el estado hemodinámico y se presenta diuresis. El hematocrito se estabiliza o puede ser menor debido al efecto por dilución de los líquidos reabsorbidos. El conteo de leucocitos generalmente comienza a aumentar inmediatamente después de la disminución de la fiebre, aunque la recuperación del número de plaquetas

generalmente es posterior al del número de leucocitos. (Shu y cols., 2009; Avirutnan y cols., 2006; Huerta y cols., 2008; OPS/OMS., 2010).

## **6.- EPIDEMIOLOGIA DEL DENGUE**

El dengue es la enfermedad viral transmitida por vector de más rápida propagación en el mundo. En los últimos 50 años, su incidencia ha aumentado 30 veces con la creciente expansión geográfica hacia nuevos países y, en la actual década, de áreas urbanas a rurales. Anualmente ocurre un estimado de 50 millones de infecciones por dengue y, aproximadamente, 2.5 mil millones de personas viven en países con dengue endémico. (OPS/OMS, 2010).

En México, el dengue presenta variaciones en su incidencia y brotes epidémicos durante todo el año, en especial en las costas del golfo de México y del océano pacífico, y con eventos de menor proporción por estados del centro del país (Secretaría de Salud, 2013).

Durante el año 2013, se presentaron casos en prácticamente todos los estados del país, teniendo una mayor incidencia en Baja California Sur (figura 4), y con el mayor número de casos confirmados en el estado de Veracruz (8,777 casos), seguido de Tabasco (6,108 casos) y Tamaulipas (5,554 casos). Sin embargo, a pesar de que se presentaron casos en la mayoría de los estados, se presentó un número menor de defunciones con respecto al año anterior, lo que habla de una oportuna detección y tratamiento en los casos confirmados (tabla 1). (Secretaría de Salud, 2013).

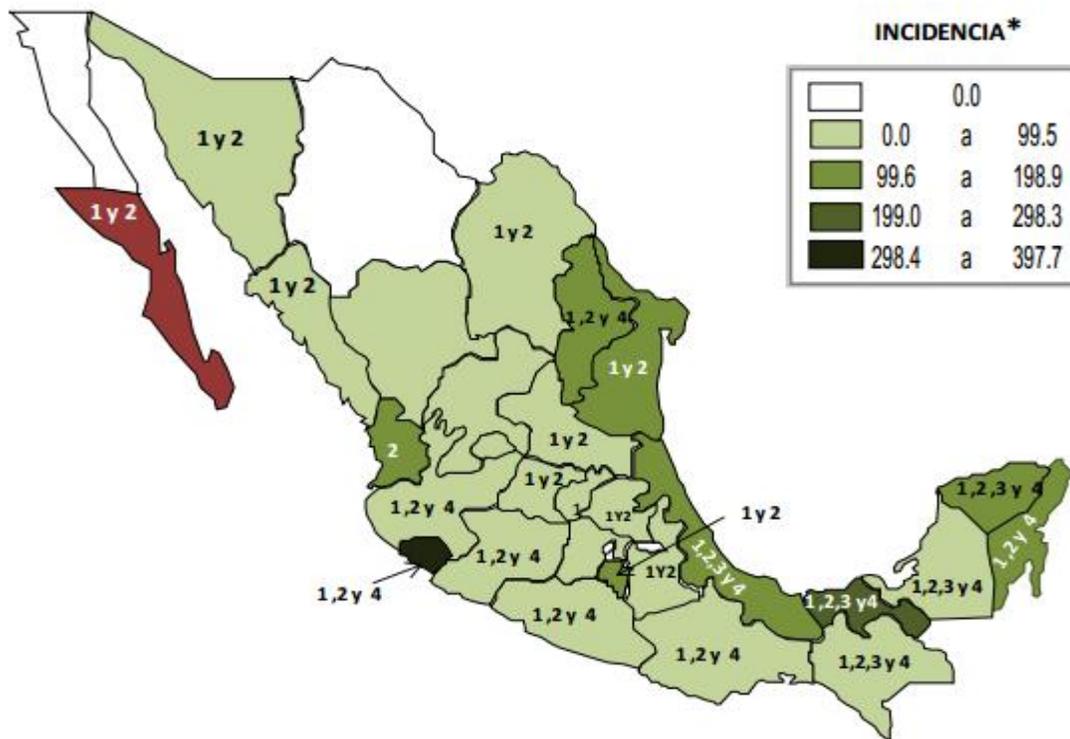


Figura 4.- Incidencia y serotipos virales aislados en casos confirmados de dengue por estado en México durante el año 2013.

Las difíciles condiciones ambientales y socioeconómicas en Latinoamérica condicionan brotes de dengue que tienen repercusiones negativas también en las economías nacionales. Las epidemias originan grandes costos de hospitalización, asistencia a enfermos y campañas de emergencia para el control de vectores. Los factores que condicionan la propagación del dengue requieren de programas de prevención que integren el punto de vista de las comunidades y fomenten la participación social en la erradicación del mosquito. Para integrar a la comunidad en los programas de prevención es importante partir de su sistema de significados culturales donde se destaquen las dimensiones que jerarquizan valores y orientan prácticas sociales en torno a la prevención, padecimientos y la atención, tomando en cuenta que muchas definiciones de lo que constituye una enfermedad no tienen paralelo en el ámbito biomédico (Caballero y cols., 2006).

Tabla 1.- Casos confirmados y defunciones en México durante 2012 y 2013 (Secretaría de Salud, 2013).

ESTADO	CASOS COFIRMADOS		DEFUNCIONES	
	2012*	2013*	2012*	2013*
VERACRUZ	12,505	8,777	42	26
TABASCO	3,909	6,108	21	10
TAMAULIPAS	1,840	5,554	0	5
NUEVO LEON	1,294	4,906	0	0
CHIAPAS	4,055	3,228	10	7
MORELOS	5,012	3,225	12	5
BAJA CALIFORNIA SUR	402	3,190	0	2
JALISCO	543	3,083	0	13
GUERRERO	4,475	2,977	19	2
QUINTANA ROO	1,231	2,757	7	3
COLIMA	395	2,756	0	5
YUCATAN	5,606	2,696	19	5
OAXACA	2,492	2,570	19	8
NAYARIT	23	2,008	0	1
SINALOA	121	1,434	0	0
MICHOACAN	1,276	1,316	1	1
PUEBLA	530	1,149	0	1
SAN LUIS POTOSI	1,306	1,068	1	0
COAHUILA	99	882	0	0
HIDALGO	211	874	2	0
CAMPECHE	1,967	768	9	0
SONORA	480	450	7	0
GUANAJUATO	1	64	0	0
MEXICO	190	13	1	0
QUERETARO	3	13	0	0
AGUASCALIENTES	0	2	0	0
ZACATECAS	28	2	0	0
DURANGO	5	1	0	0
BAJA CALIFORNIA	3	0	0	0
CHIHUAHUA	1	0	0	0
DISTRITO FEDERAL	0	0	0	0
TLAXCALA	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>50,013</b>	<b>61,871</b>	<b>170</b>	<b>94</b>

\*información al 23 de Diciembre del 2013

## 7.- VIRUS DEL DENGUE

Los DENV son *flavivirus* que pertenecen a la familia *Flaviviridae*, y están formados por una bicapa lipídica con peplómeros (que son glicoproteínas ancladas a la membrana), que rodean a la nucleocápside esférica. Posee por genoma una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 11 kb, está compuesto por dos regiones no traducibles (5' y 3' UTR), presenta una estructura Cap en su extremo 5' y carece de segmento poliA en su extremo 3', además de un solo marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína que es procesada para dar lugar a tres proteínas estructurales (C, prM y E) localizadas en el extremo amino terminal (5') y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) hacia el extremo carboxilo terminal (3') con funciones esenciales para la replicación viral. Los viriones miden aproximadamente 40 a 50 nm de diámetro con un peso molecular de alrededor de  $1.5 \times 10^8$  Daltones (figura 5) (Halstead, 2003; Rodríguez y cols., 2010; Velandia y cols., 2011; Byrd y cols., Tuiskunen y cols., 2013).

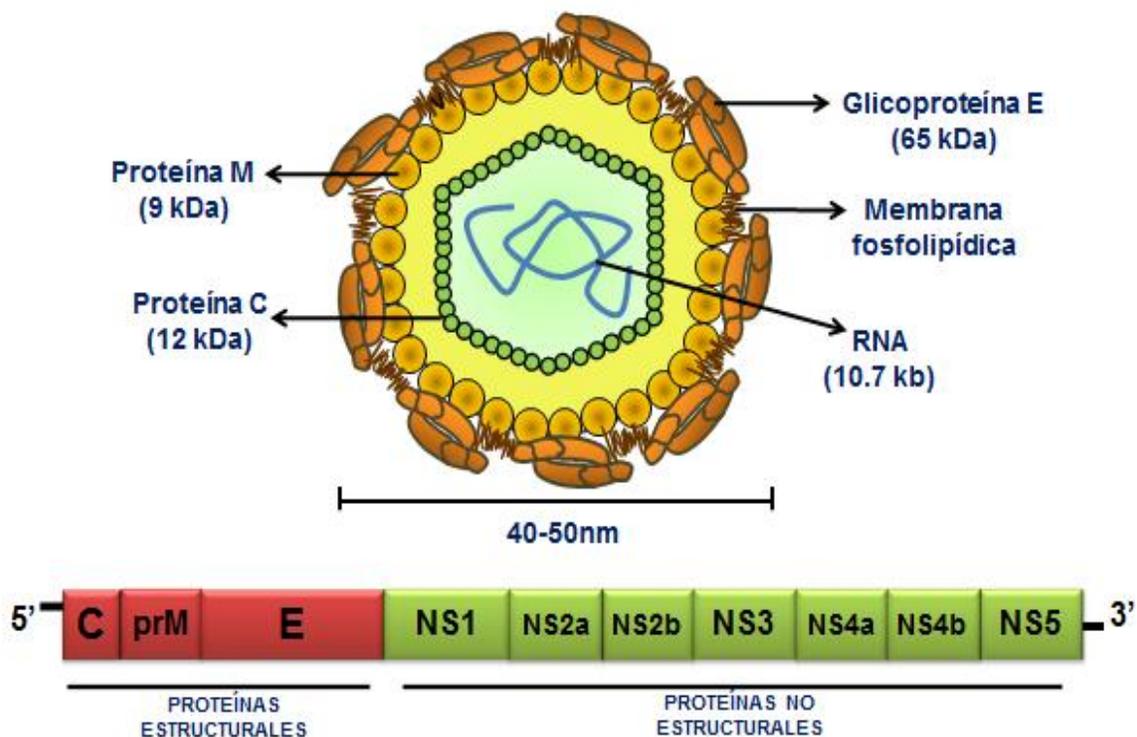


Figura 5.- Estructura y genoma del virus del dengue (Cortesía de la M. en C. Karina Ruiz Tovar).

Las proteínas E y NS1 tienen la característica de expresarse sobre la superficie de las células infectadas (principalmente monocitos) y la NS1 es la única proteína viral que se secreta al medio extracelular, lo que la hace blanco importante de la inmunidad humoral y objeto de detección en el suero de los pacientes para el diagnóstico de la enfermedad (Halstead, 2003; Gutshe y cols., 2011).

## 7.1.- PROTEINAS VIRALES

### 7.1.1.- Proteínas estructurales:

- **Proteína de cápside (C):** La proteína de la cápside, core o de cubierta pesa aproximadamente 11 kDa, su estructura consiste en cuatro hélices alfa que cumplen diferentes funciones: las hélices 3 y 4 son hidrofóbicas y anclan la proteína a la membrana del retículo endoplásmico. La hélice 1, ubicada en el extremo N-terminal de la proteína y orientada hacia el citoplasma, posee aminoácidos de carácter básico que se asocian y unen fuertemente al RNA genómico recién sintetizado; de esta manera, se forma el complejo riboproteico o nucleocápside que protege al RNA viral de la degradación y promueve la organización del RNA en el interior de la partícula viral en formación. La nucleocápside se estabiliza por la interacción de varios homodímeros antiparalelos de la proteína C, que rodean con gran afinidad y especificidad a la hebra de RNA viral. La hélice 2 posee una naturaleza muy hidrofóbica que interviene durante el ensamblaje de la ribonucleoproteína y de la partícula viral. En el primer caso, actúa como una bisagra que favorece el acercamiento del ARN viral al resto de la proteína C anclada en la membrana del retículo endoplásmico. Por otro lado, la hélice 2 recluta pequeñas gotas lipídicas (lipid droplets), presentes en el citoplasma, que promueven la formación de la partícula viral. Además, la proteína de la cápside anclada en el retículo endoplásmico interactúa con las proteínas precursora de membrana (prM) y

de envoltura (E), para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales (Lindenbach y cols., 2007; Velandia y cols., 2011).

- **Proteína precursora de membrana (prM):** La proteína precursora de membrana (prM) tiene un peso molecular de aproximadamente 26 kDa y está presente en los viriones inmaduros y participa fundamentalmente en el proceso de maduración de la partícula viral. Esta al ser procesada dará lugar a la **proteína de membrana (M)**, La prM es procesada después de la traducción por la furina (que tiene actividad de proteasa), que la divide en dos y genera, por un lado, el péptido pr, y por otro, la proteína M, que queda con un peso molecular de aproximadamente 8 kDa. La proteína tiene dos dominios transmembranales y un ectodominio de 40 aminoácidos, aproximadamente. Este último, puede inducir apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales. Se ha identificado un péptido de nueve aminoácidos que se cree que es el responsable de inducir la muerte de las células, este péptido que fue llamado ApoptoM, induce una señal solamente cuando este dominio es transportado por la ruta secretoria de la célula y se puede inhibir cuando el ectodominio se ancla al retículo endoplásmico o cuando se le adiciona el péptido señal KDEL (que se encarga de devolver a las proteínas que lo contengan al retículo endoplásmico). La actividad del péptido ApoptoM de la proteína M podría estar involucrado en la muerte celular y el daño tisular sufrido durante la infección (Cabrera, 2003; Lindenbach y cols., 2007; Velandia y cols., 2011).
- **Proteína de envoltura (E):** La proteína de envoltura tiene un peso molecular de 50 kDa, posee tres dominios denominados I, II y III, y se distribuye sobre la superficie del virus, formando complejos homodiméricos de tipo cabeza-cola. Los dominios II y III de cada uno de las proteínas del homodímero son determinantes para las interacciones entre el virus y los receptores de las células vulnerables. Por otra parte, la glucoproteína E es el principal inmunógeno del virus, por lo tanto estimula la respuesta inmune

del individuo e induce la producción de anticuerpos (Lindenbach y cols., 2007; Velandia y cols., 2011; Tuiskunen y cols., 2013).

