



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PARTICIPACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES EN LA
NEUROPATHOGENESIS DURANTE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DENGUE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Q. ANDREA CATALINA RODRÍGUEZ MURCIA

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. BLANCA HAYDÉ RUIZ ORDAZ
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

COMITÉ TUTOR:
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

DR. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS
[Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2017



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.

*“La imaginación es más importante que el conocimiento.
El conocimiento es limitado y la imaginación circunda el mundo.”*

Albert Einstein, 1926

Agradecimientos

A la Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz, mi tutora de tesis de maestría, por su direccionamiento y acompañamiento en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Verónica Monroy quien, al ser la Técnico Académica de la Dra. Blanca Ruiz, me apoyó en todos los procesos experimentales, específicamente en cultivo celular, manejo de ratones, citometría de flujo, extracción de vesículas extracelulares y buenas prácticas de laboratorio.

A la Dra. Beatriz Gomez Gonzalez de la Universidad Autónoma Metropolitana, experta en barrera hematoencefálica, quien nos permitió utilizar su modelo para análisis de permeabilidad in-vivo.

A la Bióloga Experimental Jessica Janeth Avilez Avilez, por su apoyo y acompañamiento en los análisis de permeabilidad de Barrera hematoencefálica in-vivo.

Al Q.F.B Carlos Castellanos Barba, por su acompañamiento y capacitación en los análisis de citometría de flujo.

A los Maestros en Ciencias, Jessica Mateos Rodríguez y Pedro Pablo Martínez Rojas, por su asesoramiento en la extracción de vesículas extracelulares.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca completa para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para participar en el ZIBI 2017 Summer School en interacción patógeno – hospedero.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN212014 por los recursos para la realización del proyecto.

Al Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecemos LABNALCIT-IIBM-UNAM (CONACYT) por el soporte técnico en los ensayos de citometría de flujo.

Lista de Abreviaturas

ADE	Amplificación dependiente de anticuerpos facilitadores
AJ	Uniones adherentes
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BHE	Barrera hematoencefálica
cISF	Virus clásicos específicos de insectos
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DENV	Virus del Dengue
DENV-2 NGC	Virus del Dengue serotipo 2 cepa Nueva Guinea C
DG	Dengue grave
dISF	Virus específicos de insectos de doble huésped
EAPs	Proteínas accesorias de endocitosis
ESCRT	Completo de clasificación endosomal requerido para transporte
FD	Fiebre por Dengue
FHD	Fiebre hemorrágica por Dengue
FITC	Isocianato de Fluoresceína
FS	Fosfatidilserina
GAG	Glucosaminoglucano
HBEC-5i	Células endoteliales humanas de cerebro
IC	Intracraneal
ICAM-1	Molécula de adhesión endotelial 1
IP	Intraperitoneal
ISF	Virus específicos de insectos
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
kb	Kilobases
MMP	Metaloproteasas de matriz
MOI	Multiplicidad de infección
MP	Micropartículas
MPE	Micropartículas endoteliales
MPEb	Micropartículas endoteliales producidas sin estímulo
MPE-DENV	Micropartículas endoteliales derivadas de células infectadas con DENV
MVB	Cuerpos multivesiculados
NKV	Sin vector conocido
NS	No estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
PECAM-1	Molécula de adhesión plaquetaria - endotelial 1
PI	Post-infección
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCD	Síndrome de choque por Dengue
SFB	Suero fetal bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TF	Factor tisular
TJ	Uniones estrechas

TLR	Receptores tipo Toll
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
UFP	Unidades formadoras de placa
URF	Unidades relativas de fluorescencia
UTR	Región no traducida
VE	Vesículas extracelulares
VRS	Espacio de Virchow-Robin
WNV	Virus del Nilo Occidental

Contenido

Resumen.....	9
Abstract	10
Introducción	11
1. El Dengue	11
1.1. Epidemiología.....	11
1.2. Transmisión	12
1.3. El virus Dengue.....	13
1.3.1. Clasificación.....	13
1.3.2. Estructura viral	15
1.3.3. Replicación	17
1.4. Manifestaciones clínicas.....	19
1.4.1. Fase febril	21
1.4.1. Fase crítica.....	21
1.4.2. Fase de recuperación o convalecencia.....	22
1.5. Patogénesis del Dengue grave	22
Antecedentes	24
1. Dengue en el Sistema Nervioso Central.....	24
1.1. Epidemiología.....	24
1.2. Manifestaciones neurológicas.....	25
1.2.1. Encefalopatía.....	25
1.2.2. Encefalitis	25
1.2.3. Síndrome de Guillain-Barré	26
1.2.1. Encefalomiелitis aguda diseminada.....	26
2. Componentes celulares del Sistema Nervioso Central	26
2.1. Unidad neurovascular	27
2.1.1. Barrera Hematoencefálica	28
3. Neuropatogénesis	30
3.1. Neuroinflamación.....	33
4. Activación de células endoteliales de la barrera hematoencefálica	36
4.1. Vesículas extracelulares	37
4.1.1. Micropartículas endoteliales.....	37
5. Modelos de estudio.....	39

Planteamiento del Problema	41
Hipótesis.....	42
Objetivos	42
1. Objetivo General	42
2. Objetivos específicos.....	42
Diseño Experimental	43
Materiales y Métodos	44
1. Cultivo celular.....	44
2. Amplificación, obtención y titulación del virus Dengue.....	44
3. Análisis de infección de células endoteliales humanas de cerebro (HBEC-5i).....	45
4. Activación de HBEC-5i por estimulación con virus Dengue	45
5. Cinética de producción de micropartículas endoteliales derivadas de HBEC-5i.....	46
6. Análisis de micropartículas endoteliales por citometría de flujo.....	46
7. Cuantificación de permeabilidad de barrera hematoencefálica in-vivo.....	47
7.1. Estandarización de condiciones	47
7.2. Cuantificación de permeabilidad de barrera hematoencefálica en diversas condiciones	47
Resultados	49
1. Amplificación, obtención y titulación del virus Dengue.....	49
2. Infección de HBEC-5i	50
3. Activación de HBEC-5i por estimulación con virus Dengue	51
4. Cinética de producción de micropartículas endoteliales derivadas de HBEC-5i.....	53
5. Análisis de micropartículas endoteliales por citometría de flujo.....	55
6. Cuantificación de permeabilidad de barrera hematoencefálica in-vivo.....	56
6.1. Estandarización de condiciones	56
6.2. Cuantificación de permeabilidad de barrera hematoencefálica en diversas condiciones	60
Discusión	64
Conclusiones	70
Perspectivas	71
Referencias.....	72

Resumen

El Dengue tiene un espectro clínico muy amplio que va desde una infección inaparente, que generalmente se autolimita, hasta las formas graves como el síndrome de choque por Dengue, la fiebre hemorrágica por Dengue y el Dengue con afectación grave de órganos, que incluye nefritis, carditis y afectación al sistema nervioso central (SNC). Estas formas en su conjunto, actualmente se conocen como Dengue grave (DG). Como las manifestaciones neurológicas asociadas al Dengue no se consideran comunes, su incidencia se ha subestimado dificultando su diagnóstico. Aun así, se han encontrado partículas virales y genoma viral en el cerebro de casos fatales, indicando que el virus del Dengue (DENV) es neurotrópico. El proceso por el cual el DENV llega al SNC, aún se desconoce, pero la mayoría de hipótesis que se proponen se basan en el transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Esta barrera separa la sangre del cerebro y está conformada por varios tipos celulares, principalmente, por células endoteliales. Cuando estas células entran en contacto con el DENV, se activan y generan diversos productos, entre ellos, vesículas extracelulares (VE). El número de VE liberadas por estas células aumenta en condiciones de activación. Las micropartículas (MP), que son un tipo de VE, han sido propuestas como indicadores de riesgo involucrados en el establecimiento del DG y como biomarcadores en desórdenes del SNC. Teniendo en cuenta que tejido endotelial, como el de la BHE, se ve altamente afectado en los casos de DG, podría proponerse que las MP provenientes de estas células podrían tener algún papel importante en la neuropatogenia durante la infección por DENV. Con base en lo anterior, en este estudio se evaluó si las micropartículas endoteliales derivadas de células de BHE infectadas con DENV (MPE-DENV) podrían incrementar la permeabilidad de la BHE, lo que podría tener un papel importante en el desarrollo de las manifestaciones graves de la enfermedad.

Para esto, células endoteliales de BHE (HBEC-5i) fueron activadas e infectadas con DENV. Las MP generadas (MPE-DENV) fueron caracterizadas por la presencia de fosfatidilserina (FS) y PECAM-1. Las MPE-DENV fueron inoculadas por vía IP en ratones jóvenes Balb/c. La permeabilidad de la BHE fue cuantificada por extravasación de los trazadores Na-FITC y Azul de Evans hacia el cerebro, evaluando su concentración en cerebelo, corteza y áreas subcorticales.

Encontramos que las células HBEC-5i son susceptibles a infección con DENV, lo que se observó a 96 h PI con MOI de 1 y 5. Las células endoteliales infectadas con DENV sobre expresaron ICAM-1 a las 24 horas PI como consecuencia de su activación, generando MPE-DENV. La mayor cantidad de MPE-DENV generadas por el estímulo específico del DENV se observó a las 24 horas PI, cuando también se detectó mayor cantidad de fosfatidilserina en su superficie, a diferencia de las MP derivadas de células sin infectar (MPEb) o MP producidas bajo otras condiciones. Así mismo, se encontró PECAM-1 en la superficie de las MP en todas las condiciones evaluadas. Los ratones inoculados con MPE-DENV presentaron un aumento significativo de la permeabilidad de BHE para ambos trazadores en cerebelo y áreas subcorticales a los 5 días PI. En la corteza cerebral, se generó mayor permeabilidad a los 10 días PI indicando que hay diferencias regionales en la permeabilidad de la BHE in-vivo. Las MPEb no generaron cambios de permeabilidad en comparación con los controles, por lo que el efecto observado con las MPE-DENV es debido a su origen como productos de la activación con DENV. El DENV por sí solo, no causó un incremento en la permeabilidad tan elevado como el observado con las MPE-DENV, por lo que se propone que las MPE-DENV, por sí, podrían ser un mecanismo eficiente durante el incremento de permeabilidad de la BHE, presente en los casos de DG con afectación al SNC.

Abstract

Dengue has a very broad clinical spectrum ranging from an unapparent infection, which is usually self-limited, to severe forms such as Dengue shock syndrome, Dengue hemorrhagic fever and Dengue with severe organ impairment, including nephritis, carditis and involvement of the central nervous system (CNS). These forms, are now known as severe Dengue (SD). As the neurological manifestations associated with Dengue are not considered common, their incidence has been underestimated, making it difficult to diagnose them. Even so, viral particles and viral genome have been found in the brain of fatal cases, indicating that the Dengue virus (DENV) is neurotropic. The process by which DENV reaches the CNS is still unknown, but most hypotheses proposed are based on transport through the blood-brain barrier (BBB). This barrier separates the blood from the brain and is made up of several cell types, mainly by endothelial cells. When these cells come into contact with DENV, several activation products are generated, including extracellular vesicles (EV). The number of EV released by these cells increases under activation conditions. Microparticles (MP), which are a type of VE, have been proposed as risk indicators involved in the establishment of the SD and as biomarkers in CNS disorders. Considering that endothelial tissue, such as BBB endothelial cells, is highly affected in cases of SD, it could be proposed that MP from these cells could play an important role in the neuropathogenesis during DENV infection. Based on the above, in this study we evaluated whether endothelial microparticles derived from BHE cells infected with DENV (MPE-DENV) could increase the permeability of BBB, which could play an important role in the establishment of the CNS manifestations.

With this aim, BBB endothelial cells (HBEC-5i) were activated and infected with DENV. The MP generated (MPE-DENV) were characterized by the presence of phosphatidylserine (FS) and PECAM-1. MPE-DENV were inoculated via IP in young Balb/c mice. The permeability of the BBB was quantified by extravasation of Na-FITC and Evans Blue tracers to the brain, evaluating their concentration in cerebellum, cortex and subcortical areas.

We found that HBEC-5i cells are susceptible to infection with DENV, which was observed at 96 h PI with MOI of 1 and 5. Endothelial cells infected with DENV over expressed ICAM-1 at 24 hours PI as a consequence of its activation, generating MPE-DENV. The highest amount of MPE-DENV generated by the specific stimulation of DENV was observed at 24 hours PI, when a greater amount of phosphatidylserine was also detected on its surface, unlike MP derived from uninfected cells (MPEb) or MP produced under other conditions. Likewise, PECAM-1 was found on the surface of the MP in all the conditions evaluated. Mice inoculated with MPE-DENV showed a significant increase in BBB permeability for both tracers in the cerebellum and subcortical areas at 5 days PI. In the cerebral cortex, greater permeability was generated at 10 days PI indicating that there are regional differences in the permeability of BBB in-vivo. The MPEb did not generate permeability changes in comparison with control mice, so the effect observed with the MPE-DENV is due to their origin as products of activation with DENV. The DENV itself, did not cause an increase in the permeability as high as that observed with the MPE-DENV, so we proposed that the MPE-DENV, by themselves, could be an efficient mechanism during the increase in the permeability of the BBB, as observed in SD cases with involvement of CNS.

Introducción

1. El Dengue

1.1. Epidemiología

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquito de mayor expansión a nivel mundial. Durante los últimos 50 años, el número de casos se ha incrementado considerablemente, debido principalmente a la migración de poblaciones, comercio internacional, amplia distribución del vector, cambio climático, entre otros (figura 1). Aunque el virus dengue (DENV) fue aislado por primera vez en 1943 durante la Segunda Guerra Mundial, donde el Dengue fue una de las mayores causas de mortalidad entre los soldados japoneses y estadounidenses, se reconoce su existencia desde hace 2000-4000 años debido a casos reportados en pequeñas poblaciones rurales de Asia (Gubler, Ooi, Vasudevan, & Farrar, 2014). Como se mencionó, con el incremento en la migración de poblaciones, las personas infectadas empezaron a viajar a las grandes ciudades generando así la diseminación del DENV. En 1977 se reportaron epidemias con manifestaciones similares a las del Dengue en Asia, África y Norte América, e incluso antes de esta fecha, en 1963, se reportó un brote epidémico en las Indias Orientales Francesas. Esto sugiere que el Dengue, o una enfermedad con manifestaciones patológicas muy similares, tuvo una amplia distribución geográfica incluso antes del S. XVIII (Gubler, 2014).

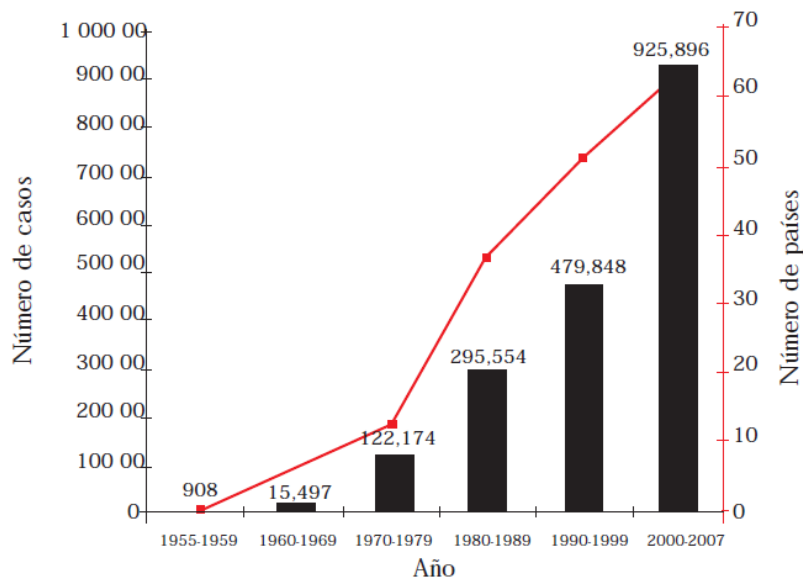


Figura 1. Número promedio anual de casos de fiebre por Dengue (FD) y fiebre hemorrágica por Dengue (FHD) reportados a la OMS y de los países que reportan Dengue, 1955–2007 (Organization et al., 2009).

Se estima que actualmente 3.6 billones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad, ya que viven o viajan a zonas endémicas tanto de circulación del DENV, como de mosquitos transmisores (figura 2). Anualmente, se presentan aproximadamente 390 millones de casos, de los

cuales 96 millones presentan síntomas y entre 2.4 y 9.6 millones desarrollan las formas más severas de la enfermedad (Gubler et al., 2014).

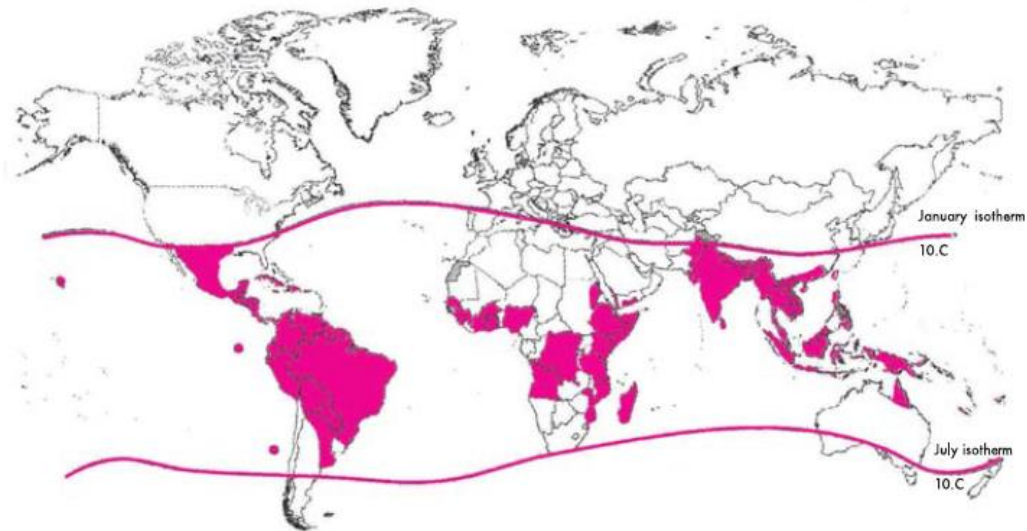


Figura 2. Áreas en riesgo de transmisión de Dengue, 2008 (Organization et al., 2009).

En los últimos 30 años, se han reportado brotes epidémicos en la mayoría de países de América. Entre 1981 y 2012 el Dengue, en sus formas severas, ha sido considerado como endémico en el continente americano, ya que ha habido un creciente reporte de casos incluso en Estados Unidos. Para el caso de México, durante el 2015 se reportaron 26665 casos confirmados de Dengue y 2790 casos hasta la semana epidemiológica 16; mientras que para la semana epidemiológica 16 del 2016, se reportaron 3160 casos de los cuales 824 evolucionaron a formas severas. En el estado de Guerrero, es donde la incidencia de la enfermedad es la más elevada, ya que se presentan 21.46 casos por cada 100.000 habitantes (Epidemiología, 2016).

1.2. Transmisión

El Dengue es ocasionado por la infección con DENV, que se mantiene en la naturaleza, principalmente en un ciclo urbano epidémico en el cual el huésped principal es el ser humano, y el vector principal es el mosquito *Aedes aegypti* (figura 3.A). Existen otros vectores secundarios como el *A. albopictus* o el *A. africanus* que generalmente participan en ciclos enzoóticos o selváticos de transmisión, en los cuales los huéspedes principales son primates no-humanos y ocasionalmente, pueden infectar a seres humanos ampliando el ciclo de infección enzoótico al urbano (figura 3.B).

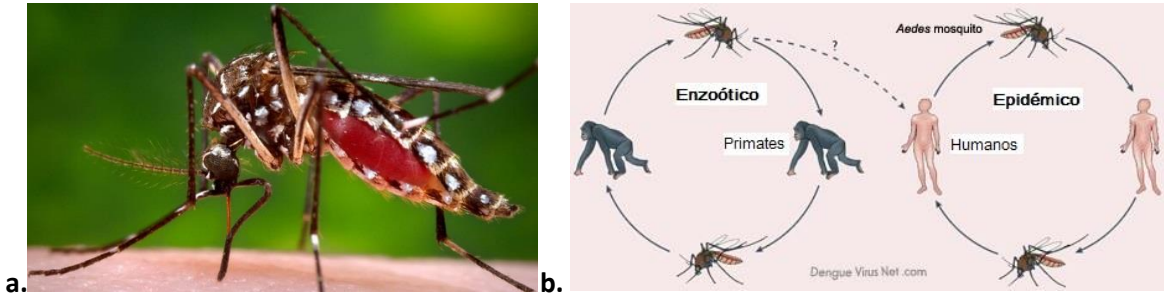


Figura 3. A. *Aedes aegypti*. **B.** Transmisión de los virus del Dengue. Mosquitos del género *Aedes* transmiten el virus de primates infectados a primates sanos durante el ciclo enzoótico. Cuando estos mosquitos se alimentan de seres humanos, transmiten la infección hacia un entorno urbano ampliando el ciclo a epidémico (Whitehead, Blaney, Durbin, & Murphy, 2007).

Cuando un ejemplar hembra de estas especies de mosquitos se alimenta de un ser humano en estado de viremia, puede infectarse y replicar el virus en su interior durante 8-10 días (período de incubación extrínseca). Este mosquito, al alimentarse de otro ser humano sano, puede transmitirle el virus.

Estos mosquitos generalmente viven en áreas tropicales y subtropicales del mundo, pero se han reportado migraciones a zonas más frías en época de verano. Aunque los mosquitos mueren al llegar el invierno, pueden transmitir el virus a las personas de las áreas en las que se encuentren, aumentando así la extensión de las zonas endémicas de la enfermedad (Organization et al., 2009).

1.3. El virus Dengue

El virus que causa la enfermedad del Dengue se conoce como "Virus Dengue" o DENV por sus siglas en inglés. En su estado maduro presenta una envoltura lipídica icosaédrica de aproximadamente 50nm de diámetro que recubre una nucleocápside que contiene una molécula de RNA monocatenario de sentido positivo.

1.3.1. Clasificación

El DENV está clasificado dentro del género *Flavivirus*: el más representativo de la familia *Flaviviridae*. Esta familia comprende 4 géneros conocidos: los *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* y *Flavivirus* ("*Virus Taxonomy: 2014 release*," 2015). Éste último comprende aproximadamente el 85% de las especies conocidas. Los demás géneros, incluyen especies que, aunque tienen estrategias de replicación similares, difieren antigénicamente entre sí.

Los *Flavivirus*, dependiendo de su ciclo de transmisión, a su vez se clasifican en mosquito/vertebrado, garrapata/vertebrado, sin vector conocido (NKV) y virus específicos de insectos (ISF), que pueden ser divididos en clásicos (cISF) y de doble huésped (dISF). En la figura 4, se observa la clasificación filogenética de los *Flavivirus* dependiendo de la similitud entre la secuencia de aminoácidos en su poliproteínas (Blitvich & Firth, 2015).