La importancia de la proteína E radica en que es la única proteína viral que interactúa con las moléculas receptoras de la membrana plasmática de las células blanco del virus lo que favorecen la endocitosis del mismo. Por lo tanto, las mutaciones y modificaciones posteriores a la traducción que sufre esta proteína en cada ciclo de replicación, pueden afectar directamente la eficiencia de la replicación, la virulencia y el tropismo de los DENV, al igual que puede regular el establecimiento y el control de la infección por parte del sistema inmune (Lindenbach y cols., 2007; Velandia y cols., 2011; Tuiskunen y cols., 2013).

#### **7.1.2.- Proteínas no estructurales:**

La función o funciones de cada una de las proteínas no estructurales del DENV aún no se conocen con exactitud y solo se han definido parcialmente.

- **NS1:** La glicoproteína NS1 es una molécula altamente conservada entre los *flavivirus*, puede encontrarse en las células infectadas (forma intracelular), en la membrana celular (forma membranal mNS1) o en el medio extracelular (forma soluble sNS1). Tiene un peso molecular de aproximadamente 46 kDa, y su secuencia de aminoácidos es específica para cada serotipo de DENV. Se cree que la proteína NS1 tiene funciones durante la replicación del DENV que no se han logrado caracterizar, sin embargo, se sabe que se localiza en el sitio de replicación viral, lo que sugiere su participación en el montaje del complejo replicasa viral NS5/NS3.

Durante la infección viral se genera una fuerte respuesta humoral sin capacidad neutralizante contra las formas extracelulares de la proteína (esto debido a esta proteína no está presente en viriones maduros), sin

embargo, los anticuerpos producidos contra NS1 pueden estimular la lisis mediada por complemento, lo cual podría explicar los daños funcionales del endotelio, que conducen al sangrado y a la extravasación de plasma.

- **NS2A:** tiene un peso molecular de aproximadamente 22 kDa, se piensa que promueve el ensamblaje y la replicación viral. La NS2A coordina de un modo aún no muy bien definido, si el RNA genómico producido en cada ciclo de replicación se utiliza como nueva plantilla para generar las formas replicativas y los intermediarios de replicación o si se asocia dentro de la nucleocápside durante el ensamblaje viral.
- **NS2B/NS3:** Dan lugar a la serina proteasa viral. NS2B tiene un peso molecular de aproximadamente 14 kDa, posee una región hidrofóbica que ancla a la membrana del retículo endoplásmico el complejo NS2B/NS3 y luego, por un procesamiento proteolítico, un pequeño dominio hidrofílico de NS2B recién liberado interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3 para actuar como cofactor de ésta. NS3 tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa, es una proteína que posee en el extremo amino terminal un dominio proteasa similar a la tripsina (NS3pro) y en el extremo carboxilo terminal posee un dominio con diferentes actividades enzimáticas, que actúa como RNA trifosfatasa (NTPase) y como RNA helicasa (NS3Hel); ambas funciones son indispensables en la replicación viral. El dominio NS3Pro actúa hidrolizando los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 del polipéptido. La proteína NS2B le conferirá estabilidad a la actividad proteolítica de la NS3, mientras que al estar unidas, la función de helicasa permanecerá inhibida. Además, se cree que la proteína NS3 es la encargada de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del retículo endoplásmico, al reclutar enzimas celulares de la vía de síntesis de lípidos, lo cual garantiza el inicio del ensamblaje.

La otra función de la proteína NS3 es actuar como helicasa (NS3Hel), desenrollando las estructuras secundarias que se forman en el extremo 3' del RNA viral, para favorecer la unión de la polimerasa NS5 sobre el RNA y dar inicio a la replicación.

- **NS4A y NS4B:** Son pequeñas proteínas hidrofóbicas de 16 y 27 kDa respectivamente, aún las funciones de estas proteínas no están bien definidas, se piensa que existe una interacción genética importante entre NS1 y NS4A en la replicación del RNA viral, por su parte se cree que la proteína NS4B participa en la inhibición en la transducción de señales antivirales mediadas por interferones.
- **NS5:** La proteína NS5 es la más conservada entre todos los flavivirus. Esta proteína es multifuncional, ya que el extremo N-terminal posee actividad enzimática de metiltransferasa y guanidiltransferasa, responsables del capping y la metilación del extremo 5' del RNA genómico, mientras que, en el extremo carboxilo terminal, se ubica el dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRps). La proteína NS5 actúa como la única polimerasa durante la replicación y transcripción virales. Aunque estos procesos suceden exclusivamente en el citoplasma de la célula infectada, se ha identificado una señal de localización nuclear en la proteína NS5 que facilita su importación al núcleo; aunque la razón y la función de la NS5 en el núcleo no se conocen (Cabrera, 2003; Lindenbach y cols., 2007; Velandia y cols., Duangchinda y cols., 2011; Tuiskunen y cols., 2013).

## 8.- CICLO DE REPLICACIÓN

La entrada del virus en células de mamíferos y en las de mosquito se inicia con el acercamiento del DENV a la superficie de la célula; luego, el dominio III de la proteína E interactúa con proteínas de la membrana celular que median la unión y la posterior endocitosis del virus (endocitosis mediada por receptor), aún no está bien definido cuál es el principal receptor que participa en este fenómeno, sin embargo, han sido propuestos distintos receptores: hsp 70, hsp 90, heparan sulfato, CD14, GRP78/BiP, el receptor de laminina LAMR1, así como la molécula DC-SIGN (molécula no integrina de unión al ICAM-3 específica de células dendríticas (CD-209)) (Boonrat y cols, 2003; Velandia y cols., 2011; Tuiskunen y cols., 2013). La variedad en los receptores que pueden participar en la endocitosis del virus indicarían que, dependiendo del tipo celular, los diferentes serotipos virales pueden utilizar diferentes moléculas receptoras (del Ángel, 2006).

El receptor DC-SIGN es el mejor estudiado, este receptor puede mediar la infección de todos los serotipos de los DENV, además de que su expresión, confiere permisibilidad incluso en células normalmente no permisivas. DC-SIGN permite a las células dendríticas inmaduras, reconocer al virus después de su transmisión por el mosquito vector, para permitir la entrada a la célula (Boonrat y cols., 2003; Navarro y cols. 2005).

Después de la entrada del virus, la vesícula endocítica se transforma en un endosoma temprano y posteriormente en un endosoma tardío, el cual se fusiona con un lisosoma que acidifica el pH de la vesícula. El cambio de pH induce los cambios de conformación del dominio II de la proteína E, que favorecen la exposición y el anclaje inmediato del péptido de fusión a la membrana de la vesícula, lo que conlleva finalmente a la liberación de la nucleocápside al citoplasma.

Cuando la nucleocápside se halla libre en el citoplasma, se inician los procesos de traducción (para producir altos niveles de proteínas virales) y replicación del RNA del virus. Como se mencionó anteriormente, el RNA viral del virus es de cadena sencilla con polaridad positiva, con un único marco de lectura que traduce una poliproteína, la cual es procesada en el retículo endoplásmico por proteasas celulares y la actividad NS3pro, que libera de forma ordenada a las tres proteínas estructurales (C, prM y E) y las siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) encargadas de la replicación del genoma y el ensamblaje viral (figura 6) (Mukhopadhyay y cols., 2005; Clyde y cols., 2006, Sariol y cols., Velandia y cols., 2011).

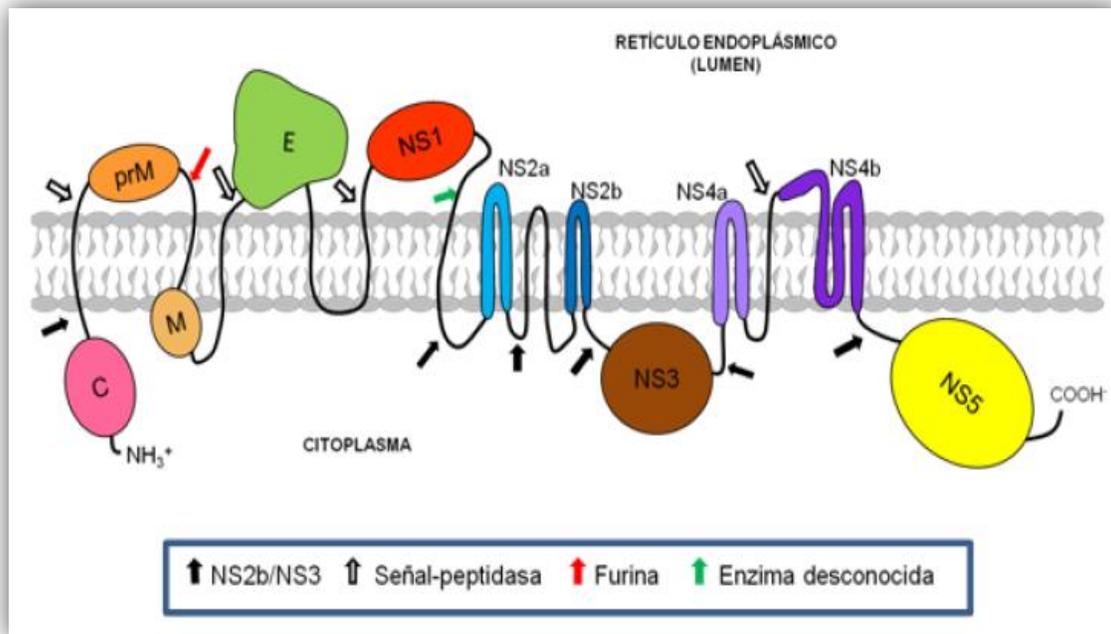


Figura 6.- Distribución y procesamiento de la poliproteína viral en el RE durante la replicación del DENV (Cortesía de la M. en C. Karina Ruiz Tovar).

La replicación del RNA viral es un proceso que comienza con la generación de un complejo de replicación (CR), este complejo de replicación se asocia a las membranas celulares durante la replicación viral. La replicación comienza con la producción de una cadena de RNA de polaridad contraria a la del virus, es decir,

polaridad negativa, también conocido como intermediario o forma de replicación (IR), la cual servirá como molde para la producción de RNA de polaridad positiva. La asociación entre estas dos cadenas (la cadena de RNA de polaridad positiva y la cadena de RNA de polaridad negativa) genera una hebra de RNA de doble cadena que es conocida como forma replicativa (FR). Las cadenas de RNA de polaridad positiva se liberan de los IR y pueden ir a los ribosomas para iniciar nuevos ciclos de traducción o pueden ser utilizadas durante el ensamblaje de los viriones en el retículo endoplásmico (Clyde y cols., 2006, Velandia y cols., 2011).

Durante la traducción, el polipéptido recién sintetizado es acompañado por las proteínas chaperonas BiP, calnexina y calreticulina; luego, cada una de las proteínas virales se organiza en la membrana del retículo endoplásmico y es procesada por proteasas como la furina, la signalasa o la NS3Pro, para finalmente ser modificadas después de la traducción. (Velandia y cols., 2011).

El proceso de ensamblaje del virus comienza con la formación de la nucleocápside gracias a la interacción del RNA viral y la proteína C, sobre esta primera estructura luego se asocian las proteínas prM/M y E, que deben estar inmersas en la membrana del retículo endoplásmico. Posteriormente, suceden dos etapas de maduración de la partícula viral. Primero se organizan de forma heterodimérica las proteínas prM/M y E, en donde la primera recubre a la segunda, después, esta partícula inmadura transita desde el retículo endoplásmico hasta las regiones cis y trans del aparato de Golgi, donde se inicia la segunda etapa de maduración. En esta última etapa, los cambios de conformación y de rotación de la proteína E generan homotrímeros antiparalelos de la misma, lo que le da una apariencia lisa a la superficie del virus. Por último, un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína prM/M por la proteasa furina, desprende el péptido pr y la proteína M. Esta nueva modificación estabiliza los homotrímeros de E y mantiene unido al péptido pr. (Lindenbach y cols., 2007; Mukhopadhyay y cols., 2005; Clyde y cols., 2006, Velandia y cols., 2011).

Finalmente, cuando el virus es liberado, el pH neutro del espacio extracitoplásmico induce el desprendimiento del péptido pr y la proteína E adquiere la conformación final que puede ser reconocida por las moléculas receptoras de la célula blanco e iniciar un nuevo ciclo de infección en otra célula (figura 7) (del Ángel, 2006; Velandia y cols., 2011).