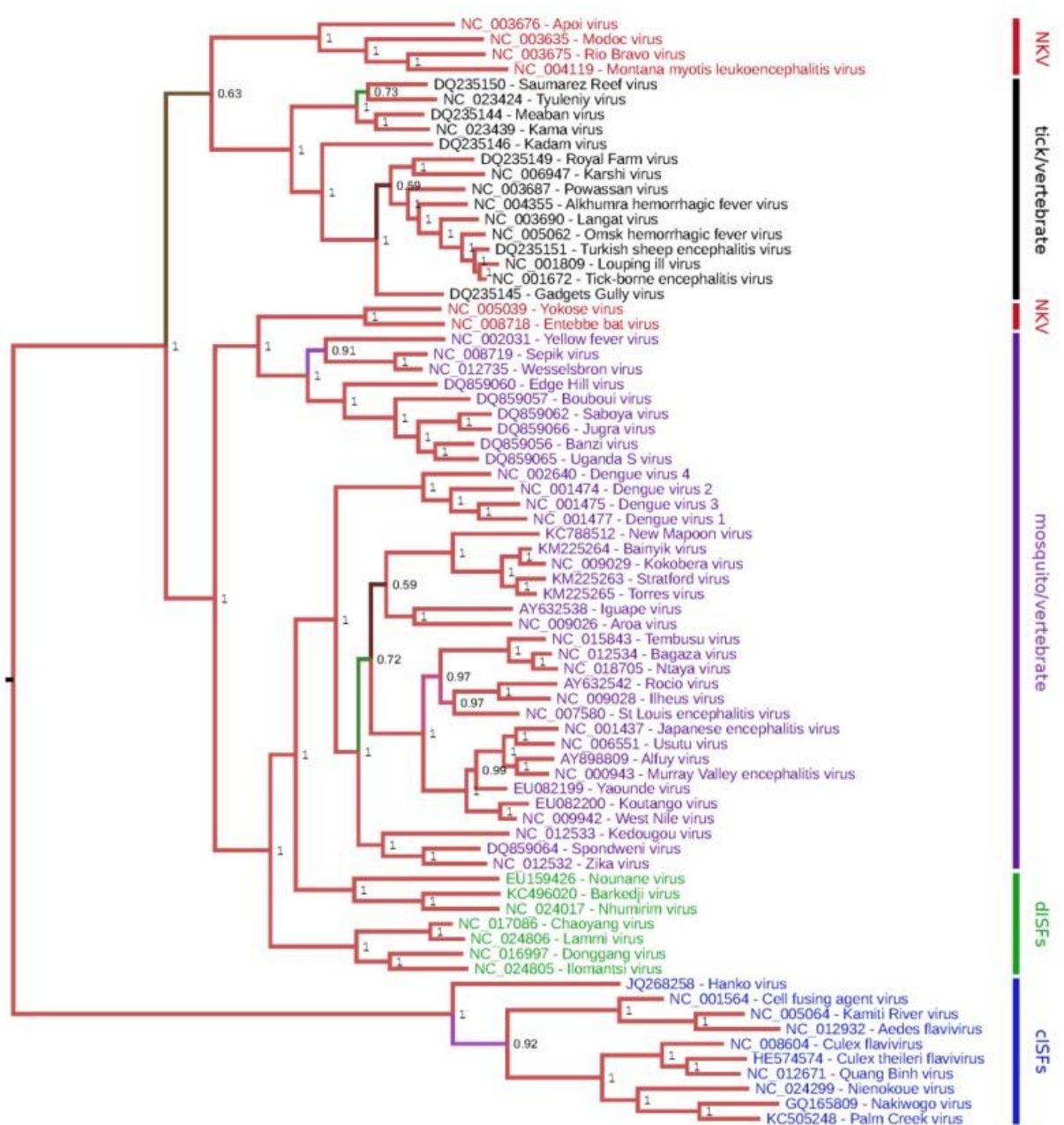


Figura 4. Árbol filogenético de los Flavivirus (Blitvich & Firth, 2015). Los clados se organizan por similitud entre la secuencia de las poliproteínas virales.

Este género se divide en 14 serogrupos con 53 especies reconocidas. Aun así, se reportan 74 virus y existen otros 14 que aún no han sido clasificados (Bennet, 2014).

El DENV presenta 4 serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) genéticamente relacionados pero antigénicamente distintos que comprenden 11 subtipos: 5 para el DENV-1 y DENV-2 (Rico-Hesse, 1990), 4 para el DENV-3 (Lanciotti, Lewis, Gubler, & Trent, 1994) y 2 para el DENV-4 (Lanciotti,

Gubler, & Trent, 1997). Estos subtipos han sido aislados de diferentes cepas que circulan generalmente en una misma región geográfica.

1.3.2. Estructura viral

El RNA viral del DENV mide aproximadamente 11kb y codifica para una poli-proteína. El genoma viral funciona como mRNA de polaridad positiva y está flanqueado por dos regiones UTR. En el extremo 5', se encuentra una estructura de Cap formada por una 7mG y en el extremo 3', aunque carece de cola de poli-A, está protegida por estructuras de tallo-asa. En la figura 5, se puede observar la estructura secundaria de protección en la región 3' con todas sus regiones específicas. Estas estructuras secundarias tienen implicaciones directas sobre la posibilidad de infección y rapidez de replicación de la progenie viral (Iglesias, Byk, & Gamarnik, 2014).

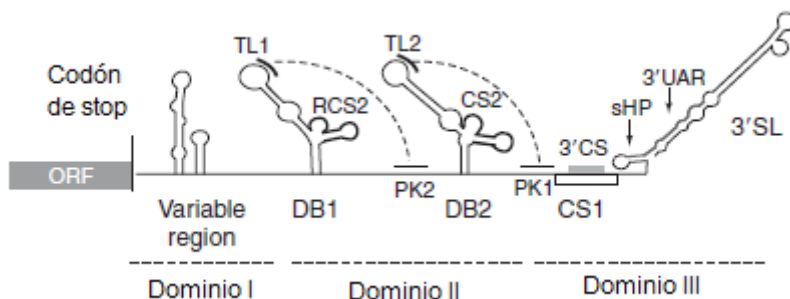


Figura 5. Estructura secundaria de la región 3' UTR. **DB:** dumbbell (pesa), **PK:** pseudoknot (pseudonudo), **CS:** conserved sequence (secuencias conservadas), **RCS:** repeated conserved sequence (secuencia conservada repetida), **TL:** top loop (bucle superior), **SL:** side stem loop (tallo-asa lateral), **sHP:** side hairpin (horquilla lateral), **UAR:** upstream AUG region (region AGU río arriba)(Iglesias et al., 2014).

La poliproteína, está dividida en 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales (figura 6.B). Dentro de las proteínas estructurales se encuentran la C, la proteína E, y la proteína M (figura 6.A). La proteína C, que codifica para la cápside, pesa 12kDa y se encarga de interactuar con el RNA viral y con el retículo endoplasmático rugoso al mismo tiempo, para facilitar la formación de la nucleocápside (estructura formada por la cápside y el RNA) en el proceso de ensamblaje del virión.

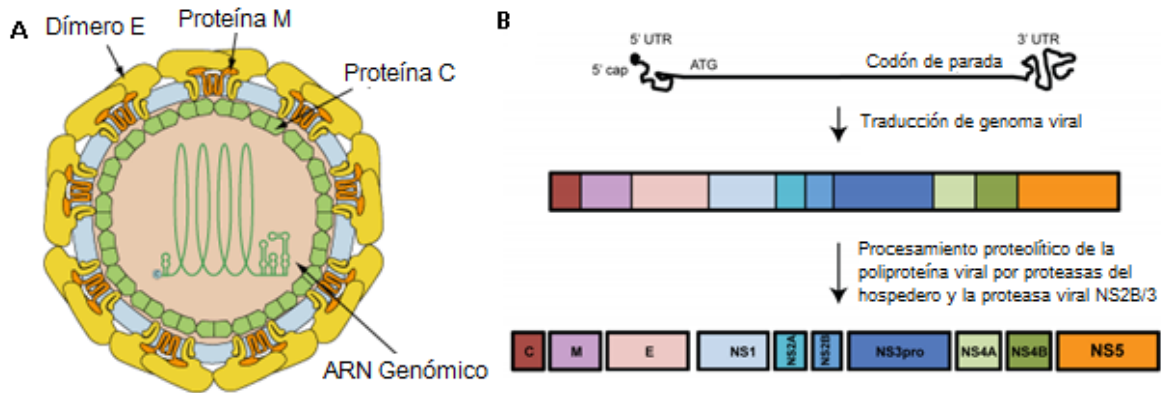


Figura 6. A. Virión de DENV ("Flaviviridae," 2016). **B.** Genoma del DENV. C: proteína de la cápside; M: proteína de la membrana; E: proteína de la envoltura; NS1: antígeno viral; NS2A y NS2B: cofactores de NS3; NS3: proteasa; NS4A y NS4B: cofactores de NS5; NS5: RNA polimerasa dependiente de RNA (Morrison & García-Sastre, 2014)

La proteína E ó proteína de envoltura, está involucrada tanto en el reconocimiento del virus por parte del hospedero, como en la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal. Se organiza como un dímero, que está distribuido en estructuras triméricas (figura 7.B). Se compone de 3 dominios diferenciados: el dominio I o central, el dominio II de dimerización que interactúa con la membrana endosomal durante la fusión del virus ("loop" de fusión), y el dominio III de reconocimiento que se asemeja a un IgC.

La proteína M, que estructura la membrana, va acompañada de un péptido prM que está presente en el virión recién sintetizado o inmaduro (figura 7.A) y del que se separa por acción de una furin proteasa. La proteína prM protege el "loop" de fusión de la proteína E, para evitar que el virión recién sintetizado se fusione con la membrana endosomal mientras atraviesa la red trans-Golgi.

Las proteínas no estructurales (NS) por su parte, van enumeradas dependiendo de su ubicación en el genoma viral. La glicoproteína NS1, pesa 48-50 kDa y puede ser secretada de las células infectadas hacia la superficie celular o hacia el torrente sanguíneo. Se cree que tiene un papel importante en la replicación viral, ya que se ha localizado junto con el complejo de replicación de RNA. Las proteínas NS2A y NS2B, son cofactores esenciales para la proteína NS3, que es la proteasa viral que procesa la poliproteína con su dominio N-terminal de serin-proteasa. Además, tiene una función RNA helicasa, nucleósido trifosfatasa (NTPasa) y RNA nucleósido 5' trifosfatasa (RTPasa) en su dominio C-terminal. Se ha reportado que la proteína NS2A también tiene un papel importante como componente de la replicasa.

Por otro lado, las proteínas NS4A y NS4B son cofactores de la NS5, que tiene actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA en el dominio C-terminal. En su dominio N-terminal, se encuentra una N-7 y 2'-O metiltransferasa (MTasa) que se encarga de la síntesis del cap en el extremo 5'.

Se ha reportado que tanto las proteínas NS2B como la NS4B tienen algún papel importante en el bloqueo de la vía del interferón (Lescar & Lok, 2014).

1.3.3.Replicación

Cuando el virus entra en contacto con las células de la respuesta inmune temprana (células dendríticas, monocitos, macrófagos), puede infectarlas ya que estas presentan receptores en su superficie que pueden reconocer las proteínas estructurales del virus (figura 8.A). Este proceso no se da únicamente en este tipo de células, ya que se ha reportado que el DENV puede replicarse también en hepatocitos, células epiteliales de riñón o pulmón, células endoteliales y astrocitos.

Existe una gran variedad de receptores que han sido reportados como mediadores de la entrada del DENV en células diana (tabla 1). De hecho, el primer paso de la replicación viral es la internalización del virus por endocitosis mediada por receptor (figura 8.B) en las células que van a ser infectadas.

Tabla 1. Algunos de los receptores identificados para internalización de DENV (Cruz-Oliveira et al., 2015)

Molécula	Tipo	Células	Serotipos
Heparán sulfato	GAG	Vero CHO K1	DENV-2
nLc4Cer	Glucoesfingolípido	K562 BHK-21	DENV-2
DC-SIGN	Lectina tipo C	THP-1 Monocito derivado de células dendríticas	DENV-1, 2, 3 y 4
CD14	Proteína	Monocitos Macrófagos	DENV-2
HSP90 HSP70	Proteína	U937 SK-SY-5Y Monocitos derivados de células dendríticas	DENV-2
Receptor de manosa	Proteína	NIH3T3 Monocitos Macrófagos	DENV-1, 2, 3 y 4
Grp78	Proteína	HepG2	DENV-2
Receptor de laminina de alta afinidad	Proteína	HepG2 PS Clone D	DENV-1, 2 y 3
TIM-1	Proteína	A549 Huh7 5.1 Vero	DENV-2 y 3
AXL	Proteína	A549 Vero Células primarias endoteliales de riñón humano Astrocitos primarios de humano	DENV-2 y/o 3
Claudina-1	Proteína	Huh-7 Huh 7.5	DENV-2
65 kDa	Proteína	N1E-115 SK-NSH	DENV-2
44 y 74 kDa	Proteína	Vero	DENV-4
29, 34 y 43 kDa	Desconocido	ECV304	DENV-2

Este proceso se da mediante la formación de un complejo de proteínas accesorias de endocitosis (EAPs), en dónde una de las más importantes es la clatrina, que generalmente es utilizada como medio para internalizar receptores de superficie al interior de la célula (Cruz-Oliveira et al., 2015; Merrifield & Kaksonen, 2014). Después de que se forma el endosoma temprano, inicia un proceso de acidificación (figura 8.C y D) por medio de hidrolasas y bombeo de protones de la ATPasa V que genera una disminución del pH dentro del endosoma, lo que facilita el cambio de conformación de la envoltura del virión (figura 8.C) para promover la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal (figura 8.E), y así, liberar el RNA viral hacia el citoplasma de la célula. El cual se direcciona posteriormente hacia el retículo endoplasmático rugoso y es traducido por los ribosomas del hospedero (figura 8.F y G), generando una poliproteína que es modificada por proteasas del hospedero (peptidasa señal y furin-proteasa) y por la misma proteasa del virus.