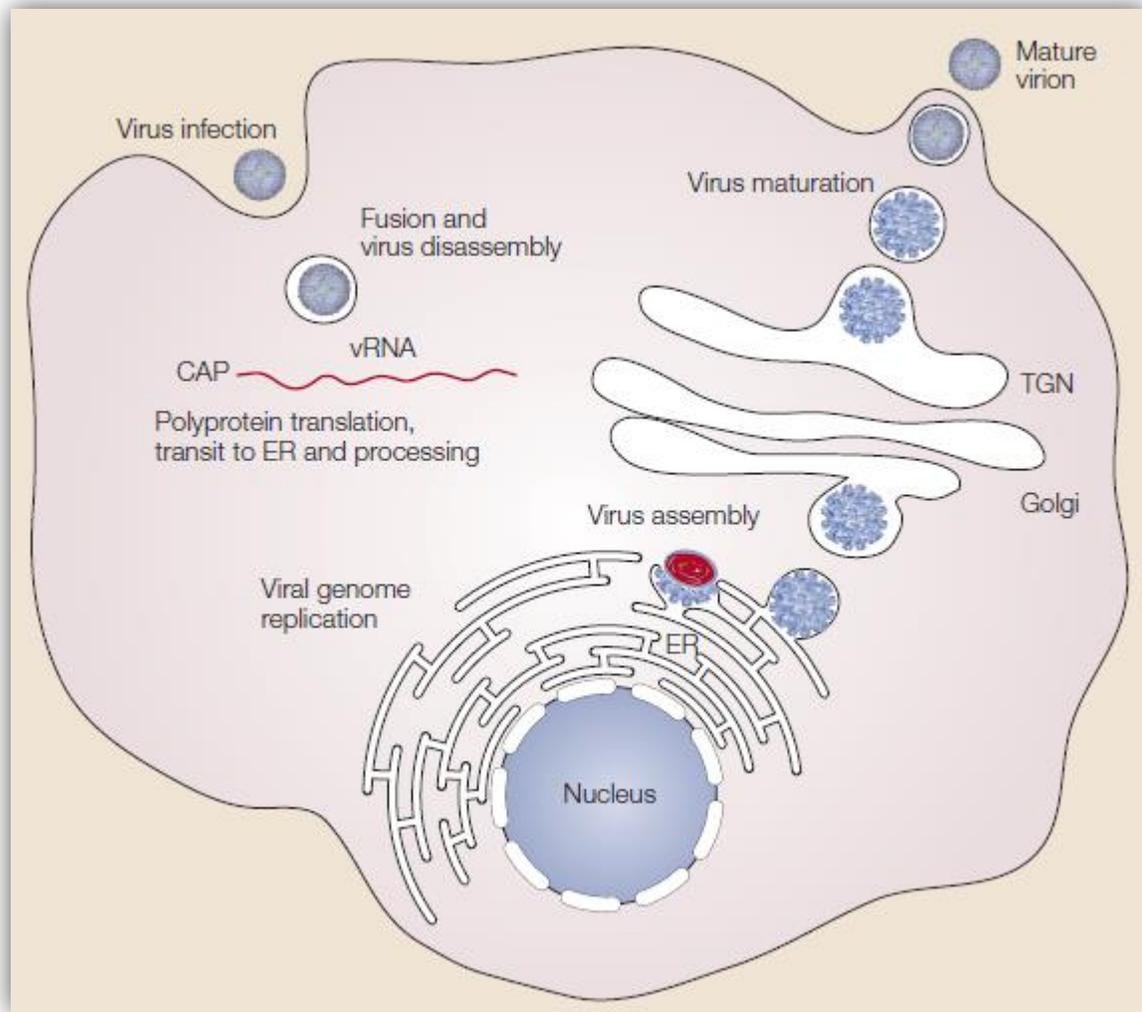


Figura 7.- Ciclo de replicación del virus: (1) Entrada del virus vía RME, (2) fusión del endosoma tardío con el lisosoma, cambio de pH, (3) liberación de la nucleocápside, (4) traducción de la poliproteína y replicación viral, (5) ensamble del virus, maduración y liberación del virus (Mukhopadhyay y cols., 2005).

## **9.- PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD**

La FHD y el SCD son las manifestaciones más graves de la infección por el DENV, donde de manera general las células del sistema fagocítico mononuclear y las células dendríticas son las células blanco primordiales durante una infección natural; así como las células de Langerhans localizadas en la piel son permisivas para la infección y es probable que sean las células blanco en etapas muy tempranas luego de la picadura del mosquito infectado (Durán, 2010), a pesar de que los mecanismos de patogenia de los virus del dengue aún no están muy claros, existen varias hipótesis para explicar la patogénesis:

**9.1.- Virulencia de los DENV:** A mayor virulencia, mayor será la probabilidad de desarrollar las formas graves de la enfermedad. En este sentido está reportado que el DENV-2 es mucho más virulento que los otros serotipos (Clyde y cols., 2006; Pérez, 2010; Durán y cols. 2010). Además también esta virulencia se asocia con las infecciones secuenciales que pueden presentarse, el riesgo de presentar las formas graves de la enfermedad es mayor en la infección secuencial por DENV-1 seguido de DENV-2 que de DENV3 seguida de DENV-2. También se ha descrito que los virus más virulentos suprimen la activación de genes antivirales en el hospedero e inducen más muerte por apoptosis de monocitos humanos infectados en comparación con los virus menos virulentos, estos virus estimulan la secreción de factores antivirales como son: la IL-6, IL-8, RANTES, factores inflamatorios y la producción de IFN- $\gamma$  (Fernández y cols., 2009; Guzmán y cols., 2010; Pérez, 2010).

**9.2.- Potenciación de la infección mediada por anticuerpos (ADE):** Los anticuerpos serotipo específicos durante una primera infección resultan ser sub-neutralizantes o no neutralizantes en una segunda infección por un serotipo distinto, estos anticuerpos no neutralizantes inducidos por una infección previa forma complejos inmunológicos. Los complejos inmunológicos se unen a los receptores Fc de los monocitos, macrófagos y células dendríticas maduras para

facilitar la entrada viral y la replicación. Este evento desencadena un elevado nivel de viremia y la activación de otras células del sistema inmune que consecuentemente aumentan la gravedad de la enfermedad. La habilidad de los anticuerpos de neutralizar o potenciar una infección viral puede estar también influenciada por su interacción con los receptores FcγR (Sommons y cols., 2006; Guzmán y cols., 2010; Pérez, 2010; Durán y cols. 2010).

**9.3.- Anticuerpos contra proteínas no estructurales:** Estos anticuerpos dan como resultado una reacción cruzada contra proteínas del hospedero como el fibrinógeno (alterando el proceso de coagulación), proteínas de células endoteliales y proteínas de membrana específicas de plaquetas (provocando inhibición plaquetaria y lisis. Así como también las proteínas no estructurales provocan activación de complemento. La proteína NS1 (en su forma soluble y membranal), activa la vía clásica del sistema de complemento, causando una disminución en la concentración de sus componentes debido a su consumo, además la consecuente formación de C3a y C5a (que son potentes anafilatoxinas) pueden incrementar la permeabilidad vascular (Avirutnan y cols., 2006; Shu y cols., 2000).

**9.4.- Inmunidad celular y producción de citocinas:** La activación exacerbada de Linfocitos T citotóxicos y células NK provoca una citotoxicidad en las células del hospedero. (Pérez y cols., 2010). Además de una sobreexpresión en citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ ) que en lugar de conferir protección, causan un daño a las células del organismo ya que causan principalmente una alteración importante en la permeabilidad vascular, favoreciendo la evolución a formas graves (Diamond, 2003; Navarro y cols., 2005; Pérez, 2010; Durán y cols. 2010)

Existen ciertos factores del hospedero que pueden influir en la evolución a formas graves, aunque su asociación no es significativa (tabla 2) (Durán y cols., 2010).

Tabla 2.- Factores del hospedero que pueden influir en la evolución a formas graves de la enfermedad.

Anticuerpos no neutralizantes	En los lactantes menores de nueve meses pueden encontrarse anticuerpos maternos que atravesaron la placenta o en los individuos mayores puede haber anticuerpos que se formaron al producirse en infecciones primarias.
Edad	La predisposición a la fiebre del dengue hemorrágico y el síndrome de shock por dengue desciende en forma considerable pasados los 12 años de edad.
Raza	Los sujetos de raza caucásica se ven afectados más a menudo que los de raza negra.

## **10.- SISTEMA INMUNE INNATO**

Debido a la posible evolución a formas más graves de la enfermedad, el papel que juega el sistema inmune innato resulta muy importante en el control de la infección (Martínez, 2008). La respuesta inmune contra el DENV, es iniciada mediante el reconocimiento del RNA viral (PAMP viral) por diversos receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo Toll (TLR) -3, -7 y -8 que se encuentran en el citoplasma y en los endosomas de diversas células blanco de la infección viral (Halstead, 2003; Medzhitov, 2005).

### **10.1.- PAMPs y PRRs**

Los PAMPs o Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, son moléculas presentes en agentes infecciosos que presentan una serie de características que los definen:

- Son esenciales para el metabolismo, supervivencia o patogenicidad de los microorganismos, además de ser constitutivos.
- Son parte de los microorganismos pero no del hospedero, por lo que el reconocimiento y posterior respuesta inmune se monta sólo contra estos agentes.
- No son exclusivos de patógenos individuales, pero son compartidos por todos los agentes patógenos de una clase (hongos, bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas, micobacterias o virus), para que el sistema inmune innato puede discriminar entre las diferentes clases de patógenos. (Mendez y cols., 2008; Kindt, y cols, 2007).

Además de los PAMPs, también existen los DAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Daño), los DAMPs son de origen endógeno, y se presentan cuando existe un daño tisular o celular, los DAMPs actúan como una señal de alarma al existir un evento traumático, ya que reclutan y activan células del sistema inmune innato como las células dendríticas e indirectamente promueven respuestas inmunes adaptativas. Algunos ejemplos de estas “alarminas” son las defensinas, galectinas, timosinas, hsp, ácido úrico, entre otras (Schmid y cols., 2007; Blasius y cols., 2010; Christmas, 2010).

Los PRR pueden ser clasificados de acuerdo a su funcionalidad en 3 clases:

- **10.1.1.- PRRs solubles:** se unen y “marcan” al patógeno para que sea reconocido por las células fagocíticas del sistema inmune (es decir, lo opsonizan) o para activar al sistema de complemento. Los PRRs solubles se localizan en el plasma o en los fluidos de los tejidos, reconocen lípidos y carbohidratos del patógeno, se acoplan al reconocer a su ligando, destruyéndolo vía complemento a fagocitosis. Ellos están representados principalmente por las proteínas de fase aguda que se producen por el hígado en respuesta a citocinas pro-inflamatorias en las primeras etapas de la infección, así como por la proteína de unión a manosa (MBL), que inicia la activación de la cascada del complemento por la vía de las lectinas.
- **10.1.2.- PRRs de membrana celular:** se unen al microorganismo patógeno y median su internalización y la subsecuente fusión con los lisosomas para su degradación, estos se expresan en la superficie de neutrófilos, macrófagos y células dendríticas las cuales entran en contacto con el patógeno de manera rápida. Después de fagocitar al patógeno se lleva a cabo su destrucción intracelular, y se presentan péptidos antigénicos sobre moléculas del MHC para su reconocimiento por parte de los Linfocitos T.

- **10.1.3.- PRRs de señalización:** van a actuar como un sistema de alarma temprano, la unión del PAMP con su receptor dará lugar a una respuesta microbicida a través de una serie de señales intracelulares. Pueden ser encontrados en la superficie de células epiteliales y células del sistema inmune innato o en el citosol de la célula donde detectan patógenos que pueden internalizarse en la célula como es el caso de los virus y algunas bacterias patógenas (Gordon, 2002) ([www.ip.bio-med.ch](http://www.ip.bio-med.ch)).

Los TLRs, NLRs y RLRs son parte de este tipo de PRRs. Estos resultan ser críticos en la iniciación de la respuesta inmune innata, los TLRs son intra y extracelulares, mientras que los RLRs y NLRs son receptores citosólicos que reconocen patógenos que han invadido el citosol (figura 8).

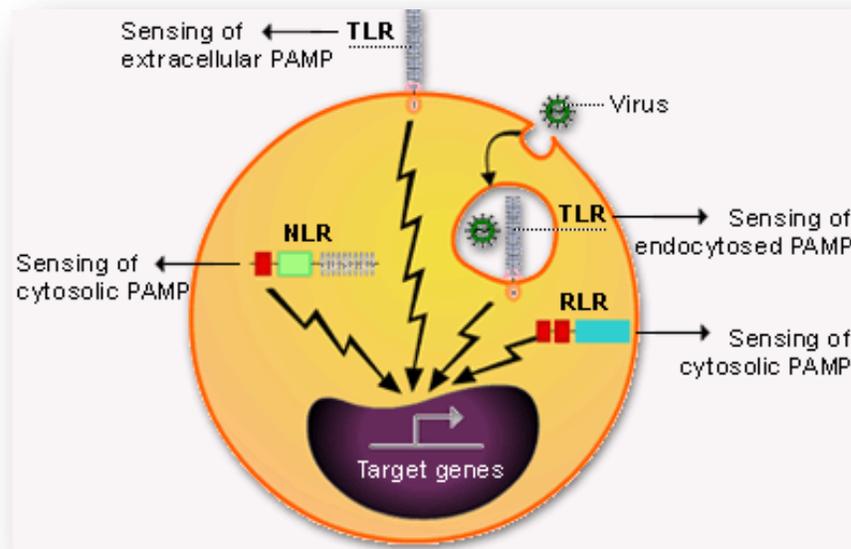


Figura 8.- Principales PRRs de señalización (TLRs, NLRs y RLRs). (<http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3948&Menu=66&backbar=0> consultado el día 18 de febrero del 2014).

Estos regulan la expresión de varios genes involucrados en la respuesta de defensa del hospedero:

- Producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias: Como son TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, CXCL8 (molécula de reclutamiento de neutrófilos y macrófagos) y CCL20 (molécula de reclutamiento de células dendríticas).
- Moléculas con efecto antimicrobiano: Incluyendo óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y péptidos antimicrobianos.
- Moléculas involucradas en la presentación del antígeno incluyendo MHC y moléculas co-estimuladoras (Lin y cols., 2007; Thompson y cols., 2008 Ubol y cols., 2010).

## 11.- RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs)

La proteína Toll fue identificada como un componente esencial de la vía que establece el desarrollo dorsoventral del embrión de *Drosophila melanogaster*. Nüsslen y Wieschaus estudiaron mutaciones letales que afectaban al desarrollo del cigoto de *Drosophila*, en sus estudios, encontraron una línea de embriones procedentes de hembras heterocigotas que presentaban una mutación en un gen que impedía el desarrollo del mesodermo y del sistema nervioso central, identificaron el gen mutado y comprobaron que daba lugar a un receptor transmembranal que denominaron Toll, ellos comentaron que los resultados en sus estudios eran “Toll!”, lo que se traduce en “¡Increíbles!” al español, de aquí el nombre de la proteína (Christmas, 2010). Este receptor activa también el factor de transcripción denominado *dorsal* (el cual es homólogo al factor de transcripción NF- $\kappa$ B en vertebrados) al mediar la degradación de una proteína represora de *dorsal* llamada *cactus*. Una vez liberada *cactus*, *dorsal* puede translocarse al núcleo donde activa genes específicos capaces de activar o reprimir la expresión de genes que intervienen en el desarrollo embrionario de *Drosophila*. Debido a la homología de Toll con el receptor de la interleucina 1 (IL-1R) en vertebrados y a la conservación de los canales de señalización en ambos sistemas, se propuso que Toll estaba involucrado en la regulación del sistema inmune. Posteriormente se descubrió que la proteína Toll tiene un papel central en la respuesta inmune de la *Drosophila melanogaster* adulta y que la vía de señalización de Toll es necesaria para inducir la transcripción de un gen que da lugar a un péptido antifúngico denominado drosomicina en respuesta a una infección por hongos. En estudios posteriores se observó que moscas adultas con mutaciones en el gen Toll eran incapaces de inducir la expresión del péptido drosomicina cuando eran infectados con ciertas especies de hongos, estos mutantes no eran susceptibles a infecciones bacterianas, lo que sugería que la respuesta antifúngica seguía distintas vías de señalización. (Akira y cols., 2004; Chávez, Hernandez y cols., 2007; Thompson y cols., 2008; Kawai y cols., 2010).

Dados estos descubrimientos, las siguientes investigaciones fueron encaminadas a descubrir receptores de patógenos en humanos, usando la secuencia de aminoácidos de Toll, buscaron secuencias relacionadas en el genoma humano, así fue como identificaron a los receptores tipo Toll (Christmas, 2010). En humanos han sido descritos 13 TLRs, estos reconocen un amplio rango de componentes microbianos de bacterias, hongos, parásitos y virus (tabla 3), los TLRs son proteínas transmembranales tipo I que presentan una superficie bicóncava externa directamente relacionada con el reconocimiento de los PAMPs, pueden ser intracelulares ubicados en endosomas o extracelulares, ubicados en la superficie de la célula (figura 9), presentando también los siguientes componentes (figura 10):

- Un dominio extracelular de entre 19 y 25 motivos ricos en leucina (LRR) seguidos de uno o dos regiones ricas en cisteína (CR).
- Un dominio transmembranal.
- Un dominio citoplasmático Toll/IL-1R (TIR) homólogo al dominio intracelular del receptor de la interleucina 1 que tiene una región conservada de aproximadamente 200 aminoácidos en su cola citoplasmática, la cual consiste en tres regiones (Box-1, Box-2 y Box-3), con funciones cruciales para la señalización (Akira y cols., 2004).

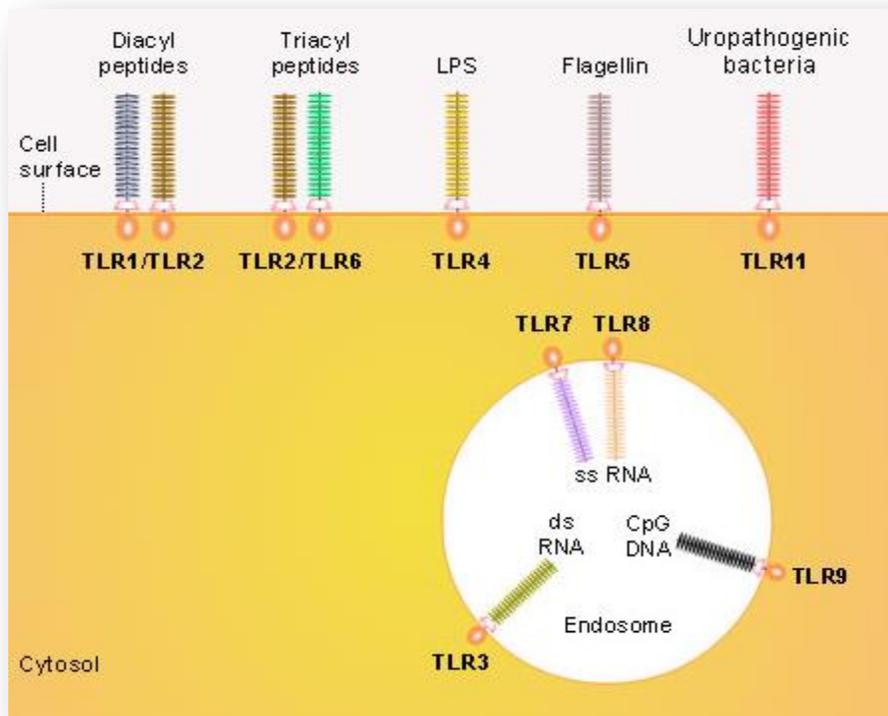


Figura 9.- TLRs intra y extracelulares. (<http://ip.biomed.ch/cms/Default.aspx?Page=3951&Menu=66&backbar=0>, consultado el día 20 de febrero del 2014).

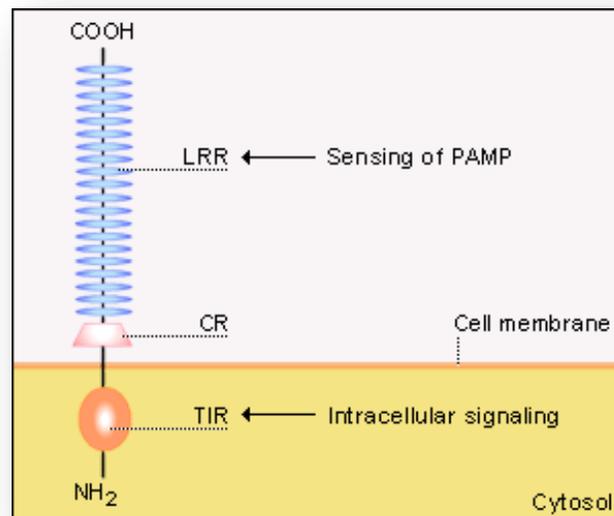


Figura 10.- Estructura general de los TLRs (<http://ip.biomed.ch/cms/Default.aspx?Page=3951&Menu=66&backbar=0>, consultado el día 20 de febrero del 2014).

Tabla 3.- TLRs y sus ligandos.

RECEPTOR	RECONOCEN	ACTÚAN CONTRA
<b>TLR-1</b>	Lipopéptidos Lipoproteínas	Bacterias y Micobacterias
<b>TLR-2</b>	Lipoproteínas Ácido lipoteicoico Lipoarabinomano Glicolípidos Porinas Lipopolisacáridos (LPS), Hsp 70	Bacterias Gram (+) Micobacterias Parásitos Hongos Bacterias Hospedero
<b>TLR-3</b>	RNA de doble cadena	Virus
<b>TLR-4</b>	LPS Hsp 60 Fibronectina Oligosacáridos del ácido hialurónico	Bacterias Gram (-) Hospedero
<b>TLR-5</b>	Flagelina	<i>Salmonella sp.</i>
<b>TLR-6</b>	Lipoproteínas diacetiladas, peptidoglicanos	Micoplasmas Bacterias Gram (+)
<b>TLR-7</b>	RNA de cadena sencilla	Virus
<b>TLR-8</b>	RNA de cadena sencilla	Virus
<b>TLR-9</b>	DNA no metilado con secuencias CpG	Bacterias Protozoarios
<b>TLR-10</b>	N.I., estrechamente relacionado con TLR-1 y TLR-6	N. I.
<b>TLR-11</b>	Antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i> Antígenos de bacterias uropatógenas	<i>Toxoplasma gondii</i> Bacterias uropatógenas
<b>TLR-12</b>	Antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i> Antígenos de bacterias uropatógenas	<i>Toxoplasma gondii</i> Bacterias uropatógenas
<b>TLR-13</b>	No está bien identificado aun, pertenece a la subfamilia del TLR-13	Componentes bacterianos

N.I.: no identificado.

Tabla modificada de Akira y cols., 2004; Zang y cols., 2004; Chávez, 2007; Thompson y cols., 2008; Xagorari y cols., 2008; Shi y cols., 2009; Kawai y cols., 2010; Wei y cols., 2011; Raetz y cols., 2013.

### 11.1.- VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS TLRs

Después de que los TLRs detectan a los PAMPs o los DAMPs, existe una traducción de señales hacia el interior de la célula, las proteínas cinasas son las encargadas de comenzar esta señalización mediante la activación de otras proteínas adicionando un grupo fosfato a ciertos aminoácidos de estas; existen distintas cinasas que actúan durante las diferentes vías de señalización de los TLR como son IRAK (quinasas asociadas al receptor de IL-1) y las MAPK (quinasas activadoras de mitógenos) (Christmas, 2010). Después de la unión entre el TLR y su ligando, el dominio TIR se dimeriza y ocurre un cambio conformacional que facilita el reclutamiento de las moléculas de señalización. La proteína TIR recluta a MyD88 (molécula adaptadora que es capaz de activar las vías de señalización para NF- $\kappa$ B, MAPK y las vías de IRF) hacia su dominio citoplasmático, se asocia a IRAK4 (cinasa 4 asociada al receptor de IL-1) a través de una interacción homofílica por medio de sus respectivos dominios de muerte (DD) y permite la fosforilación de IRAK 4 que activa a IRAK1 (cinasa 1 asociada al receptor de IL-1) e induce su actividad de cinasa. La proteína IRAK1 se autofosforila en los residuos carboxilo terminales y se une a TRAF6 (factor 6 asociado al receptor de TNF). Posteriormente IRAK1-TRAF6 se desensamblan e interactúan en la membrana plasmática con otro complejo preformado que consiste de TAK1 (cinasa 1 activada por TGF- $\beta$ ), TAB1 y TAB2 o TAB3 (que son proteínas de unión a TAK). La activación de la molécula TAK1 incide en otras vías de señalización como la vía de MAP cinasas, esta interacción induce la fosforilación de TAB2/TAB3 y TAK1 que a su vez activa el complejo IKK (Ik $\beta$  cinasa) conformado por IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$  (este complejo es el que mantiene inhibida a la molécula NF- $\kappa$ B), ocurre la fosforilación de IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$  (este complejo esta modulado por la unidad IKK- $\gamma$  o NEMO) que bajo estas condiciones se degradan y liberan al NF- $\kappa$ B que se transloca en el núcleo y promueve la producción de RNA mensajeros que codifican para moléculas involucradas en la inflamación, regulación inmune, proliferación, apoptosis, etc... (Figura 10) (Akira y cols., 2004; Dostert y cols., 2008; Kawai, 2010).

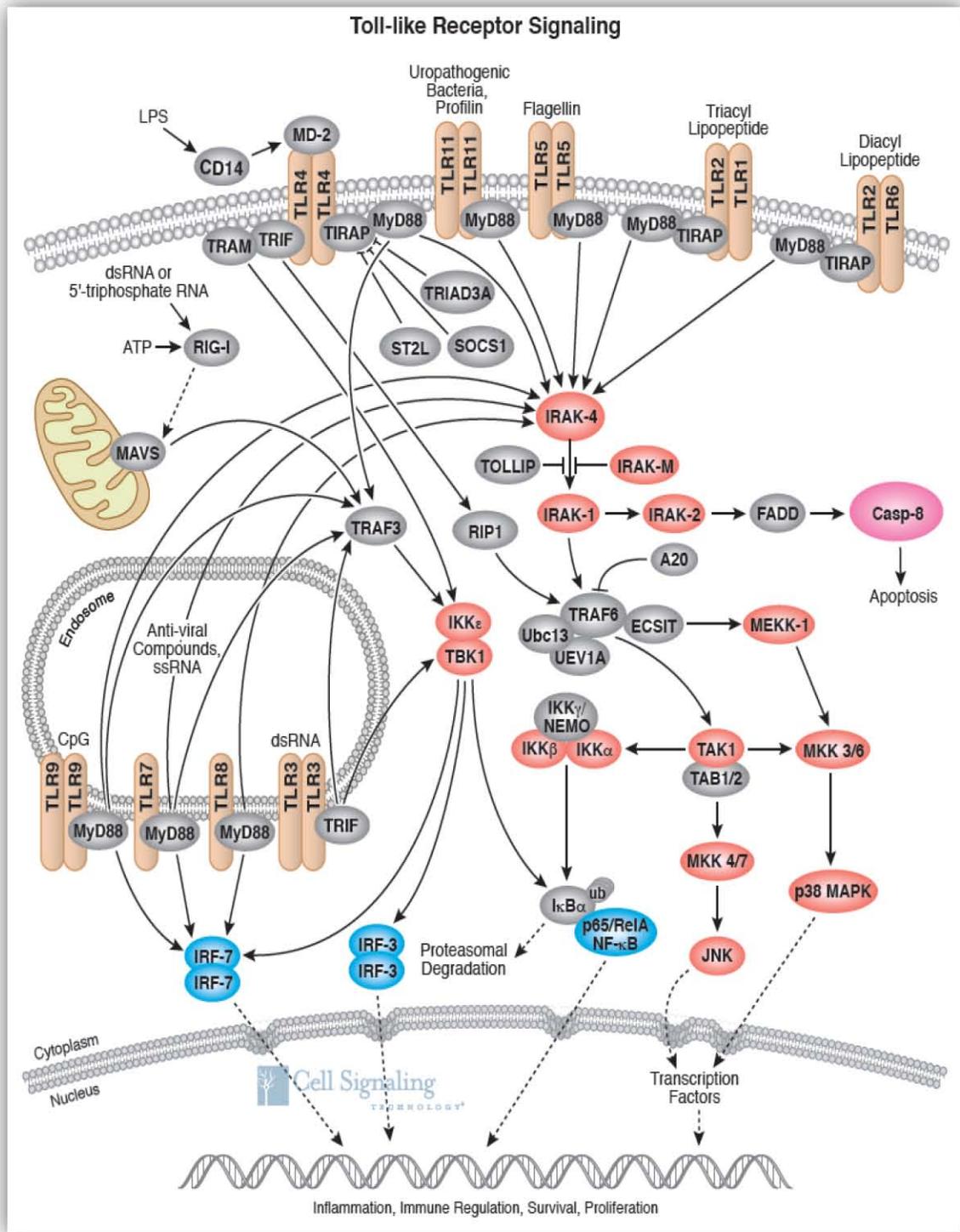


Figura 11.- Vía de señalización de los TLRs ([http://www.cellsignal.com/reference/pathway/pdfs/Toll\\_Like.pdf](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/pdfs/Toll_Like.pdf), consultado el día 03 de Marzo del 2014).

## 12.- RESPUESTA INMUNE CONTRA EL DENV

En células como neutrófilos y macrófagos el reconocimiento por parte de los TLRs da lugar a la activación de diferentes vías de señalización, como la vía de MAP cinasas, la vía de factores reguladores de interferones (IRFs) y la vía de NF- $\kappa$ B, las cuales promueven la producción de citocinas pro-inflamatorias como son IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e interferones tipo 1 (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) además de desencadenar una rápida producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), (figura 12), los cuales han sido asociados con la evolución a formas graves de la enfermedad en infecciones secundarias, debido a que provocan daño al endotelio con la posterior extravasación de plasma, lo que puede llevar a la hemoconcentración y al choque hipovolémico (Liang y cols, 2011), Por otra parte, este reconocimiento por parte de los TLRs en células presentadoras de antígeno como en células dendríticas conduce a la expresión de CD80 y CD86 que participan como moléculas co-estimuladoras en la activación de linfocitos T, además de participar en la producción de citocinas involucradas en la diferenciación y maduración de células T CD4+ (LT cooperadores) (Chávez, 2007; Modhiran y cols., 2010).