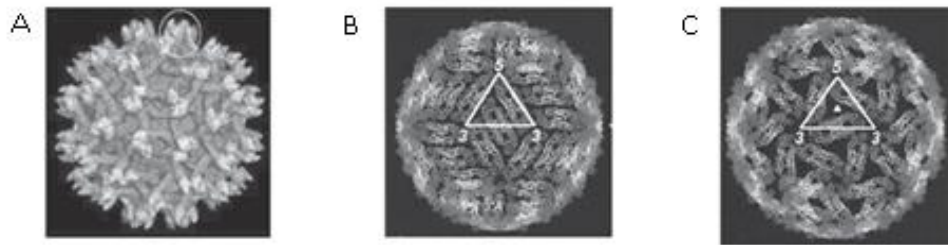


Figura 7. A. Partícula inmadura a pH neutro. Generada después del ensamblaje del RNA viral con las proteínas de la cápside y la membrana. **B.** Partícula madura a pH neutro. Generada por la escisión entre la proteína M y la prM. **C.** Partícula madura a pH ácido. Presente antes de la liberación del virus. (Screaton & Mongkolsapaya, 2014).

Cuando todas las proteínas son liberadas y tienen su estructura funcional, el RNA viral se replica con ayuda de la RNA polimerasa dependiente de RNA y se generan múltiples copias del RNA viral de polaridad negativa (figura 8.H y K). A partir de estas hebras, pueden generarse nuevas copias de RNA de polaridad positiva que van a ser utilizadas como material genético de nuevos viriones. Este proceso ocurre cerca de las regiones de evaginación del retículo endoplasmático ya que allí es dónde se van a generar los viriones inmaduros. Para esto, las proteínas C, prM, M y E se acomodan en las membranas del retículo endoplasmático, de tal forma que el RNA viral pueda entrar en contacto con la proteína C y formar la nucleocápside (figura 8.I). La evaginación del virión inmaduro se lleva a cabo vía ESCRT (complejo de clasificación endosomal requerido para transporte), que promueve la formación de la vesícula que transporta el virión inmaduro hasta el aparato de Golgi (figura 8.J), en dónde, el péptido prM es separado de la proteína M por una furin-proteasa del hospedero. En este momento, el virión inmaduro cambia su conformación y la proteína E se organiza para estructurar la superficie del virión maduro (figura 7.A y B). Por último, la vesícula endosomal que contiene al nuevo virión se transporta hacia la superficie de la célula, se acidifica (figura 8.L) y su membrana se fusiona con la membrana citoplasmática (figura 8.M) liberando a los viriones maduros al espacio intercelular (Barrows et al., 2014).

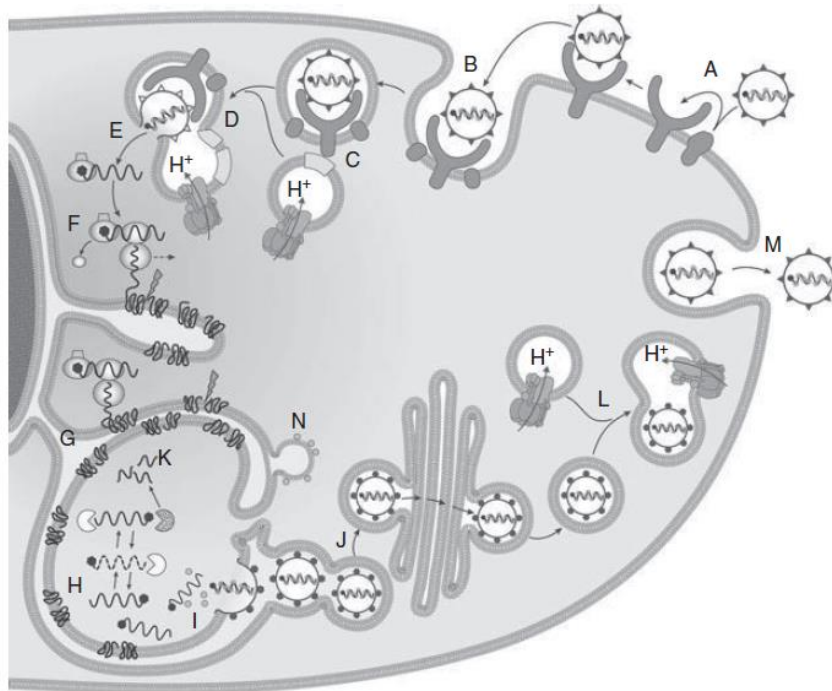


Figura 8. Esquema de replicación del DENV (Barrows et al., 2014). A: reconocimiento del virión mediado por receptores; B: endocitosis mediada por recepción; C: formación de endosoma temprano; D: acidificación del endosoma por bombeo de protones con ATPasa V; E: fusión de la membrana viral con la membrana endosomal; F: escisión de la poliproteína por proteasas del hospedero; G: traducción de proteínas virales; H y K: replicación viral; I: ensamblaje del RNA viral con la proteína C en el retículo endoplasmático; J: evaginación de virión inmaduro y transporte a través del aparato de Golgi en donde se da la maduración del virión; L: transporte del virión hacia la membrana citoplasmática; M: fusión de membrana endosomal con membrana citoplasmática y expulsión del virión.

Dependiendo de los tejidos en los que se de esta replicación de forma efectiva, las manifestaciones clínicas de la enfermedad variarán y su sintomatología se desarrollará en diferentes grados de agresividad.

1.4. Manifestaciones clínicas

El Dengue es una enfermedad con un espectro de manifestaciones clínicas muy amplio e impredecible. Previamente se clasificaba en tres categorías: fiebre indiferenciada, fiebre por Dengue y fiebre hemorrágica por Dengue (FHD). A su vez, esta última se dividía en 4 grados de severidad entre los cuales los grados III y IV correspondían al síndrome de choque por Dengue (SCD). Esta clasificación trajo consigo varias dificultades derivadas de la variabilidad de manifestaciones propias de la enfermedad, ya que se podían presentar casos con síntomas que no estaban dentro de ninguna de las clasificaciones por lo que su diagnóstico y tratamiento no era adecuado, lo que resultaba en un aumento en la mortalidad por no hacer el diagnóstico temprano (Organization et al., 2009).

En el año 2009, a partir de las dificultades mostradas, la OMS propuso una nueva clasificación (figura 9) dinámica e integral basada en la gravedad de la enfermedad, que incluye al Dengue sin signos de alarma, Dengue con signos de alarma y Dengue grave.

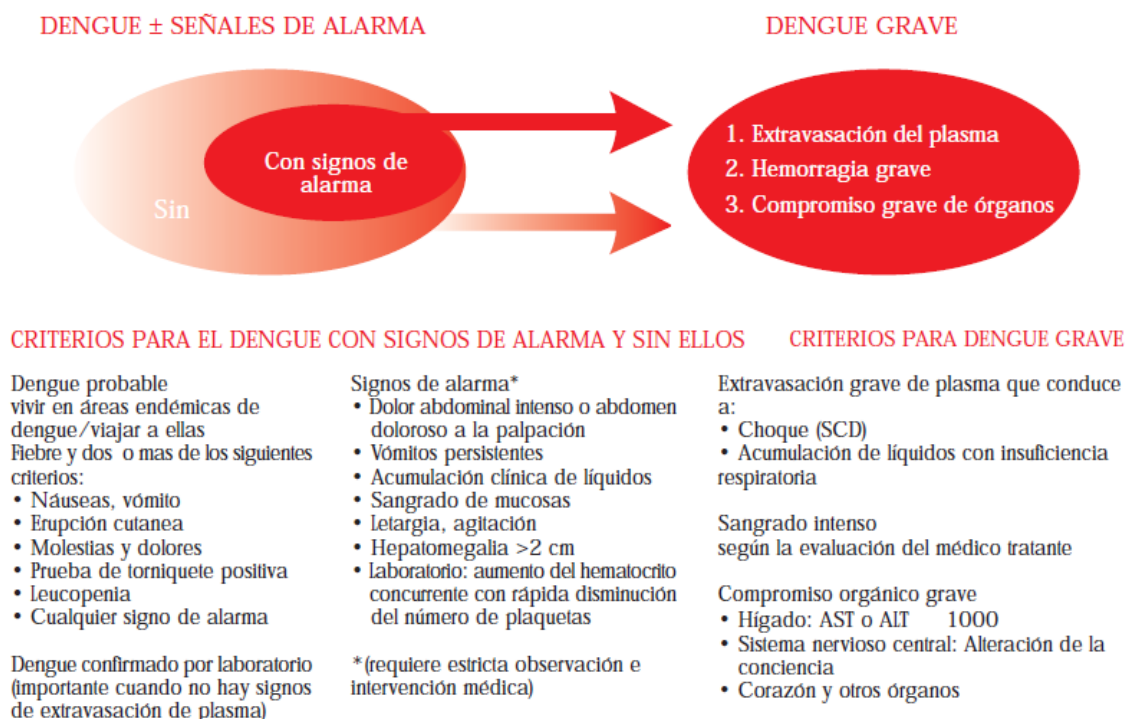


Figura 9. Clasificación del Dengue (Organization et al., 2009).

Como se observa en la figura 9, el Dengue sin signos de alarma comprende síntomas inespecíficos como fiebre, náusea, vómito, erupciones cutáneas, mialgia o artralgia. Cuando los pacientes diagnosticados con Dengue presentan síntomas como dolor abdominal intenso, vómito persistente, sangrado de mucosas, letargia, agitación y/o aumento del hematocrito en pruebas de laboratorio, se puede sospechar que pueden desarrollar las formas graves de la enfermedad. Aun así, los pacientes sin signos de alarma pueden evolucionar a Dengue grave.

El Dengue grave, por otro lado, comprende uno o varios de los síntomas característicos, entre ellos extravasación de plasma, hemorragia grave y/o compromiso grave de órganos (corazón, riñón, hígado o afectaciones sobre el sistema nervioso central, generalmente presentadas con estados de alteración de la conciencia). Este último síntoma, permite extender el espectro de manifestaciones clínicas de la enfermedad para incluir casos que anteriormente no eran considerados como Dengue grave, por lo que se diagnosticaban erróneamente (Trung & Wills, 2014).

En referencia a la evolución de la enfermedad, se reconocen diferentes etapas de la misma. Siguiendo a la picadura del mosquito, hay un período de incubación del virus aproximadamente de 5-7 días después de los cuales, se presentan tres etapas bien definidas: una fase febril, una fase crítica y una fase de recuperación (figura 10).

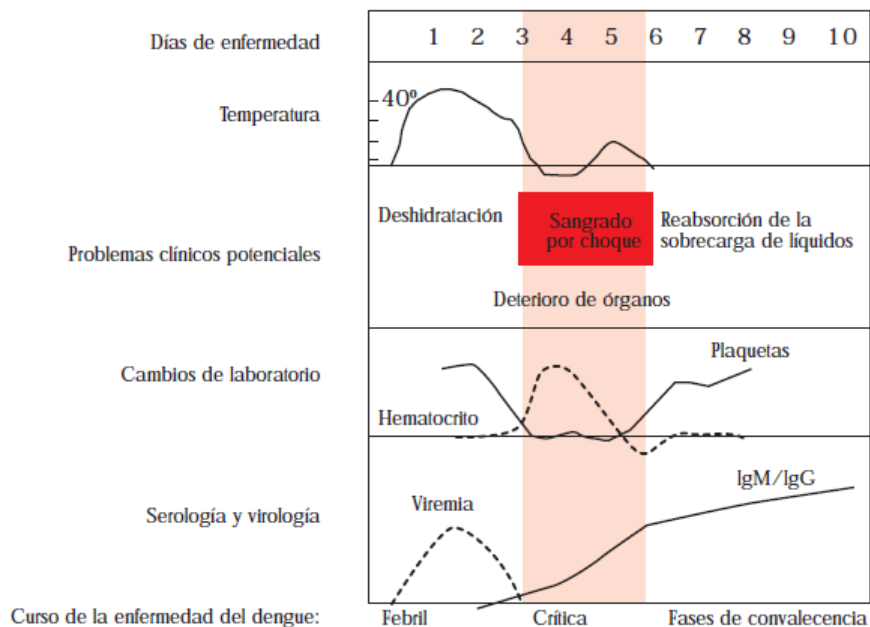


Figura 10. Evolución del Dengue (Organization et al., 2009). Durante los primeros días de la enfermedad, en la fase febril se alcanzan temperaturas de 40°C. Hay deshidratación y aumenta la carga viral. La fase crítica empieza con el período de defervescencia. Aumenta el hematocrito, disminuye la concentración de plaquetas y empiezan a producirse anticuerpos. En esta fase pueden presentarse los signos característicos de la forma grave de la enfermedad. Durante la fase de convalecencia el hematocrito y el conteo de plaquetas se normalizan, y se produce gran cantidad de anticuerpos IgM.

1.4.1. Fase febril

En la fase febril, los pacientes alcanzan temperaturas de 39-40° y presentan varios de los signos inespecíficos mencionados anteriormente. Esta fase generalmente dura 3-7 días y puede estar acompañada de otros síntomas como salpullido, diarrea o disuria. Algunos pacientes experimentan cólicos abdominales, sensación alterada del gusto, tos y dolores de garganta. Los hallazgos de laboratorio indican una trombocitopenia y leucopenia moderadas.

Generalmente, después de esta fase la fiebre termina abruptamente. Este proceso generalmente ocurre en el 95% de los casos y puede ir acompañado de anorexia y letargia, pero cuando la temperatura alcanza su nivel normal, estos síntomas desaparecen.

Un 5% de los casos en esta fase pueden progresar a las formas más graves. Es probable saber qué pacientes van a evolucionar a Dengue grave por los signos de alerta que presenten (figura 10). Aun así, sin necesidad de pasar por estos signos de alerta, también se puedan desarrollar los síntomas de la forma severa.

1.4.1. Fase crítica

Esta fase, que puede desarrollarse entre los días 3 y 6 de la enfermedad y dura aproximadamente 48 horas, va acompañada de un descenso en la fiebre (38-37.5°) y de la presencia de uno o varios

síntomas específicos de los cuales el más representativo es una vasculopatía que generalmente ocasiona un incremento en la permeabilidad vascular. Esta sintomatología puede ir acompañada de manifestaciones hemorrágicas y anormalidades hematológicas. En los casos más graves, se puede presentar un choque hipovolémico que, si no se trata adecuadamente, puede conllevar a la muerte. Dependiendo del tratamiento dado, el porcentaje de casos fatales puede disminuir hasta <1%.

Aunque no se desarrolle hemorragia, puede haber una acumulación clínica de fluidos debido a la extravasación de plasma derivado de la vasculopatía. Para determinar el grado de escape de plasma debe hacerse un seguimiento en el hematocrito ya que las variaciones indican cambios en la concentración de células sanguíneas. En estos casos, se observa un aumento gradual que puede significar pérdida de plasma lo que puede indicar que el paciente podría sufrir de un choque hipovolémico.

Otro de los signos más característicos, pero menos estudiados en esta fase, es la falla multiorgánica. Dependiendo de los tejidos a los que el virus haya llegado, puede ocasionar daños en órganos específicos. Se ha descrito afectación al corazón (arritmias), riñones y tracto genitourinario (hematuria microscópica), hígado (con niveles altos de ALT – alanina aminotransferasa – y AST – aspartato aminotransferasa –), sistema respiratorio (efusión pleural y sangrado) e incluso al sistema nervioso central (estados de alteración de la conciencia y encefalitis).

1.4.2. Fase de recuperación o convalecencia

Los pacientes que logran resolver los síntomas de la fase crítica, pasan a una fase de recuperación en la cual se presenta una re-absorción espontánea de fluidos que empieza en el día 6-8 de la enfermedad. Se pueden presentar salpullidos generalizados e hipervolemia si la resustitución de líquidos fue muy agresiva.

Generalmente avanza sin mayores complicaciones y solamente en casos graves, los síntomas relacionados con la falla multiorgánica pueden perdurar (Trung & Wills, 2014).

1.5. Patogénesis del Dengue grave

Las razones por las que ciertos pacientes desarrollan las formas graves de la enfermedad, no están totalmente aclaradas, sin embargo, existen dos hipótesis principales que pueden explicar el proceso por el cual se generan estas manifestaciones. Inicialmente se pensaba, que como los 4 serotipos del DENV presentan una similitud del 60-70% en su cadena de aminoácidos y comparten epítopes, podrían generarse anticuerpos heterotípicos que reconozcan a diversos serotipos, pero no puedan neutralizarlos (Halstead, 1970). Esto pudo comprobarse ya que los pacientes con infecciones secundarias, tenían un mayor riesgo de desarrollar Dengue grave. De hecho, en la actualidad se sabe que en una infección secundaria con una cepa que pertenece a un serotipo diferente de la cepa que se replicó en la infección primaria, hay mayor posibilidad de desarrollar estos anticuerpos y por ende, se facilitará el reconocimiento e internalización de los viriones por parte de las células diana, Este fenómeno se conoce como infección dependiente de anticuerpos facilitadores o ADE (amplificación dependiente de anticuerpos, figura 11), en dónde la severidad de la enfermedad depende del contexto inmunológico del hospedero.

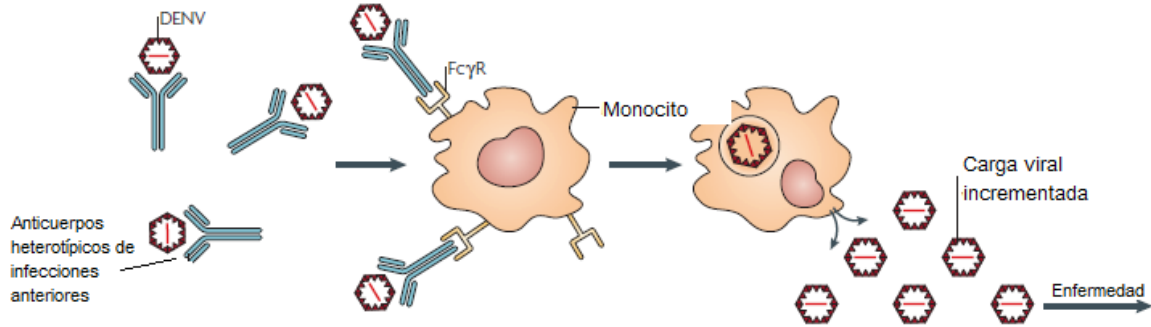


Figura 11. Modelo para ADE en replicación de DENV (Whitehead et al., 2007). Anticuerpos generados en infecciones previas, pueden promover la internalización de nuevos viriones que ingresen al cuerpo, facilitando la infección.

Aunque la hipótesis ADE explica los casos de Dengue grave derivados de infecciones secundarias, no explica la enfermedad generada por infecciones primarias. Por esta razón, se ha propuesto que distintas cepas pueden tener cambios genéticos que se asocian con la severidad (Rosen, 1977), ya que pueden funcionar incrementando la eficiencia de replicación de los viriones, o mejorando su capacidad para evadir la respuesta inmune (OhAinle & Harris, 2014). Estos cambios pueden incluir, pero no se limitan a, sustituciones de aminoácidos (banderas, figura 12), deleciones (triángulos, figura 12) o mutaciones (estrellas, figura 12) en las regiones UTR (regiones no traducidas) del genoma viral. Estas mutaciones, generalmente se asocian a cepas derivadas de infecciones en distintos contextos geográficos.

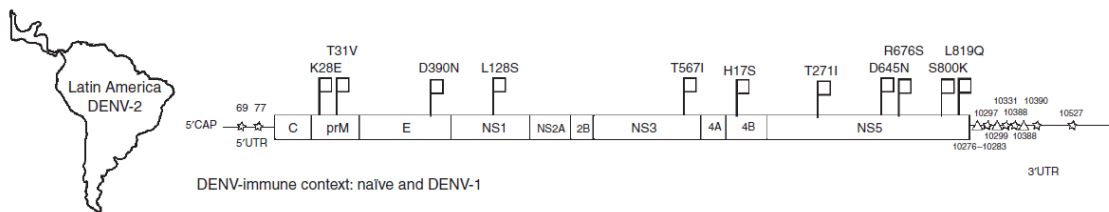


Figura 12. Mutaciones de DENV-2 asociadas a Dengue grave (OhAinle & Harris, 2014).

Teniendo en cuenta que las dos hipótesis mencionadas anteriormente no son excluyentes, es posible proponer un modelo de patogénesis que combine ambos factores: si un ser humano con un contexto inmunológico vulnerable es infectado con una cepa, cuyas mutaciones la hacen más virulenta, va a aumentar la posibilidad de que la enfermedad resultante sea severa (OhAinle & Harris, 2014).

Antecedentes

1. Dengue en el Sistema Nervioso Central

1.1. Epidemiología

Aunque las manifestaciones clínicas específicas del Dengue incluyen fiebre y vasculopatía, se han reportado afectaciones al sistema nervioso central con complicaciones neurológicas. Estos reportes datan desde hace más de 200 años, cuando aún no existían pruebas serológicas para determinar el agente causante de las enfermedades. Aun así, los casos de los que se tiene conocimiento, revelan sintomatologías idénticas a las del Dengue, incluyendo afectaciones neurológicas.

Se ha reportado que aproximadamente entre un 0.5-20% de los afectados desarrolla este tipo de manifestaciones. Por ejemplo, de 1691 pacientes admitidos con Dengue en un hospital en Vietnam del sur, 16 (1%) presentaron consecuencias neurológicas negativas, principalmente encefalitis. De todos los pacientes diagnosticados con encefalitis en este hospital (378), estos 16 correspondieron al 4.2% (Solomon et al., 2000). Este es un valor muy variable, ya que para que estos casos se reporten adecuadamente, debe haber un correcto diagnóstico, lo que se ha dificultado debido a la clasificación errónea de los casos y a la carencia de equipos para hacer diagnósticos correctos (Sejvar, 2014). En la tabla 2, se puede observar la incidencia de reportes de consecuencias neurológicas derivadas de Dengue en algunos países.

Tabla 2. Manifestaciones neurológicas de Dengue (Sejvar, 2014)

País	Año de publicación	No. de pacientes	Manifestación neurológica	Evidencia de DENV en el SNC
Tailandia	1987	10	Encefalitis	N/A
Tailandia	1967	42	Hemorragia subaracnoidea	N/A
Brasil	1990	5	Encefalitis	N/A
Brasil	1997	5	Encefalitis	Antígeno en el cerebro
Brasil	2009	11	N/A	Genoma viral en el cerebro
Brasil	2012	84 (41 confirmados)	Encefalitis, meningitis	DENV en el líquido cefalorraquídeo
Tailandia	1996	3	Encefalopatía	Antígeno en el cerebro
Alemania	1998	1	Encefalitis	Genoma viral en el cerebro
Brasil	2002	1	Edema cerebral	Genoma viral en el córtex cerebral
Brasil	2005	40	Edema cerebral	Genoma viral en el cerebro

México	1998	1	Encefalitis	Genoma viral en el cerebro
Vietnam	1999	18	N/A	Genoma viral en el cerebro
Indonesia	1983	30	Encefalitis	N/A
Puerto Rico	1982	1	Encefalopatía	Genoma viral en sangre
Tailandia	1976	1	Encefalopatía	N/A

N/A: No aplica. No se reportó o no hubo evidencia concluyente.