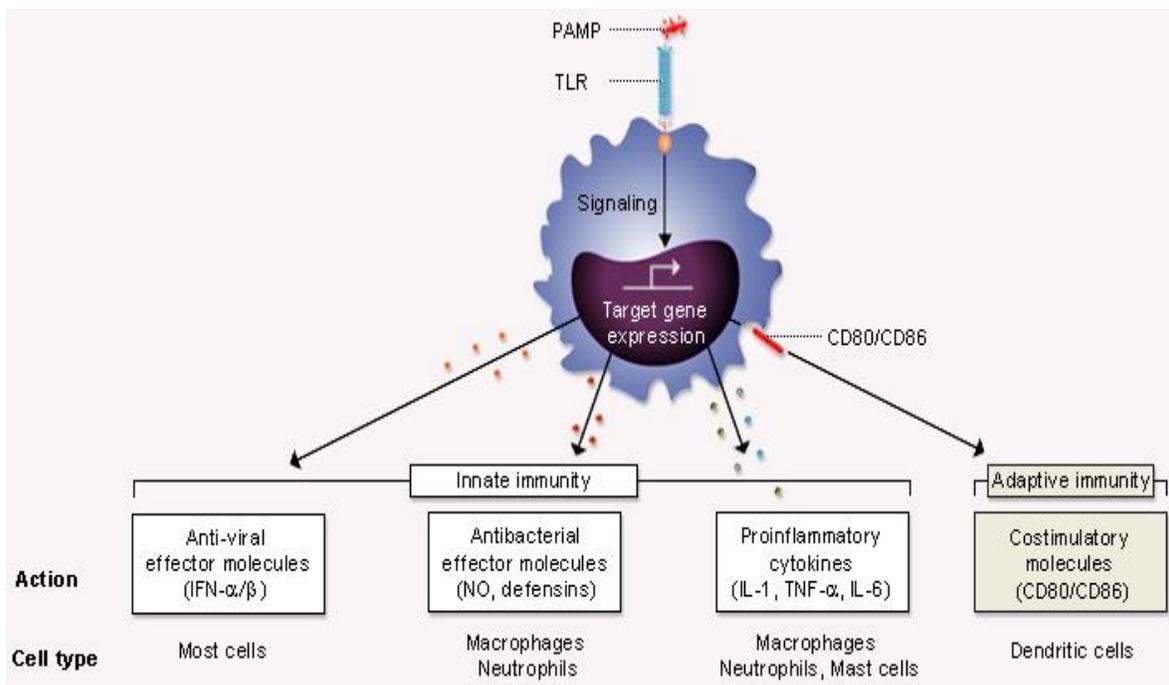


Figura 12.- Funciones principales de los TLRs (<http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3951&Menu=66&backbar=0>, consultado el día 20 de febrero del 2014).

## **12.1.- CASCADAS DE SEÑALIZACION ACTIVADAS POR TLRs DURANTE LA INFECCION POR DENV**

### **12.1.1.- VÍA DEL NF- $\kappa$ B**

El reconocimiento mediado por TLRs (excepto TLR-3) activa la vía del NF- $\kappa$ B por la unión de la molécula MyD88 (a través del dominio TIR de los TLRs), esta unión de MyD88 con TIR requiere de la proteína TIRAP (proteína adaptadora de TIR) en los TLR-2 y TLR-4, mientras que TLR-5, TLR-7 y TLR-9 reclutan a MyD88 de forma directa. Esta vía requiere el reclutamiento y la activación de IRAK4 y de TRAF6. Después de su unión con MyD88, IRAK4 activa a IRAK1 e IRAK2, estas interactuarán con TRAF6.

TRAF6 se une con el complejo de ubiquitinas E2 (que está compuesto por Ubc13 u Uev1A), que a su vez activa otro complejo formado por TAK-1 y las proteínas TAB (TAB1, TAB2 y TAB3). TAK1 activa a la fracción I $\kappa$  $\beta$  del complejo I $\kappa$ k (que consta de IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y NEMO). La activación del complejo IKK resulta en la fosforilación y degradación proteosomal de I $\kappa$  $\beta$ , permitiendo la liberación del NF- $\kappa$ B al núcleo, donde regulara la expresión de citocinas pro-inflamatorias como la IL-6, TNF- $\alpha$  y otras citocinas (figura 13) (Miyake, 2008; Thompson y cols., 2008; Lee y cols., 2012).

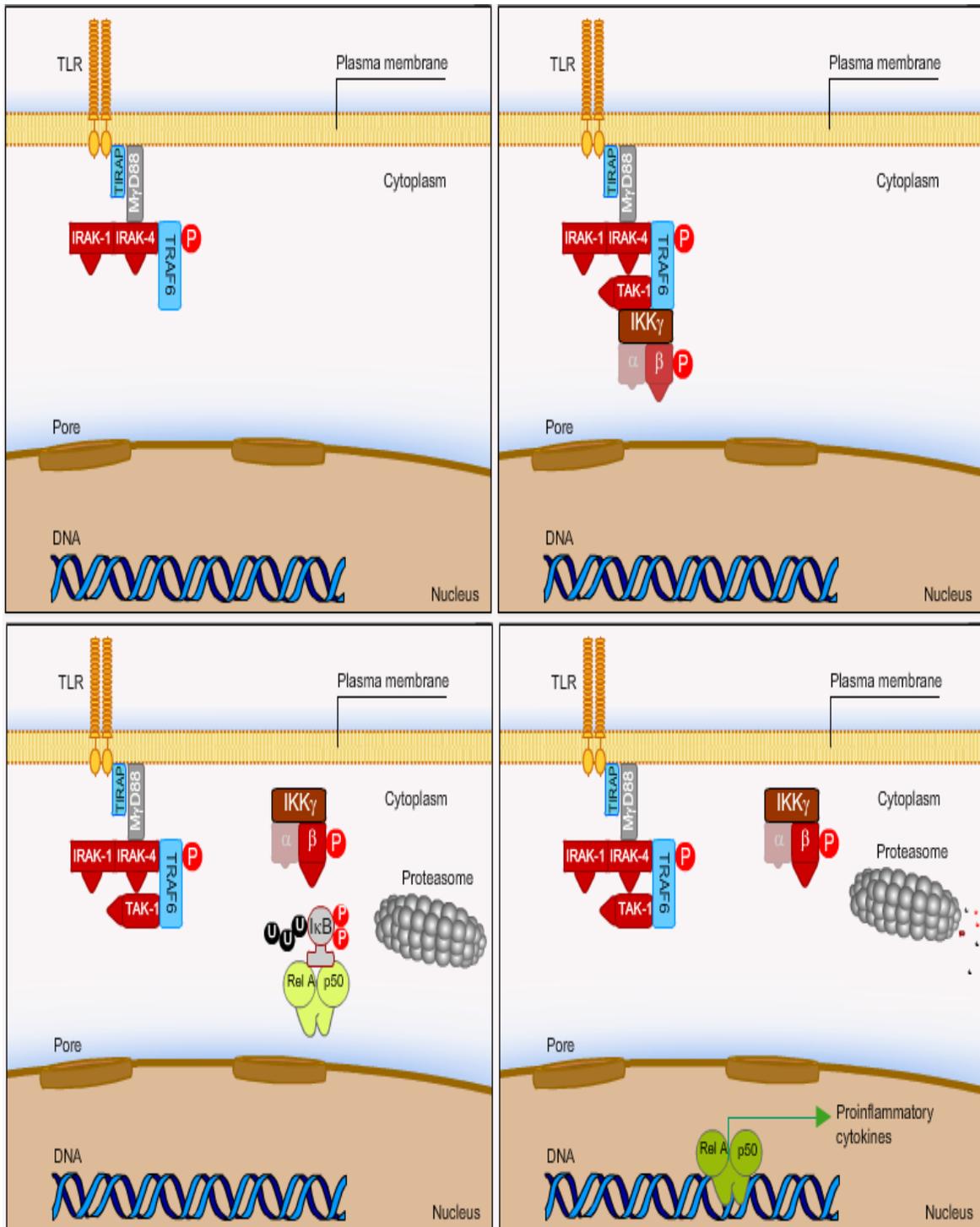


Figura 13.- Vía del NF-κB: Inicia con la unión de MyD88 con TIR y la fosforilación de las proteínas IRAK, estas interactúan con TRAF6. TRAF6 activa a TAK 1 que a su vez activa a la fracción IKβ, IKβ se degrada permitiendo la liberación y traslocación del NF-κB al núcleo dando lugar a la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de citocinas pro-inflamatorias. (Figura adaptada de: <http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3954& Menu=66&backbar=0>, consultado el día 05 de Marzo del 2014).

### **12.1.2.- VÍA DE LAS MAPK**

Los ligandos que activan la vía del NF- $\kappa$ B también activan la vía de las MAPK, la vía de las MAPK es activada por TLRs intra y extracelulares (TLRs superficiales: TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, y TLR-6, TLRs intracelulares: TLR-7, TLR-8 y TLR-9) excepto TLR-3. Esta es una vía dependiente de MyD88, es decir, necesita de esta molécula para la traducción de señales.

La activación es iniciada por la unión del TLR con MyD88, MyD88 se une con IRAK4 activando a IRAK1 e IRAK2, que a su vez interactúan con TRAF6, ocurre el reclutamiento y fosforilación de MEKK, esta a su vez fosforila a las proteínas MEKK3 y MEKK6, las cuales activan a la proteína MAP p38.

Una vez fosforilada, cambia su conformación lo que le permite translocar al núcleo, una vez en el núcleo fosforila y activa distintos factores de transcripción como son p53, Stat1, Pax6, entre otros, los cuales controlan la expresión de genes mediadores en la producción de citocinas, y la proliferación y diferenciación celular (figura 14) (Thompson y cols., 2008; Kawai y cols., 2010).

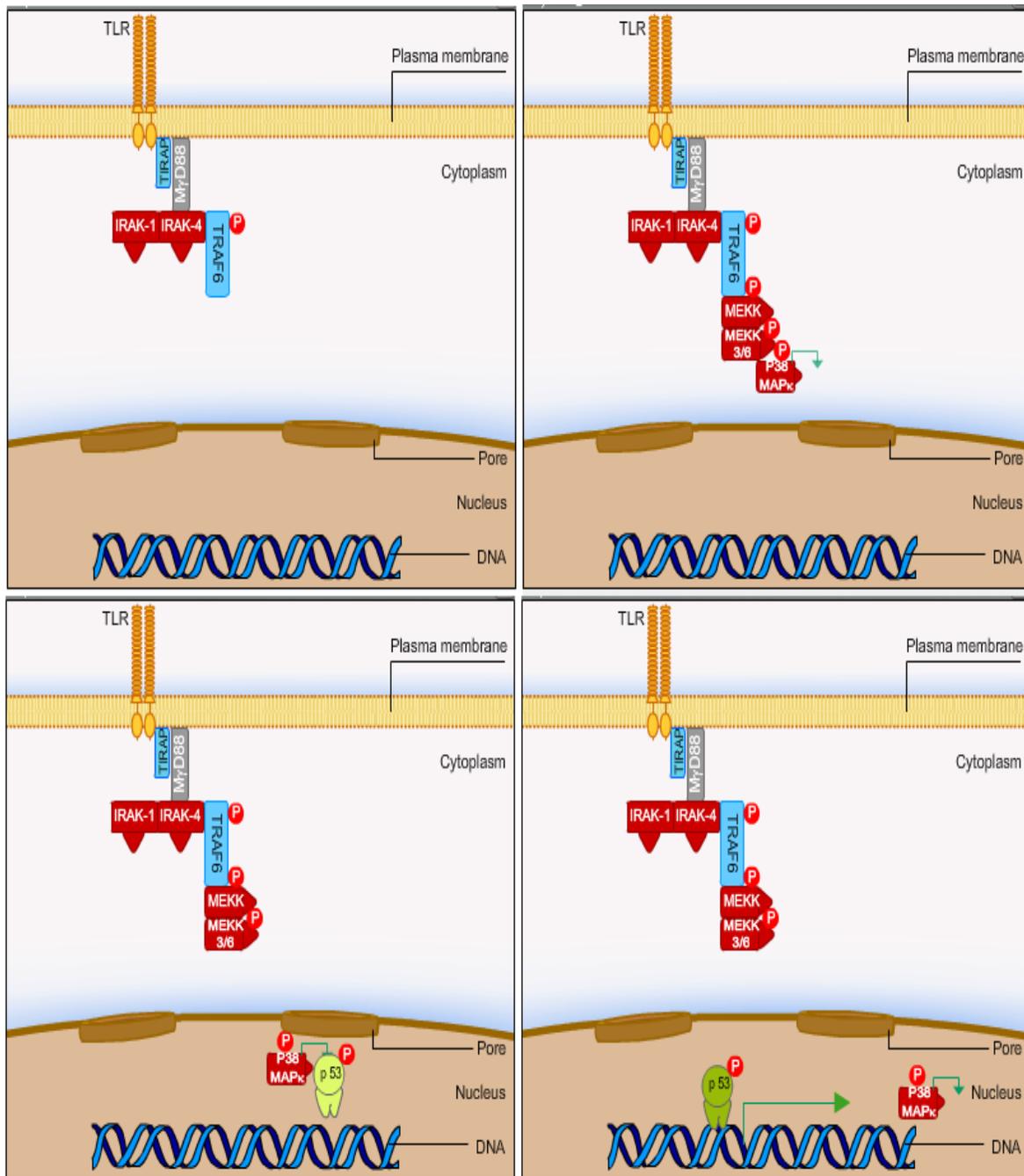


Figura 14.- Vía de las MAPK: Comienza con la unión de MyD88 con TIR y la fosforilación de las proteínas IRAK, estas interactúan con TRAF6. TRAF6 activa a las proteínas MEKK, las cuales fosforilan a la proteína MAPK p38, ocurre un cambio conformacional que permite su entrada al núcleo dando lugar a la activación de factores de transcripción que regulan la producción de citocinas, y la proliferación y diferenciación celular. (Figura adaptada de: <http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3954&Menu=66&backbar=0>, consultado el día 05 de Marzo del 2014).

### 12.1.3.- VÍA DE IRFs

El TLR-4 y los TLRs intracelulares TLR-3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9 son capaces de activar una vía de señalización que resulta en la activación de los IRF (factores reguladores del interferón), estos controlan la expresión de genes antivirales.