Generalmente, no existe evidencia suficiente de la relación entre el Dengue y las manifestaciones neurológicas ya que la mayoría de casos son fatales, y no se acostumbra realizar pruebas de identificación viral *post mortem* en los países en los que ocurren estos casos. Aun así, los casos que han sido reportados y en los que se han realizado pruebas de identificación del virus indican una relación directa entre el Dengue y consecuencias neurológicas derivadas de una enfermedad neuroinvasiva.

Este no es un caso aislado, ya que muchos Flavivirus son encefalitogénicos. Aproximadamente, el 43% de los virus de este género, ocasionan enfermedades con manifestaciones neurológicas graves (Gould & Solomon, 2008), principalmente encefalopatías que generalmente son mortales.

1.2. Manifestaciones neurológicas

Dentro de las manifestaciones neurológicas asociadas a Dengue, se han reportado consecuencias durante y post-infecciosas. Dentro de las manifestaciones durante la infección se encuentra la encefalopatía, encefalitis, mielitis y meningitis; y las post-infecciosas incluyen síndrome de Guillain-Barré y encefalomielitis diseminada aguda.

1.2.1. Encefalopatía

La encefalopatía es la manifestación neurológica más comúnmente asociada a Dengue, y ha sido descrita de muchas formas. Se ha asociado con alteraciones sensoriales, cambios en el comportamiento, estados alterados de conciencia, convulsiones, parestesia o rigidez de cuello. También se han registrado casos con hipoperfusión que generan anoxia o accidente cerebrovascular isquémico.

El origen de esta manifestación, puede deberse a desórdenes en otros órganos que afecten directamente al cerebro, por ejemplo, la encefalopatía hepática se genera por la acumulación de toxinas debido a infección severa en el hígado. Aun así, se ha reportado la detección del antígeno viral en el cerebro en casos de encefalopatía, lo que indica que el virus puede llegar al sistema nervioso central (Sejvar, 2014).

1.2.2. Encefalitis

Respecto a los casos en los que se desarrolla encefalitis, como su nombre lo indica, hay una inflamación de los tejidos cerebrales que lleva a sufrir convulsiones y estados alterados de conciencia que se reflejan en cambios histopatológicos. En estos casos, sí hay reportes de la influencia directa del DENV en el cerebro, ya que ha sido encontrado por diversas técnicas en

neuronas de la corteza cerebral, astrocitos, microglia, plexo coroideo y células de los vasos sanguíneos (C. Ramos et al., 1998; Sejvar, 2014).

Además de estas manifestaciones, que son las más comunes, también se desarrolla mielitis y meningitis. Generalmente, la primera señal que indica daño al SNC es la alteración de la vista, debido a que cuando hay inflamación, se ocasionan daños en el nervio óptico.

1.2.3. Síndrome de Guillain-Barré

El Síndrome de Guillain-Barré (SGB) es la consecuencia neurológica post-infecciosa más común en el Dengue. Se genera cuando los anticuerpos del hospedero tienen una reacción cruzada con las estructuras celulares del SNP. Este desorden genera un daño en la mielina de los axones que no permite o dificulta la sinapsis entre las neuronas, ocasionando dificultad de movimientos e incluso parálisis.

Aunque esta manifestación aumenta su incidencia en pacientes mayores de 50 años, se han hecho varios reportes pediátricos. Es difícil determinar si estos pacientes presentaron mielitis durante la infección, pero esto podría explicar la autoinmunidad desarrollada post-infección.

1.2.1. Encefalomiелitis aguda diseminada

Para el caso de la encefalomiелitis aguda diseminada, se cree que también se desarrolla por anticuerpos reactivos contra la mielina en el SNC, lo que genera una desmielinización de la materia blanca, la médula espinal o ambas; generando síntomas similares a los del SGB.

Todas estas complicaciones neurológicas, suelen ser similares a las desarrolladas por otros Flavivirus. De hecho, las mielitis desarrolladas en Encefalitis Japonesa o en la Fiebre del Nilo del Oeste, que son enfermedades encefalitogénicas, tienen manifestaciones similares a las del Dengue. Por esta razón, es necesario realizar estudios de diagnóstico en los cuales se confirme la presencia de un Flavivirus específico para hacer un seguimiento y tratamiento adecuado, y no diagnosticar erróneamente a los pacientes (Sejvar, 2014).

2. Componentes celulares del Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso está conformado por dos tipos de células: neurona y glia. Las neuronas son responsables de funciones específicas derivadas de su capacidad para responder a estímulos por medio de descargas eléctricas. Estas descargas son transmitidas de neurona en neurona formando una red de impulsos nerviosos que son recibidos por las dendritas en la superficie del soma, y se retransmiten por el axón a otra neurona (figura 13). Este proceso se lleva a cabo en largas distancias y es el responsable de la transmisión de señales desde el sistema nervioso central, hasta el sistema nervioso periférico (SNP), en donde células de otros tejidos reciben los impulsos nerviosos.

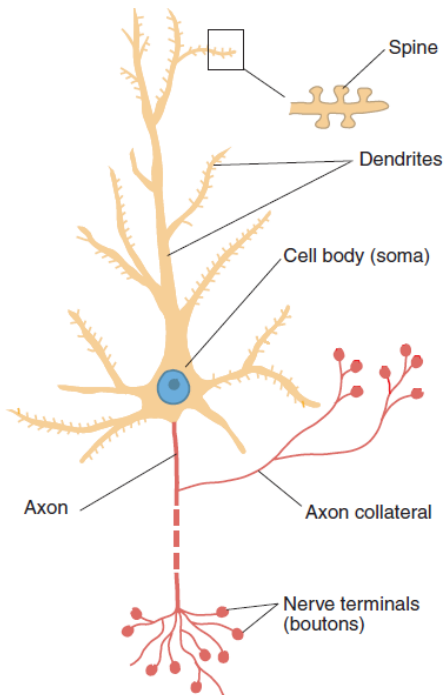


Figura 13. Neurona. Los impulsos nerviosos se transmiten desde el soma hasta el axón (Brodal, 2010).

La conducción de impulsos nerviosos se da por un proceso denominado sinapsis, en el cual dos neuronas adyacentes entran en contacto. Para que esto ocurra, las terminaciones nerviosas del axón de una neurona (boutons), deben acercarse a la superficie de otra, ya sea en el soma o las dendritas. Esta conducción no ocurre por transmisión del impulso de una célula a otra, sino que existen diversas moléculas mediadoras, denominadas “neurotransmisores” que influyen en la célula receptora. Generalmente, estas moléculas se transportan entre vesículas sinápticas que se generan en el interior de la célula y se liberan al espacio interneuronal por fusión de la membrana vesicular y la membrana sináptica.

La neurona que emite la señal se denomina pre-sináptica, mientras que la que la recibe, es la post-sináptica.

Por otro lado, existen diversos tipos de células gliales no-neuronales, cada una especializada en distintas funciones. Los astrocitos proveen soporte estructural a las unidades neurovasculares del sistema nervioso central, ya que unen los capilares cerebrales con las demás células y facilitan el transporte de sustancias necesarias para el desarrollo

neuronal (iones, proteínas lipofílicas o neurotransmisores). Están unidos al endotelio vascular de los capilares por unos pies terminales de gran superficie que cubren casi toda la circunferencia del capilar y regulan el ambiente extracelular de las neuronas.

Estas células también regulan la homeostasis del cerebro ya que, por estar en contacto directo con las células endoteliales, tienen un papel importante en el paso de iones necesarios para regular la presión osmótica en el espacio interneuronal. Además, regulan el pH eliminando el CO₂ y facilitan la llegada de neurotransmisores a las neuronas.

Otro tipo de células gliales son los oligodendrocitos (presentes en el SNC) o las células de Schwann (en el SNP), que se encargan de sintetizar la mielina que recubre los axones. Estas envolturas de mielina facilitan la conducción de neurotransmisores entre las neuronas y están formadas por diversas capas de membrana celular, por lo que tienen una alta concentración de colesterol y varios glucolípidos. Estas capas, o lamelas, se forman cuando los oligodendrocitos cubren los axones.

Cuando los axones están desmielinizados, no pueden transmitir las señales con rapidez y se desarrollan enfermedades como la esclerosis múltiple.

Por último, se encuentran las células microgliales que tienen funciones similares a las de los macrófagos, por lo que se definen como “macrófagos del SNC” (Brodal, 2010).

2.1. Unidad neurovascular

Las arterias y capilares encargados de llevar oxígeno, células polimorfonucleares, monocitos y linfocitos circulantes y otras moléculas vitales para mantener regulado el ambiente neuronal,

difieren de las demás del organismo en que son mucho más selectivas para determinar qué sustancias deben ingresar al cerebro. En la mayoría de órganos, los capilares permiten el paso de sustancias pequeñas, y por esta razón la concentración de iones, oxígeno, dióxido de carbono y proteínas se mantienen en niveles similares tanto en el plasma como en los fluidos intersticiales (Neuwelt et al., 2011).

Este no es el caso para los capilares del SNC ya que, en ellos, las células endoteliales tienen uniones especiales que las mantienen unidas sin permitir el paso de sustancias innecesarias para el SNC. El estricto control de transporte de moléculas está dado por la barrera hematoencefálica (BHE), que en unión con las células del SNC conforman la unidad neurovascular (figura 14), ya que este término hace énfasis en las relaciones funcionales y estructurales entre los capilares y el cerebro (Brodal, 2010).

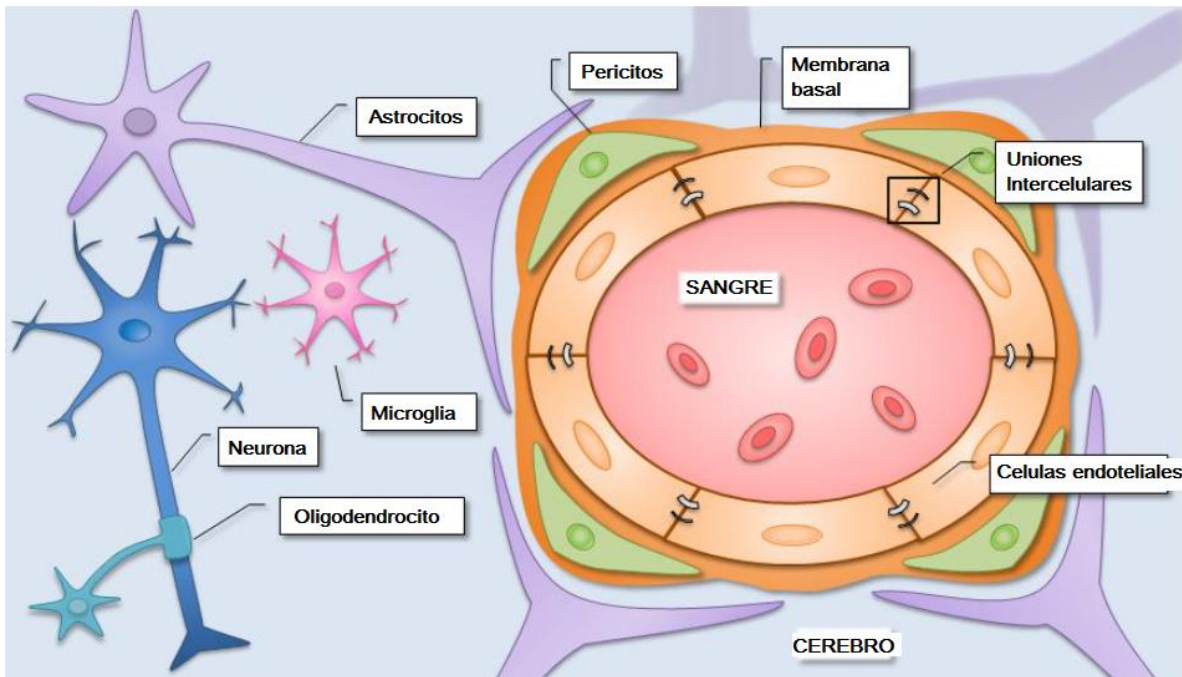


Figura 14. Unidad Neurovascular (Tenreiro, Ferreira, Bernardino, & Brito, 2016). Las células endoteliales son la primera barrera que separa a la sangre del cerebro. Los pericitos abrazan al capilar y sintetizan los componentes de la membrana basal. Los pies terminales de los astrocitos regulan el paso de sustancias.