La vía de señales intracelulares está mediada por dos moléculas principales: MyD88 y TRIF. TLR-3 y TLR-4 poseen una vía de activación dependiente de TRIF, mientras que TLR-7, TLR-8 y TLR-9 comparten una vía distinta mediada por MyD88, esta induce la producción de IFN- $\alpha$  en células dendríticas plasmacitoides:

- Vía dependiente de MyD88: los TLRs intracelulares TLR-7, TLR-8 y TLR-9 son capaces de unirse directamente a MyD88, reclutando y activando el complejo IRAK. Esta activación fosforila y activa a TRAF-6 que a su vez fosforila a IRF7. Una vez activado, ocurre un cambio conformacional que expone una secuencia de localización nuclear.
- Vía dependiente de TRIF: esta vía es utilizada por el TLR-3 y TLR-4, TRIF recluta a IKK $\epsilon$ , que a su vez activa a TBK-1 (cinasa 1 de unión a TANK). IRF3 es activada por el complejo formado por TRIF/IKK $\epsilon$ /TBK-1, una vez fosforilada y activada ocurre un cambio conformacional que expone una secuencia de localización nuclear.

IRF3 e IRF7 translocan al núcleo donde se une a elementos de respuesta en los promotores de genes pro-inflamatorios, incluyendo IFN- $\beta$ , p35, IL-12, y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), entre otros (figura 15) (Leonard y cols., 2007; Matsumoto y cols., 2007; Kawai y cols., 2010).

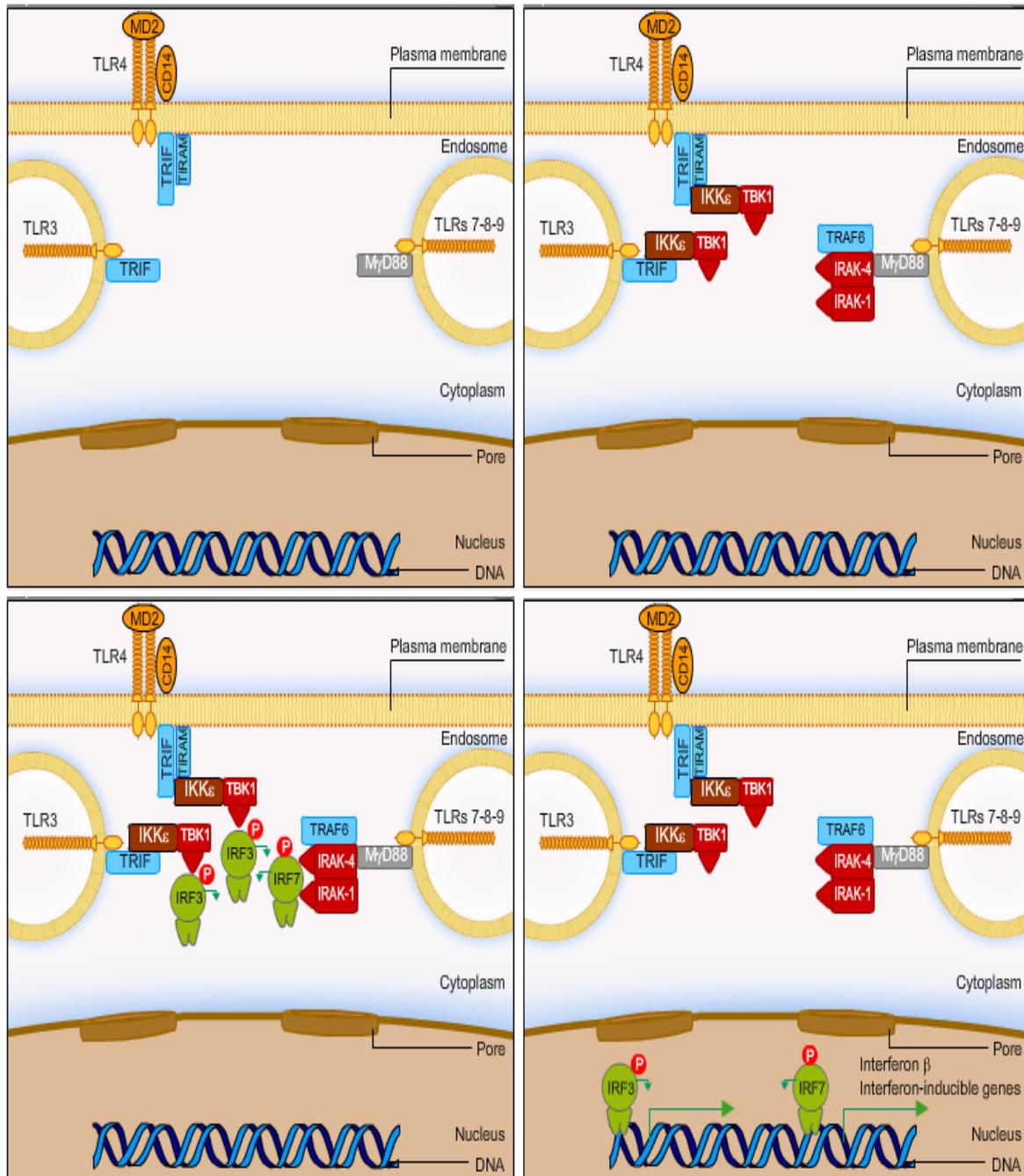


Figura 15.- Vía de IRFs: Se muestran dos vías que pueden activar esta cascada de señalización. Vía dependiente de MyD88: MyD88 activa al complejo IRAK, esta activación fosforila y activa a TRAF-6 que a su vez fosforila a IRF7. Una vez activado, ocurre un cambio conformacional que expone una secuencia de localización nuclear. Vía dependiente de TRIF: TRIF recluta a IKK $\epsilon$ , que a su vez activa a TBK-1, IRF3 es activada por el complejo TRIF/IKK $\epsilon$ /TBK-1, una vez activada ocurre un cambio conformacional que expone una secuencia de localización nuclear. IRF3 e IRF7 translocan al núcleo donde activan la expresión de factores de transcripción que darán lugar a la producción de Interferones. (Figura adaptada de: <http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3954&Menu=66&backbar=0>, consultado el día 05 de Marzo del 2014).

Los virus requieren de células intactas para poderse replicar, como se mencionó anteriormente, los DENV entran en la célula vía endocitosis mediada por receptor uniéndose al receptor DC-SIGN, después de este primer evento, el ciclo de replicación del virus continua con un cambio de pH en el endosoma lo que permite la fusión de las membranas y con esto el desnudamiento viral en el citoplasma y la subsecuente liberación del virus, comienza la síntesis de proteínas virales y la replicación, cuando el genoma viral es liberado para su replicación, es cuando el sistema inmune innato puede identificar al virus y montar una rápida respuesta antiviral. En el caso de los DENV, reconocerán el RNA viral conduciendo a una pronta acción antiviral, este reconocimiento se da a través de los TLRs, que se encuentran en los endosomas (TLR-3, TLR-7 y TLR-8). Durante la replicación viral, el virus a partir de su genoma (ssRNA), genera una forma replicativa (dsRNA) que le servirá como “molde” para generar nuevas copias de ssRNA, esta forma replicativa será reconocida específicamente por el TLR-3, mientras que los ssRNA generados y los intermediarios de replicación serán reconocidos por el TLR-7 y TLR-8. Los TLR-7 y TLR-8 son filogenéticamente muy cercanos, comparten regiones transmembranales similares y es probable que el reconocimiento se de manera conjunta (Diebold, 2008).

Actualmente hay pocos datos publicados acerca de la participación de estos receptores, y de que tanto su sobreexpresión influye en la patogénesis del virus. Se ha reportado el reconocimiento del virus por TLR-3, TLR-7 y RIG-1 (RLR citoplasmático) en células fagocíticas mononucleares (estas células son el blanco durante una infección natural), sin embargo, aún existe controversia acerca del papel que juega el reconocimiento innato durante una infección natural por DENV.

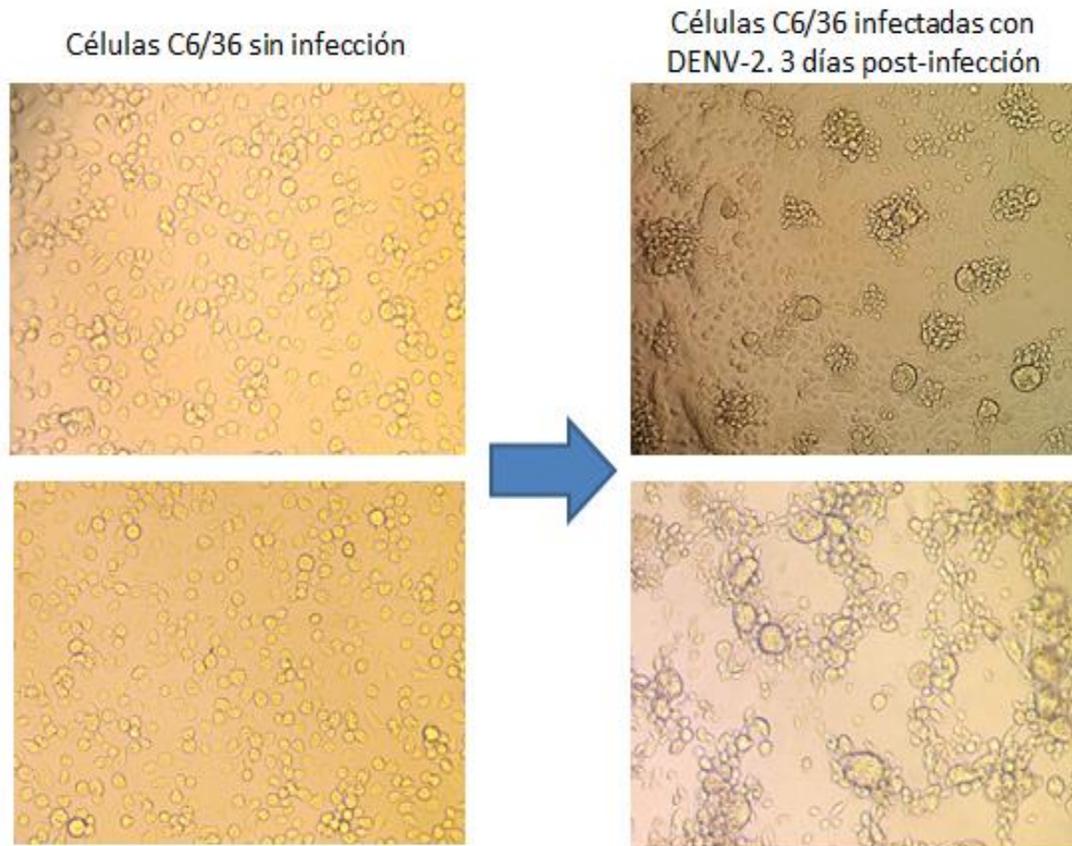
Para conocer el momento en el cual la replicación viral se encuentra en un pico máximo se utilizan cinéticas de infección. En las cinéticas de infección realizadas por distintos grupos de investigación (Tsai y cols. y Wang y cols.), se observó que el pico máximo ocurre 24 horas post-infección, este dato es muy importante ya que permite evaluar la participación de los TLRs durante la infección, los RNA

liberados y producidos durante el ciclo viral son reconocidos por los TLRs endosomales (TLR-3, TLR-7 y TLR-8).

Estudios realizados por Tsai y colaboradores en 2009 demuestran que existe una mayor expresión de los tres TLR en células infectadas. Específicamente, existe un aumento en TLR-3, este grupo demostró que en células HEK-293 transfectadas con TLR-3 existe un potente aumento de Interferones tipo 1, lo que inhibe la replicación viral. Wang y colaboradores en 2007 demostraron el reconocimiento del RNA viral por parte de los TLR7 y TLR-8 en células dendríticas, además observaron que la acidificación endosomal y la integridad estructural del RNA viral son fundamentales para el reconocimiento y para la producción de IFN- $\alpha$ .

Tsai y colaboradores demostraron que durante etapas tempranas de la infección existe una sobreexpresión de TLR-3, TLR-7 y TLR 8, lo que provoca un aumento en la producción de IL-8 casi 20 veces mayor a los valores basales, la respuesta más fuerte de IL-8 esta mediada por el TLR-3, lo que indica que el reconocimiento por este receptor juega un papel primordial en la infección por DENV.

TLR-3 reconoce dsRNA por lo que necesita que el virus se esté replicando, esto explica el hecho de durante los primeros días de la infección exista una fuerte acción antiviral por parte del hospedero, además de que la expresión de este receptor, disminuye de manera significativa el efecto citopático que provoca el DENV (figura 16).



**Figura 16.- Efecto citopático causado por la infección por DENV-2 en células C6/36. Del lado izquierdo se observan células en cultivo sin infección, mientras que del lado derecho se observa el efecto citopático causado por la infección por DENV-2 después de 3 días post-infección**

El reconocimiento por parte de TLR-7 y TLR-8 provoca una producción tardía de Interferones tipo 1, lo que indica que el primer reconocimiento se da a través del TLR-3, seguido del reconocimiento de TLR-7 y TLR-8 una vez que ya se haya dado una respuesta antiviral (Tsai y cols., 2009; Torres y cols., 2013).

Debido a que la sobre activación de estos tres TLRs provoca la activación de las cascadas de señalización antes mencionadas, existe una sobreproducción de diferentes citocinas pro-inflamatorias y de Interferones tipo 1, esto se le conoce como “tormenta de citocinas” y sus efectos son asociados con los signos de alarma de las formas graves de la enfermedad principalmente con la extravasación de plasma (De Kruif y cols., 2008; Tsai y cols., 2009).

El aumento de TNF- $\alpha$  y el IFN- $\alpha$  se ha propuesto como un indicador de la progresión del cuadro clínico, el aumento de IFN- $\alpha$  es indicativo de una respuesta innata antiviral por parte del hospedero, esto durante los primeros días de la infección resulta muy benéfico ya que inhibe la replicación viral y por ende el virus no puede infectar a células sanas.

La sobre expresión de estos TLRs endosomales provoca una producción excesiva de citocinas pro-inflamatorias. El aumento de los niveles de IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$  (pirógeno endógeno) durante las infecciones naturales por DENV inducen inflamación, además de inducir la síntesis de proteínas de fase aguda por parte de otras células que potencializan el efecto de la IL-1 y del TNF- $\alpha$ . (Takeushi y cols, 2010). La IL-8 es un poderoso inductor de permeabilidad vascular, mientras que la IL-6 es capaz de provocar un aumento en la producción de autoanticuerpos antiendotelio y antiplaquetas de forma sistémica o localizada, lo que provoca un aumento en la hemorragia. Además de la producción de estas citocinas, también existe una sobreproducción por iNOS la cual aunada a la sobre producción de TNF- $\alpha$  provoca daño al endotelio, llegando hasta la muerte apoptótica de las células endoteliales, lo que contribuye al incremento de la permeabilidad vascular. Este daño al endotelio también ha sido asociado a la activación del complemento contra proteínas del virus como es la NS1, además de los anticuerpos anti-NS1 (Avirutnan y cols., 2006; Pérez, 2010).