2.1.1. Barrera Hematoencefálica

La barrera hematoencefálica inhibe el movimiento de moléculas hidrofílicas por medio de las uniones intercelulares que caracterizan a las células endoteliales de vasculatura cerebral (figura 15). Existen dos tipos de uniones entre estas células: las uniones adherentes (adherent junctions o AJ) y las uniones estrechas (tight junctions o TJ). Las primeras, están presentes en diversos tipos de células endoteliales y mantienen la estructura de los capilares en general. Dentro de estas moléculas, se encuentran marcadores específicos para células endoteliales, como la VE-cadherina (caderina endotelial vascular o CD144) y PECAM-1 (molécula de adhesión plaquetaria de células endoteliales

o CD31), que se son transmembranales y se encuentran ancladas al citoplasma por medio de otras proteínas como las actininas, vinculinas y radixinas, que unen a las moléculas de las AJ con los filamentos de actina dentro de la célula.

Las moléculas de las TJ son específicas de tejidos epiteliales estrechos, que deben servir como aislamiento para ciertos órganos como los riñones (en el túbulo contorneado distal y en el conducto entre los nefrones) o el hígado (conductos biliares ramificados). Dentro de las moléculas TJ transmembranales se encuentran las claudinas, las ocludinas, JAM's (molécula de adhesión de unión), ESAM (molécula de adhesión selectiva de células endoteliales) y CD99 (también conocida como glucoproteína tipo 1 de cadena sencilla). Las ocludinas cumplen con una función típica de barrera facilitando la unión entre una célula y otra, las ocludinas controlan el paso de iones y filtran moléculas grandes, y las JAM's regulan la trans migración endotelial.

Las proteínas citoplasmáticas que unen a estas transmembranales con los filamentos de actina, en este caso son las ZO-1, 2 y 3 (*zona occludens*), las cingulinas, la AF-6, la 7H6 y las CASK (proteínasa dependiente de Ca^{2+}) (Abbot, Rönnbäck, & Hansson, 2006; Engelhardt & Sorokin, 2009).

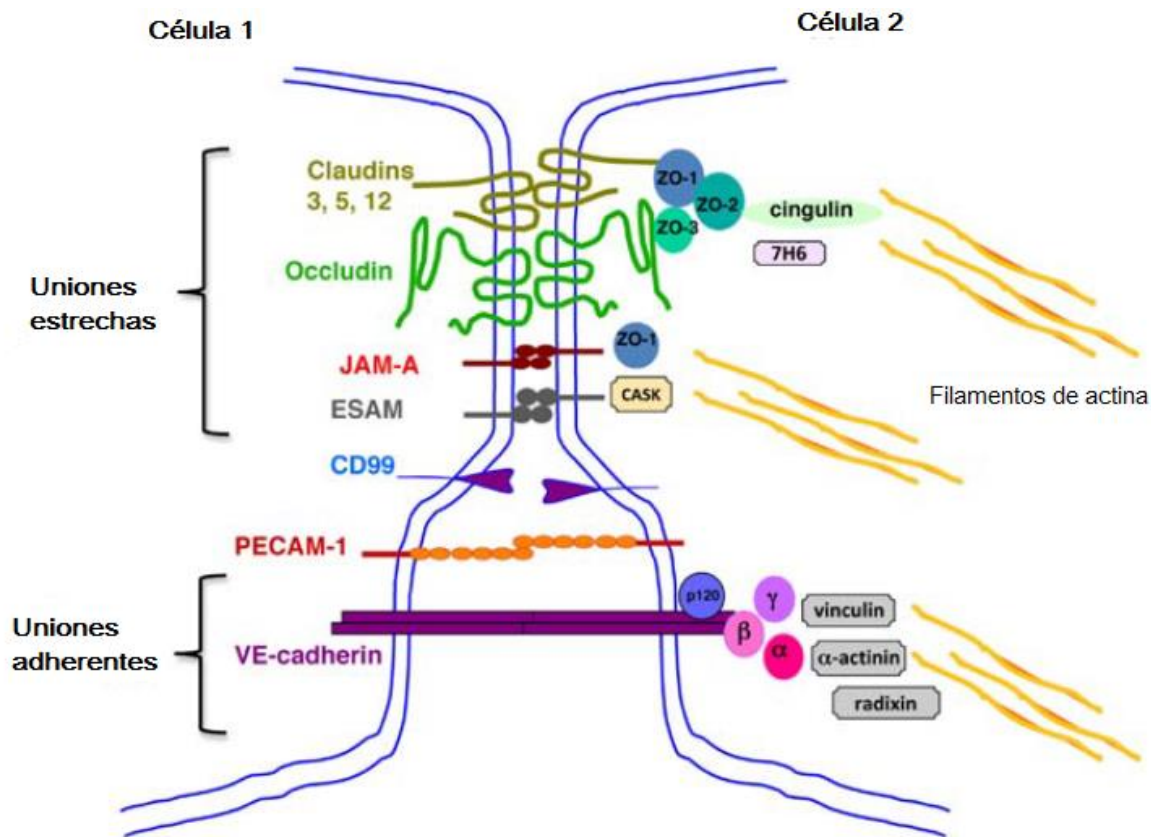


Figura 15. Uniones intercelulares del endotelio vascular de cerebro (Engelhardt & Sorokyn, 2009).

Además de las células endoteliales, la BHE está formada por una membrana basal de laminina, colágeno tipo IV, nidogen y proteoglicanos, que provee una interface de señalización en la que se encuentran factores de crecimiento, integrinas y metaloproteasas de matriz (MMP), que tienen un papel importante en la permeabilización de la BHE y la trans migración de leucocitos (Combes,

Guillemin, Chan-Ling, Hunt, & Grau, 2012). Esta membrana une el endotelio cerebral con los pericitos, que se encargan de sintetizar los componentes estructurales de ésta y potencian la integridad de la BHE. Por último, se encuentran los *pies terminales* de los astrocitos, e incluso células microgliales, que rodean los vasos sanguíneos, generando una protección aún mejor para la barrera y creando canales de comunicación entre las neuronas y los capilares.

Además de estas células, recientemente ha sido descrito que existe un espacio denominado Virchow-Robin (VRS) que se ubica entre los capilares y el parénquima cerebral, contiene fluido intersticial o líquido cefalorraquídeo y se encarga de retener y remover debrís celular, patógenos que logren atravesar la BHE o células de la respuesta inmune, que no deban ingresar al cerebro (Tenreiro et al., 2016).

3. Neuropatogénesis

Generalmente, los mecanismos de transporte por la BHE están estrictamente regulados y únicamente permiten el paso de sustancias necesarias para la supervivencia de las células neuronales y gliales. Existen diversos mecanismos por medio de los cuales se permite el paso de estas sustancias:

1. Difusión pasiva de moléculas lipofílicas apolares como oxígeno y dióxido de carbono,
2. Transportadores de solutos para las moléculas polares,
3. Transporte activo por canales dependientes de ATP para moléculas grandes,
4. Transcitosis de moléculas complejas a través de vesículas generadas por endocitosis, que atraviesan la célula, y
5. Diapedesis entre las células endoteliales mediante modificaciones en las proteínas de TJ (Tenreiro et al., 2016).

Para que los parásitos, bacterias y virus (como el DENV) puedan llegar al SNC, deben atravesar la BHE de tal forma que puedan instalarse en el cerebro. Para esto, desregulan los mecanismos de entrada, y los patógenos pueden abrirse paso hasta el cerebro generando consecuencias neurológicas indeseadas, entre ellas edemas e inflamación.

En la figura 16, se ilustran los mecanismos de transporte que han sido propuestos para la internalización de patógenos al SNC. Estos mecanismos, se basan en las rutas canónicas de transporte de moléculas a través de la BHE, y han sido modificados por los patógenos para su conveniencia (Combes et al., 2012).

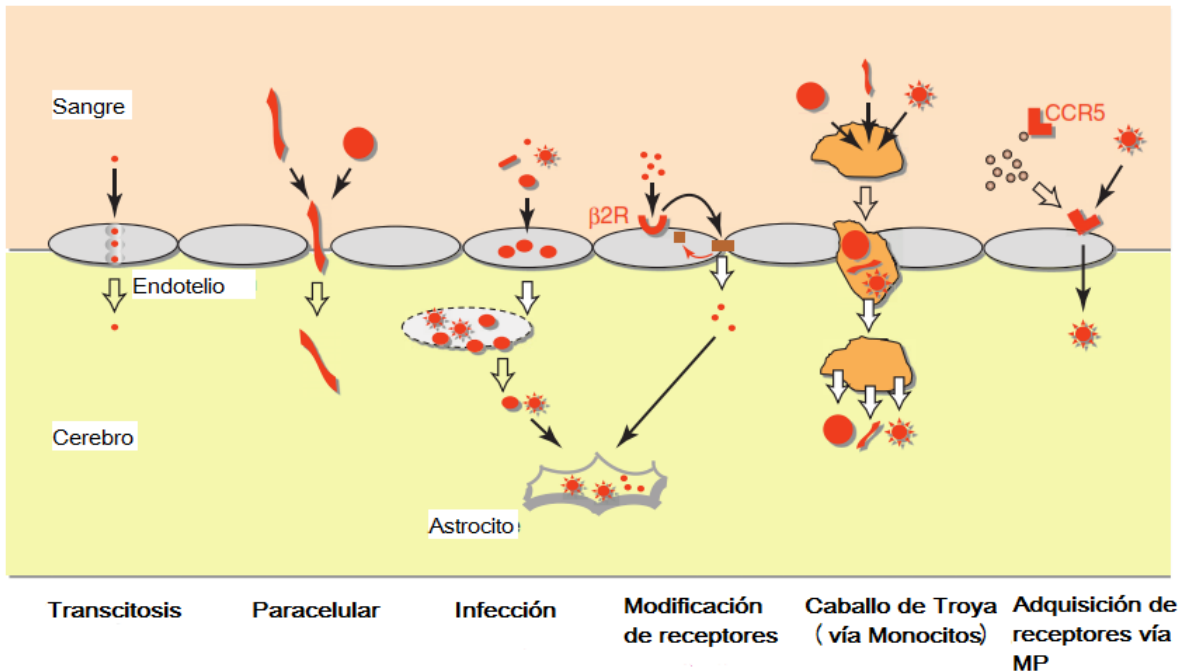


Figura 16. Mecanismos de transporte de patógenos por la BHE (Combes et al., 2012). Transcitosis, por endosomas que transportan microorganismos de un lado a otro en una célula; por transporte paracelular, con protozoos que abren las AJ y TJ; por infección, cuando los microorganismos llevan a las células endoteliales de la BHE a muerte celular; por modificación de receptores, al desregular la expresión de proteínas de superficie facilitando la infección; por un mecanismo de Caballo Troyano, en el que células inmunes llevan al microorganismo hacia el SNC; y por adquisición de receptores que faciliten la entrada de los microorganismos a las células de la BHE.

La hipótesis de *transcitosis* para el transporte de Flavivirus como el WNV (Virus del Nilo Occidental) y el JEV (Virus de la encefalitis japonesa), consiste en el paso de partículas virales entre endosomas generados por las células endoteliales, a partir de un reconocimiento generado por los receptores de la célula (Neal, 2014). Teóricamente, esto permitiría el paso de patógenos de la superficie luminal a la abluminal logrando llegar al parénquima cerebral.