### **13.- OTROS RECEPTORES QUE PUEDEN RECONOCER A LOS DENV**

Es importante mencionar que la detección de los DENV también puede darse por otros receptores citosólicos como pueden ser los NLRs o los RLRs (Blasius y cols., 2010; Takeuchi y cols., 2010).

#### **13.1.- NLRs (Receptores tipo NOD)**

Constituyen una familia de receptores citosólicos que regulan la inflamación y la apoptosis. Están involucrados principalmente en el reconocimiento de bacterias y en el reconocimiento de los DAMPs, presentan los siguientes componentes:

- Una región rica en leucina, la cual reconoce al agente patógeno
- Un dominio NOD (dominio de oligomerización de unión a Nucleótido)
- Un dominio efector amino terminal el cual es el encargado de iniciar la cascada de señalización

Los NLRs están agrupados en diferentes subfamilias en base a su dominio efector: proteínas NOD, proteínas NALP, proteínas IPAF y proteínas NAIP.

Estos receptores están estrechamente relacionados con la activación de complejos multiproteicos citoplasmáticos denominados inflamomas, los cuales se encargaran de la maduración proteolítica de la IL-1 $\beta$ . Los PAMPs o DAMPs, y las citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18), estimulan la activación de NF- $\kappa$ B a través de sus respectivos receptores, conformando la primera señal para la activación del inflamosoma. El NLRP3 (proteína 3 de la familia de NLR) es el mejor caracterizado, puede reconocer a la forma replicativa (dsRNA) del DENV durante su ciclo de replicación. Esto promueve la síntesis de NLRP3, pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, y de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ , entre otras. Acto seguido se lleva a cabo la activación de la segunda señal, que permite el ensamblaje del inflamosoma NLRP3 o la formación del complejo NLRP3/ASC/Pro-

caspasa-1, para la activación de la caspasa-1, y finalmente la maduración proteolítica de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, que da origen a las formas biológicamente activas de IL-1 $\beta$  e IL-18. Ambas citocinas contribuyen al desarrollo y mantenimiento de la respuesta inflamatoria (figura 17) (Wu y cols., 2013).

Los TLRs y NLRs pueden actuar de forma sinérgica en la producción de citocinas pro-inflamatorias y producción de Interferones tipo I (Takeushi y cols., 2010).

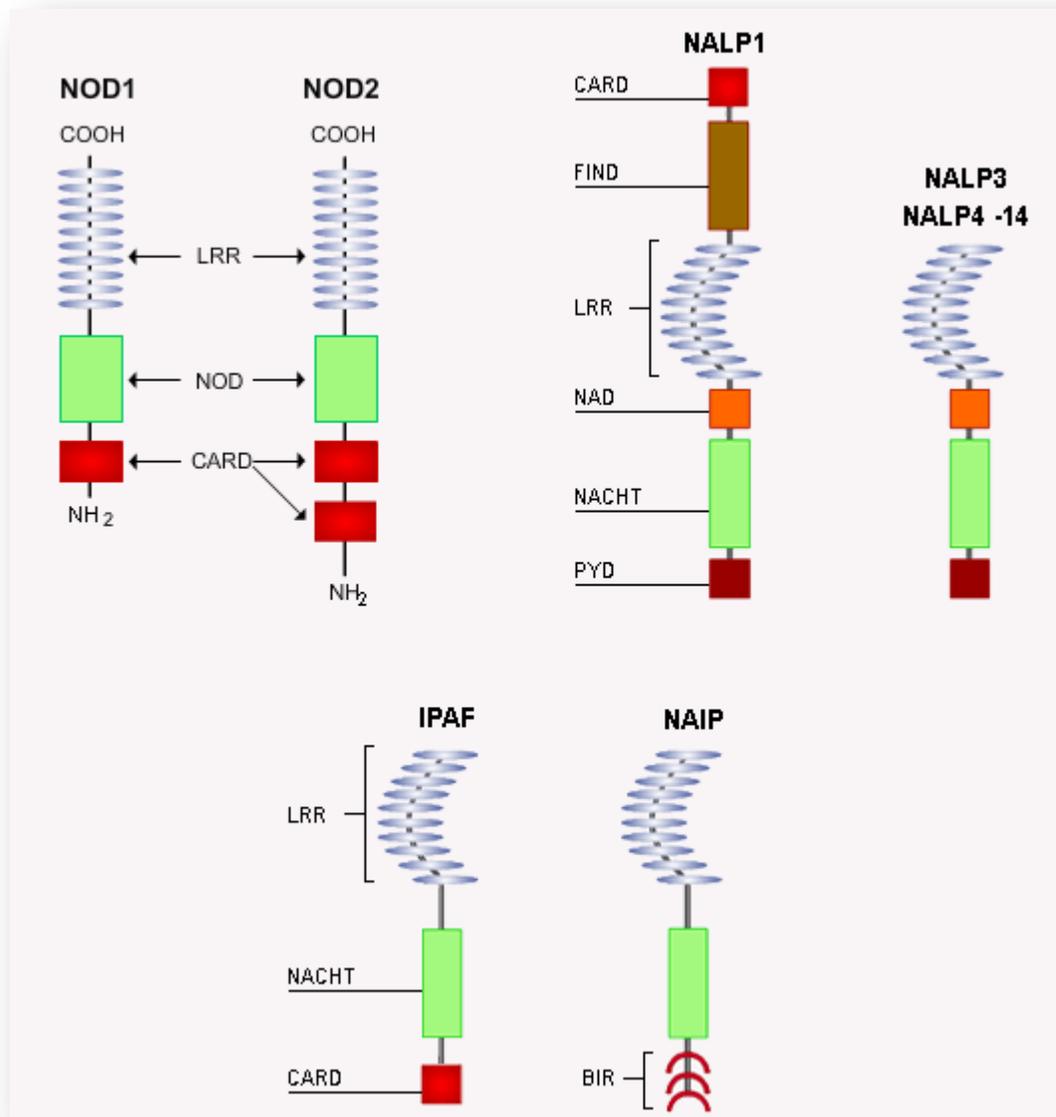


Figura 17.- Proteínas NOD, proteínas NALP, proteínas IPAF y proteínas NAIP, pertenecientes a la familia de los NLRs (Imagen adaptada de <http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3951&Menu=66&backbar=0>, consultado el día 20 de Marzo del 2014).

### **13.2.- RLRs (Receptores tipo RIG-I)**

Constituyen una familia de RNA helicasas citoplasmáticas que se encargan del reconocimiento de dsRNA, que generalmente son formas replicativas en los virus con RNA, son esenciales en el reconocimiento de virus en el citoplasma. Los RLRs incluyen a RIG-I y a MDA-5. Están formados por:

- Un dominio helicasa de unión a RNA
- Dos dominios CARD (dominio de reclutamiento y activación de caspasas)

El dominio helicasa se une al ligando mientras que los dominios CARD son los encargados de transmitir la señal, MDA-5 y RIG-1 reconocen diferentes virus de RNA por la detección de cadenas largas de dsRNAs y cadenas cortas de dsRNAs trifosfatados en el extremo 5´ respectivamente (figura 18).

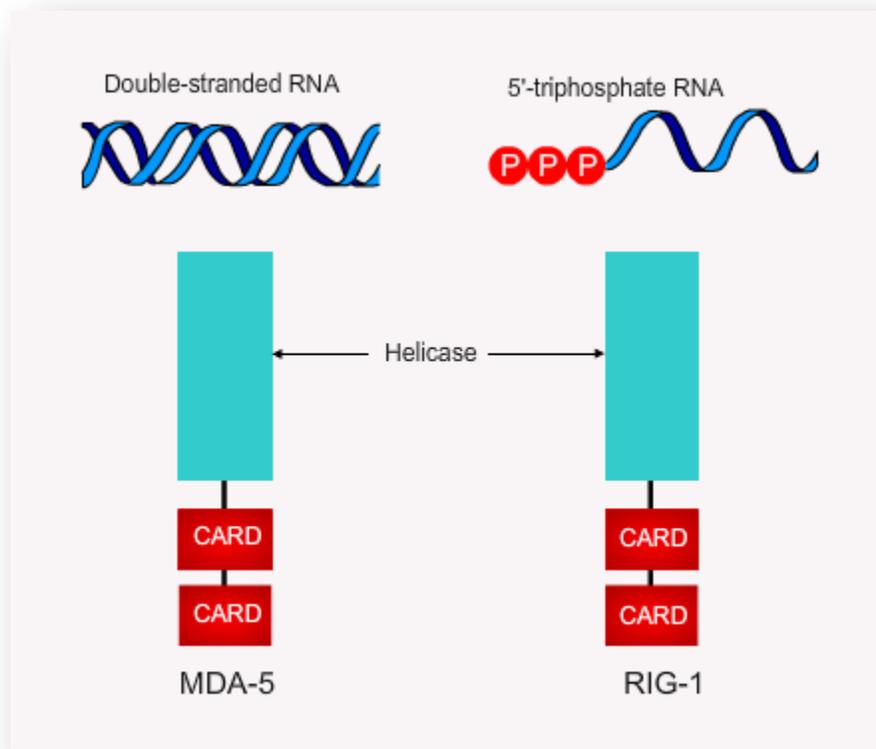


Figura 18.- Estructura de MDA-5 y RIG-1 con sus respectivos ligandos (<http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3951&Menu=66&backbar=0>, consultado el día 20 de Marzo del 2014).

Una vez dado el reconocimiento comienza la señalización a través de la interacción entre los dominios CARD y el extremo amino terminal de IPS-1 (estimulador 1 del promotor de interferón  $\beta$ ) también conocido como MAVS, VISA o CARDIF. Esta interacción resulta en la activación de IRF3 y de IRF7, los cuales darán lugar a la producción de IFN tipo I, cuando IPS-1 es ocupado por los RLRs también pueden activar las vía del NF- $\kappa$ B (figura 19) (Takeushi, y cols., 2010).

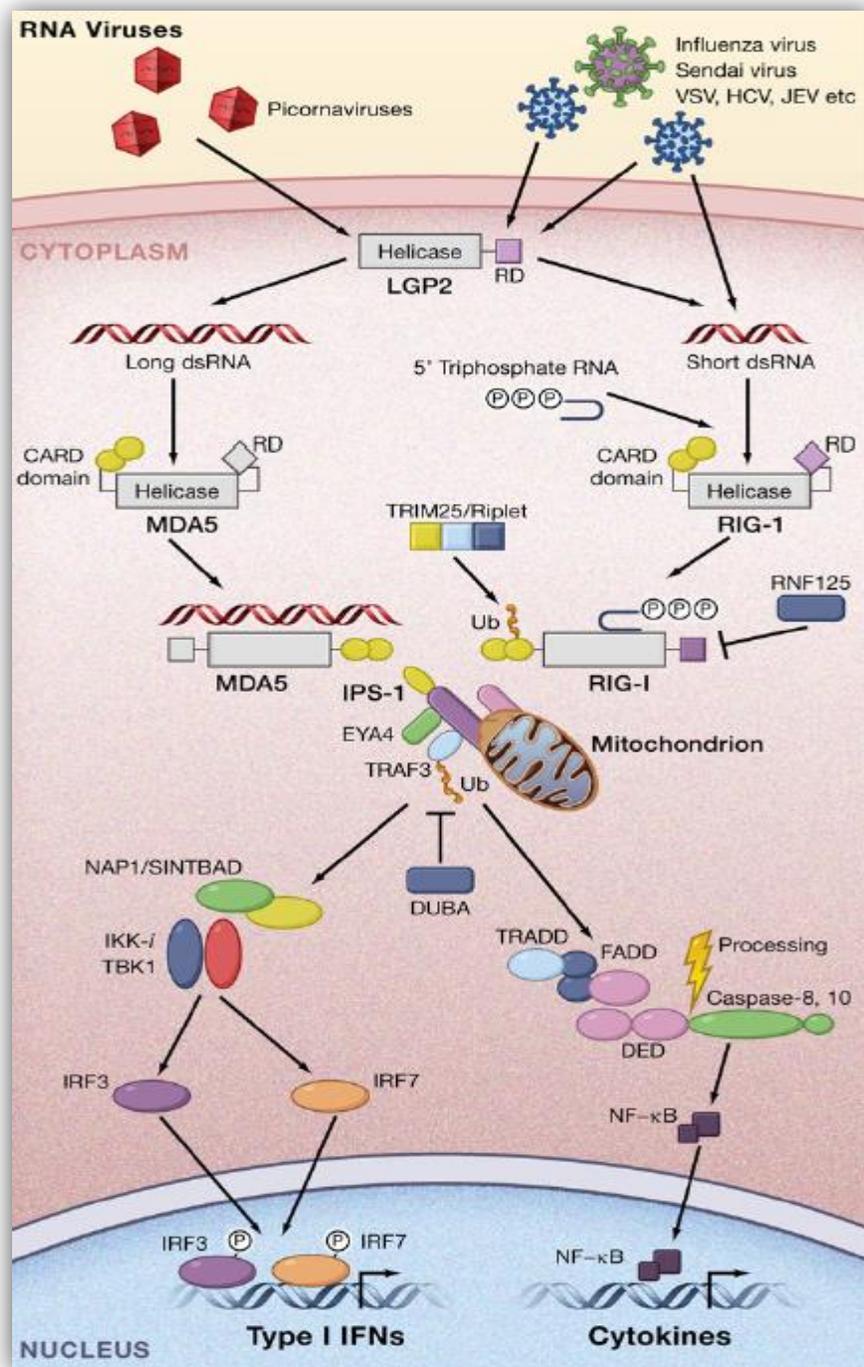


Figura 19.- Cascadas de señalización de IRFs y NF-κB. LGP2 (que forma parte de la familia de los RLRs) funciona como un regulador positivo en el reconocimiento por parte de RIG-1 y MDA-5, Interactúa con IPS-1 a través de sus dominios CARD. IPS-1 activa cascadas de señalización que conllevan a la expresión de genes para la producción de Interferones tipo I por la vía de EYA4, TRAF3, NAP1/SINTBAD, TBK1/IKK-i, e IRF3/7. IPS-1 además, induce la translocación del NF-κB al núcleo vía TRADD y FADD y caspasa 8/10. Un fragmento escindido de caspasa 8/10 es el responsable de la activación del NF-κB (Takeushi y cols., 2010).

## 14.- CONCLUSIONES

- Los TLR-3, TLR-7 y TLR-8 de células fagocíticas mononucleares reconocen los diferentes RNA de los DENV (ssRNA y dsRNA) generados durante su ciclo de replicación
- TLR-3 participa de manera activa durante la infección por DENV, resulta crucial para la respuesta innata antiviral, considerándose esencial para la producción de Interferones tipo I y en la producción de citocinas pro-inflamatorias.
- TLR-7 y TLR-8 muestran una producción tardía de moléculas antivirales, esto posiblemente a que la vía de activación sea distinta a la de TLR-3.
- Existe una respuesta inflamatoria antiviral debido al aumento de IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e Interferones tipo I.
- La rápida activación de la respuesta inmune innata del hospedero podría ser el paso limitante de la proliferación de la infección por DENV.
- Los TLRs no son los únicos receptores capaces de reconocer a los DENV, los RLRs y NLRs también juegan un papel importante aunque aún no muy claro durante la infección.

## 15.- REFERENCIAS

**Akira, S., Takeda, K. (2004).** Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499-511.

**Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., Thiemmecca, S., et al. (2006).** Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. *J Infect Dis.* **8**, 1078-1088.

**Blasius, A., Beutler, B. (2010).** Intracellular Toll-like receptors. *Immunity.* **32**, 305–315.

**Boonrat, T., Burgess, T., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., et al. (2003).** DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine* **197**, 823–829.

**Byrd, C., Dai, D., Grosenbach, D., Berhanu, A., Jones, K., et al. (2013).** A Novel Inhibitor of Dengue Virus Replication That Targets the Capsid Protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **57**, 15–25.

**Caballero, R., Torres, T., Chong, F., Pineda, A., Altuzar, M. y López, B. (2006).** Concepciones culturales sobre el dengue en contextos urbanos de México. *Rev. Salud Publica* **1**, 126-133.

**Cabrera, M., Muñiz, M., Hidalgo, J., Vega, L., Martín, M., Velasco, A., (2003).** The Retrieval Function of the KDEL Receptor Requires PKA Phosphorylation of Its C-Terminus. *Molecular Biology of the Cell.* **14**, 4114–4125.

**Chávez, D. (2007).** Receptores tipo Toll (Toll like receptors). *Revista Latinoamericana de Ectualidades Biomédicas.* **1**, 3-9.

**Christmas, P. (2010).** Toll like receptors: sensors that detect infections. *Nature Education*. **9**, 85-92.

**Clyde, K., Kyle, J., Harris, E. (2006).** Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*. **80**, 11418–11431.

**De Kruif, M., Setiati, T., Mairuhu, A., Koraka, P., Abersson, H., et al. (2008).** Differential Gene Expression Changes in Children with Severe Dengue Virus Infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. **2**, 1-9.

**Del Angel, R. (2006).** Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral. *Revista Cinvestav*. **3**, 38-43.

**Diamond, M. (2003).** Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunology and Cell Biology*. **81**, 196–206.

**Diebold, S. (2008).** Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **60**, 813–823.

**Dostert, C., Meylan, E., Tschopp, J. (2008).** Intracellular pattern-recognition receptors. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **60**, 830–840.

**Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Tangthawornchaikul, N., Malasit, P., Mongkolsapaya, J., Screaton, G. (2010).** Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proceedures of the National Academy of Sciences*. **107**, 16922-16927.

**De Silva, A. (2011).** The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses*. **3**, 2374-2395.

**Durán, C., Lanza, T., y Plata, J. (2010).** Fisiopatología y diagnóstico del dengue. *Rev Med Hondur.* **3**, 113-168.

**Fernandez, M., Mazzon, M., Jacobs, M., Amara, A. (2009).** Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe* **5**, 318-328.

**Gutsche, I., Coulibaly, S., Voss, J., Salmon, J., d'Alayer, J., Ermonval, M., et al. (2011).** Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **108**, 8003-8008.

**Gordon S (2002).** Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response., *Cell*, **111**, 927-930.

**Guzmán, M., Vázquez, S. (2010).** The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *Viruses.* **2**, 2649-2662.

**Halstead, S. B. (1988).** Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* **239**, 476-481.

**Halstead, S. B. (2003).** Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv. Virus Res.* **60**, 421-467.

**Hernández, J., Montoya, C., Urcuqui, S., (2007).** Papel de los Receptores Tipo Toll en las Infecciones Virales. *Biomédica.* **27**, 280-283.

**Huerta, A., Cabello, C., Cime, J., Monroy V., Manjarrez, M., Gutiérrez, M., Izaguirre, R., Ruiz, B. (2008).** Crosstalk between coagulation and inflammation during dengue virus infection. *Thromb Haemost.* **99**, 936–943.

**Kawai, T., Akira, S. (2010).** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* **11**, 373-384.

**Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. (2007).** *Inmunología de Kuby*. 6° Edición. México D.F.: Mc Graw Hill. 59-71.

**Lee, K., Xu, S., Kang, Z., Huo, J., Huang, M., Liu, D., Takeuchi, O., Akira, S., Lam, K. (2012).** Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response. *Proceedures of the National Academy of Sciences*. **107**, 5791-5796.

**Leonard, J., Ghirlando, R., Askins, J., Bell, J., Margulies, D., Davies, D., Segal, D. (2008).** The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proceedures of the National Academy of Sciences*. **105**, 258-263.

**Liang Z, Wu S, Li Y, He L, Wu M., Jiang, L., Feng, L., Zhang, P., Huang, X. (2011).** Activation of Toll-Like Receptor 3 Impairs the Dengue Virus Serotype 2 Replication through Induction of IFN- $\beta$  in Cultured Hepatoma Cells. *Plos One* **8**, 1-8.

**Lin, R., Yang, L., Nakhaei, Q., Sharif, E., Julkunen, I., Hiscott, J. (2007).** Negative Regulation of the Retinoic Acid-inducible gene I antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *J. Biol. Chemist.* **4**, 2095-2103.

**Lindenbach, B., Thiel, H., Rice, C. (2007).** *Flaviviridae*, the viruses and their replication. 5° Edición. Filadelfia, Estados Unidos de América: Lippincott-Raven Publishers. 1101-1151.

**Martinez, E. (2008).** Dengue. *Estudios Avanzados* **64**, 33-52.

**Matsumoto, M., Seya, T. (2008).** TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly (I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 805–812.

**Medzhitov, R. (2001).** Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135-145.

**Medzhitov, R., Pasare, C. (2005).** Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **560**, 11-18.

**Méndez, J., Huerta, J., Ovilla, R., Escobar, A. (2008).** Alergia, enfermedad multisistémica. México D.F.: Ed. Médica Panamericana. 19-35.

**Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. (2012).** Dengue, guía de manejo clínico. Asunción, Paraguay: Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. 4-18.

**Miyake, K. (2008).** Nucleic acid-sensing Toll-like receptors: Beyond ligand search. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **60**, 782–785.

**Modhiran, N., Kalayanarooj, S., Ubol, S. (2010).** Subversion of Innate Defenses by the Interplay between DENV and Pre-Existing Enhancing Antibodies: TLRs Signaling Collapse. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* **4**, 1-12.

**Mukhopadhyay, S., Kuhn, R., Rossmann, M. (2005).** A Structural Perspective of the Flavivirus Life Cycle. *Nature Reviews Microbiology.* **3**, 13-22.

**Navarro, E., Després P., Cedillo, L. (2005).** Innate Immune Responses to Dengue Virus. *Archives of Medical Research.* **36**, 425–435.

**Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. (2010).** Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control, La Paz, Bolivia: OPS/OMS. 3-170.

**Pérez, Y. (2010).** Papel del sistema inmune en la patogenia de la infección por virus del dengue. *Alergia, Asma e Inmunología pediátricas.* **19**, 22-29.

**Raetz, M., Kibardin, A., Sturge, C., Pifer, R., Li, H., Burstein, E., Ozato, K., Larin, S., Yarovinsky, F. (2013).** Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. *J Immunol.* **9**, 4818-4827.

**Ramírez, M., Velasco, H., Ramos C., Peñuelas, J., Maradiaga, M., Murillo, J., Rivas, R., Chaín, R. (2009).** Caracterización clínica y epidemiológica de los casos de dengue: experiencia del Hospital General de Culiacán, Sinaloa, México. *Rev. Panam. Salud Publica.* **1**, 16–23.

**Rodríguez, J., Belicha, A., Bernal, D., Ashour, J., Ayllon, J., y Fernández, A. (2010).** Inhibition of the Type I Interferon Response in Human Dendritic Cells by Dengue Virus Infection Requires a Catalytically Active NS2B3 Complex. *Journal of Virology* **84**, 9760–9774.

**Salvatella, R. (1996).** *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. *Rev Med Uruguay.* **12**, 28-36.

**Sariol, C., Martínez, M., Rivera, F., Rodríguez, I., Pantoja, P., Abel, C., et al. (2011).** Decreased Dengue Replication and an Increased Antiviral Humoral Response with the use of Combined Toll-Like Receptor 3 and 7/8 Agonists. *Plos One.* **6**, 1-9.

**Schmid, D., Munz, C. (2007).** Innate and Adaptive Immunity through Autophagy. *Immunity Elsevier Inc.* **27**, 11-21.

**Shi, Z., Cai, Z., Wen, S., Chen, C., Gendron, C., Sanchez, A., Patterson, K., Fu, S., Yang, J., Wildman, D., Finnell, R., Zhang, D. (2009).** Transcriptional Regulation of the Novel Toll-like Receptor TLR-13. *J Biol Chem.* **31**, 20540–20547.

**Shu, P., Chen, K., Chang, S., Yueh, Y., Chow, L., Chien, L., Chin, C., Lin, T., Huang, Y. (2000).** Dengue NS1-Specific Antibody Responses: Isotype Distribution and Serotyping in Patients With Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever. *Journal of Medical Virology* **6**, 224–232.

**Simmons, C., Halstead, S., Rothman, A. Harris, E., Screaton, G., Rico, R., Vaughn, D., Holmes, E., Guzman, M. (2006).** Understanding pathogenesis, immune response and viral factors. Geneva, Suiza: Research and Training in Tropical Diseases, World Health Organization. 1-9.

**Takeuchi, O., Akira, S. (2010).** Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* **140**, 805–820.

**Thompson, J., Akiko Iwasaki, A. (2008).** Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 786–794.

**Torres, S., Hernández, J., Giraldo, D., Arboleda, M., Rojas, M., Smit, J., Urcuqui, S. (2013).** Differential Expression of Toll-like Receptors in Dendritic Cells of Patients with Dengue during Early and Late Acute Phases of the Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* **7**, 1-11.

**Tsai, Y., Chang, S., Lee, C., y Kao, C. (2009).** Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cellular Microbiology* **11**, 604–615.

**Tuiskunen, B., Lundkvist, A. (2013).** Dengue viruses-an overview. *Infection Ecology and Epidemiology.* **3**, 19–40.

**Ubol, S., Halstead, S. (2010).** How Innate Immune Mechanisms Contribute to Antibody-Enhanced Viral Infections. *Clinical and vaccine immunology*. **17**, 1829–1835.

**Velandia, M., Castellanos, J. (2011).** Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. **1**, 33-43.

**Warrison A. Andrade, W., Souza, M., Martinez, E., Nagpal, K., Dutra, M., et al. (2013).** Combined action of Nucleic Acid-Sensing Toll-Like Receptors (TLRs) and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell Host Microbe*. **1**, 42–53.

**Wei, T., Gong, J., Rössle, S., Jamitzky, F., Heckl, W., Stark, R. (2011).** A leucine-rich repeat assembly approach for homology modeling of the human TLR5-10 and mouse TLR11-13 ectodomains. *J Mol Model*. **1**, 27-36.

**Wu, M., Chen, S., Hsieh, S. (2013).** Distinct regulation of dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophage subsets. *Journal of Biomedical Science*. **20**, 36-45.

**Yoneyama, M., Onomoto, K., Fujita, T. (2008).** Cytoplasmic recognition of RNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **60**, 841–846.

**Xagorari, A., Chlichlia, K. (2008).** Toll-Like Receptors and Viruses: Induction of Innate Antiviral Immune Responses. *The Open Microbiology Journal*. **2**, 49-59.

**Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M., Greenblatt, M., Bussey, C., Flavell, R., Ghosh S. (2004).** A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*. **5663**, 1522-1526.

## URL

Cell Signal. Toll Like Receptor Signaling. Consultado el día 03 de Marzo del 2014. Disponible en: [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/pdf/Toll\\_Like.pdf](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/pdf/Toll_Like.pdf).

Institut Pasteur. Innate immunity. Consultado el día 18 de Febrero del 2014. Disponible en: <http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3945&Menu=66&backbar=0>.

Institut Pasteur. Innate immunity. Pattern Recognition Receptors. Consultado el día 18 de Febrero del 2014. Disponible en: <http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3945&Menu=66&backbar=0>.

Institut Pasteur. NOD like Receptors. Consultado el día 20 de Marzo del 2014. Disponible en: <http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3945&Menu=66&backbar=0>.

Institut Pasteur. RIG-I like Receptors. Consultado el día 20 de Marzo del 2014. Disponible en: <http://ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx?Page=3945&Menu=66&backbar=0>.

Nature education. The discovery of microbial-sensing proteins called Toll-like receptors is transforming our understanding of the body's response to infection. Consultado el día 10 de Marzo del 2014. Disponible en: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/toll-like-receptors-sensors-that-detect-infection-14396559#>.

SABiosciences. Toll-like Receptors and Innate Immunity. Consultado el día 04 de Marzo del 2014. Disponible en: <http://www.sabiosciences.com>.

Secretaría de Salud. Información epidemiológica del virus del dengue 2013. Consultado el día 10 de enero de 2014. Disponible en: **[http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS\\_2013/Pano\\_dengue\\_sem52\\_sem2013.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2013/Pano_dengue_sem52_sem2013.pdf)**.

Secretaría de Salud. Información epidemiológica del virus del dengue 2013. Consultado el día 10 de enero de 2014. Disponible en: **[http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS\\_2014/panodengue\\_sem\\_08\\_2014.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2014/panodengue_sem_08_2014.pdf)**.

University of Florida. Invasion Biology of Aedes alpopictus. Consultado el 15 de noviembre de 2013. Disponible en: **<http://fmel.ifas.ufl.edu/research/exotic.html>**.