El transporte paracelular, únicamente ha sido reportado para parásitos del género *Trypanosoma* y *Toxoplasma*. En este proceso, las TJ y AJ se relajan y permiten el paso de sustancias sin hacer daño a las células (Komarova & Malik, 2010).

También se ha propuesto que la habilidad de diversos virus (entre ellos el DENV) para infectar células endoteliales, puede permitir su replicación dentro de estas células y facilitar su paso hacia el parénquima cerebral (Puccioni-Sohler & Rosadas, 2015). Esto puede ocurrir ya que los viriones producidos en el interior de la célula, pueden regular la expresión de las proteínas de las AJ y TJ para deslocalizarlas o reubicarlas de tal forma que permitan el paso de los virus que están aún en el torrente sanguíneo. Este es el caso del WNV, en donde se ha observado que, aunque desregula las proteínas de TJ como la Claudina-1 y Claudina-5, y otras proteínas de unión como VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular 1 o CD106) y E-selectina (receptor de adhesión tipo lectina) (Verma et al., 2009). Aun así, la desregulación de estas proteínas generaría una apertura en la BHE que podría

generar edemas cerebrales que no son síntomas característicos de la Fiebre del Nilo Occidental, por lo que no es un mecanismo de transporte coherente con los síntomas presentados (Ashhurst et al., 2013).

El mecanismo más aceptado de invasión al SNC, es la hipótesis del “caballo de Troya” en donde se propone que las células del sistema fagocítico mononuclear que están infectadas por los virus, pueden entrar por transmigración (transporte transcelular) al parénquima cerebral. Esta hipótesis está soportada por el hecho de que las moléculas de adhesión como VCAM-1 o E-selectina se desregulan en infecciones virales, “reclutando” células circulantes como monocitos o macrófagos que, si están infectados y entran al cerebro, pueden generar infección (Ashhurst et al., 2013; Tenreiro et al., 2016). Aun así, si no existe un estímulo previo, las células mieloides no tendrían por qué atravesar la BHE por lo que este mecanismo podría explicar el establecimiento de la infección en el SNC, pero no la infección inicial. Además, no existe evidencia de este mecanismo, por lo que aún no se sabe con certeza cómo pueden entrar estos virus al cerebro (Ashhurst et al., 2013).

También se propone que el mecanismo de infección de células endoteliales puede ser facilitado si micropartículas (MP) derivadas de otras células viajan por el torrente sanguíneo y llevan consigo receptores que los virus puedan utilizar para su internalización. Estas MP podrían ser reconocidas por las células endoteliales, que podrían adquirir los receptores para hacerse permisibles a la infección por los virus (Tenreiro et al., 2016).

Para el caso específico del Dengue, se ha propuesto un mecanismo de transporte axonal retrógrado, ya que teniendo en cuenta que el DENV puede infectar neuronas tanto del SNC como del SNP, podría viajar entre las vesículas sinápticas de neurona en neurona hasta llegar al SNC. Para que este mecanismo fuera del todo cierto, debería existir infección y manifestaciones neurológicas periféricas, siempre que exista encefalitis o encefalopatía. Aun así, podría ser un mecanismo plausible para este tipo de tropismos (Puccioni-Sohler & Rosadas, 2015).

Generalmente, estos mecanismos de transporte están mediados por diversas proteínas, ya sean de transporte, receptores o de unión. En la figura 17, se pueden observar algunas proteínas que median la internalización de los Flavivirus a diversas células de la unidad neurovascular (Neal, 2014).

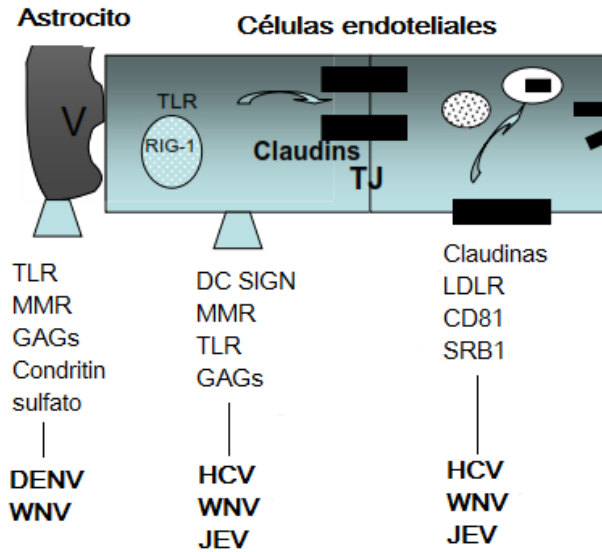


Figura 17. Receptores involucrados en los procesos de migración a través de la BHE. **TLR** (receptor tipo Toll), **MMR** (receptor de manosa para macrófagos), **GAG's** (glucosaminoglucanos), **DC-SIGN** (molécula de adhesión intercelular 3 no-integrina específica de células dendríticas), **LDLR** (receptor de lipoproteínas de baja densidad), **SRB1** (receptor scavenger tipo B1), **DENV** (Dengue virus), **WNV** (virus del Nilo Occidental), **HCV** (virus de la hepatitis C), **JEV** (virus de la encefalitis Japonesa), (Neal, 2014).

Después de la internalización del virus, se genera una respuesta inmune innata en donde se producen citocinas pro-inflamatorias que pueden mediar la permeabilización de la BHE, permitiendo que las moléculas de adhesión de las células endoteliales se desregulen y haya trans migración de células fagocíticas mononucleares y linfocitos al SNC. Si estas células están infectadas, la infección puede persistir como se presentó anteriormente en el mecanismo del “caballo de Troya”.

3.1. Neuroinflamación

Cuando los patógenos logran ingresar al SNC, pueden infectar a diversas células dependiendo de los receptores que estas expresen en su superficie. En el caso del Dengue se ha reportado que, utilizando un anticuerpo contra la proteína E, se encuentra infección en células neuronales, gliales y endoteliales en las unidades neurovasculares de un caso fatal de Dengue grave (figura 18) (C. Ramos et al., 1998).

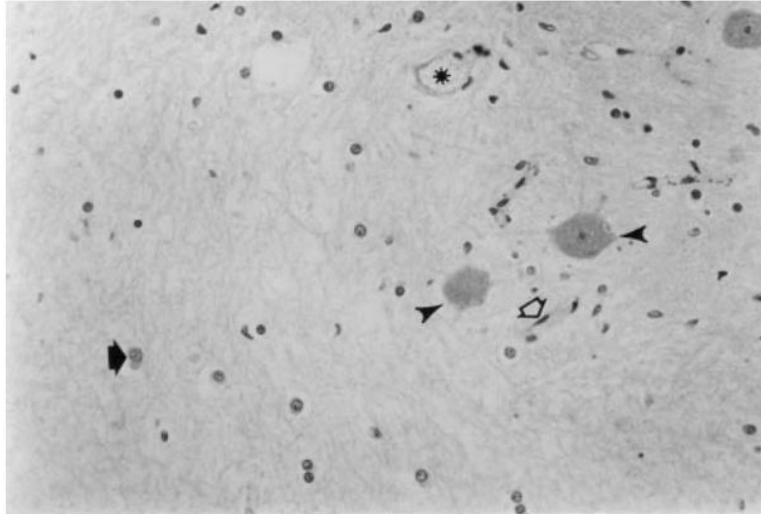


Figura 18. Inmunotinción con anticuerpo monoclonal para DENV (C. Ramos et al., 1998). **Cabeza de flecha negra:** neuronas, **flecha negra:** astrocitos, **flecha blanca:** microglia, **asterisco:** células endoteliales.

Además, en el mismo estudio se identificó genoma viral en el cerebro por medio de la técnica de RT-PCR. Esto quiere decir que las células del SNC pueden ser infectadas por el DENV, lo que puede desencadenar diferentes tipos de respuestas que promuevan encefalitis, mielitis, meningitis o apertura de la BHE.

Se han asociado las complicaciones neurológicas de la infección por DENV a procesos patofisiológicos indirectos que pueden interactuar entre sí para causar coma. Aun así, en algunos casos se reporta que, en ausencia de síndromes metabólicos, el virus como tal podría ser el único agente causante de la encefalitis observada (Solomon et al., 2000). En estos casos, en los que se comprueba la presencia del DENV en el tejido cerebral, en las neuronas afectadas se incrementa la producción de moléculas pequeñas como ATP o UTP, que pueden ser reconocidas por los receptores purinérgicos de las células microgliales (como el P2X7) que, al ser activados, a su vez activan al inflamasoma NLRP3, responsable de la producción de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β y la IL-18 (Iadecola & Anrather, 2011).

Además, en las neuronas activadas por daño, se sobre-expresan proteínas como la HMGB-1 (proteína de alta movilidad grupo 1) o la HSP60 (proteína de choque térmico 60), consideradas como DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) (Iadecola & Anrather, 2011; Mizuno, 2015). Estas proteínas al ser reconocidas por diversos PRR (receptor de reconocimiento de patrones), como los TLR (receptores tipo Toll) presentes en células microgliales, pueden iniciar una cascada de señalización que favorece la activación del factor de transcripción NF κ B, que al traslocarse al núcleo, activa la transcripción de los genes que codifican para otras citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 o el TNF α (factor de necrosis tumoral) (Mizuno, 2015; Suthar, Diamond, & Gale Jr, 2013). En casos específicos de encefalitis por Dengue, se ha reportado un incremento en la expresión de estas citocinas, lo que indica que las células microgliales se activan, ya sea por infección directa o por liberación de proteínas activadoras por parte de las neuronas (Silva de Miranda et al., 2012).

En el caso de las infecciones por virus de RNA, los TLR reconocen estructuras de RNA de doble cadena que se generan durante la replicación del virus. De esta forma, pueden activarse y facilitar la producción de citocinas pro-inflamatorias. Además, la producción de estas citocinas puede promover el rompimiento de tejidos adyacentes lo que genera DAMPs como las ROS (especies reactivas de Oxígeno) que, a su vez, activan más TLR.

Las células migrogiales, aparte de censar el ambiente extracelular para detectar DAMPs producidos por otras células, también sobre expresan moléculas propias en respuesta a situaciones de estrés, como Iba1 (molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1). Esta molécula se co-localiza con los filamentos de actina en las protrusiones u ondulaciones de la membrana llamadas “membrane ruffles” y en las invaginaciones que se generan en el proceso de fagocitosis, por lo que se expresa en situaciones de activación (Ohsawa, Imai, Kanazawa, Sasaki, & Kohsaka, 2000). Así mismo, al promover la remodelación celular, puede facilitar las cascadas de señalización activadas por señales de adhesión, como Rac y ERK (Ohsawa, Imai, Sasaki, & Kohsaka, 2004).

Los astrocitos, al ser activados, sobre-expresan GFAP (proteína ácida fibrilar glial) que es la proteína principal de la red de filamentos intermedios (IF) que mantiene la forma de las células en los astrocitos maduros. Esta proteína, al estar presente en los pies terminales de los astrocitos, regula indirectamente la BHE (Brenner, 2015). Su sobre-expresión está regulada por daño cerebral, envejecimiento y diversas enfermedades, por lo que se utiliza como marcador de activación de astroglia. En ratones KO para GFAP, la movilidad de vesículas y membranas se ve reducida alterando así el tráfico de endosomas, lisosomas y, por lo tanto, la comunicación intra e intercelular (Middlerdorp & Hol, 2011). En situaciones de activación, estas células también incrementan la producción de MMP que degradan las proteínas de matriz extracelular y las proteínas TJ entre las células endoteliales de la BHE facilitando la permeabilización de ésta, lo que puede empeorar la infección y, por lo tanto, la respuesta. Esto se ha visto para WNV, en dónde la infección de astrocitos conlleva a la sobreproducción de MMP-9 (Miner & Diamond, 2016; Spindler & Hsu, 2012).

En la figura 19, se observa un esquema general del proceso de activación en el que se involucra la respuesta inflamatoria y el reconocimiento a moléculas asociadas a daño (Iadecola & Anrather, 2011).

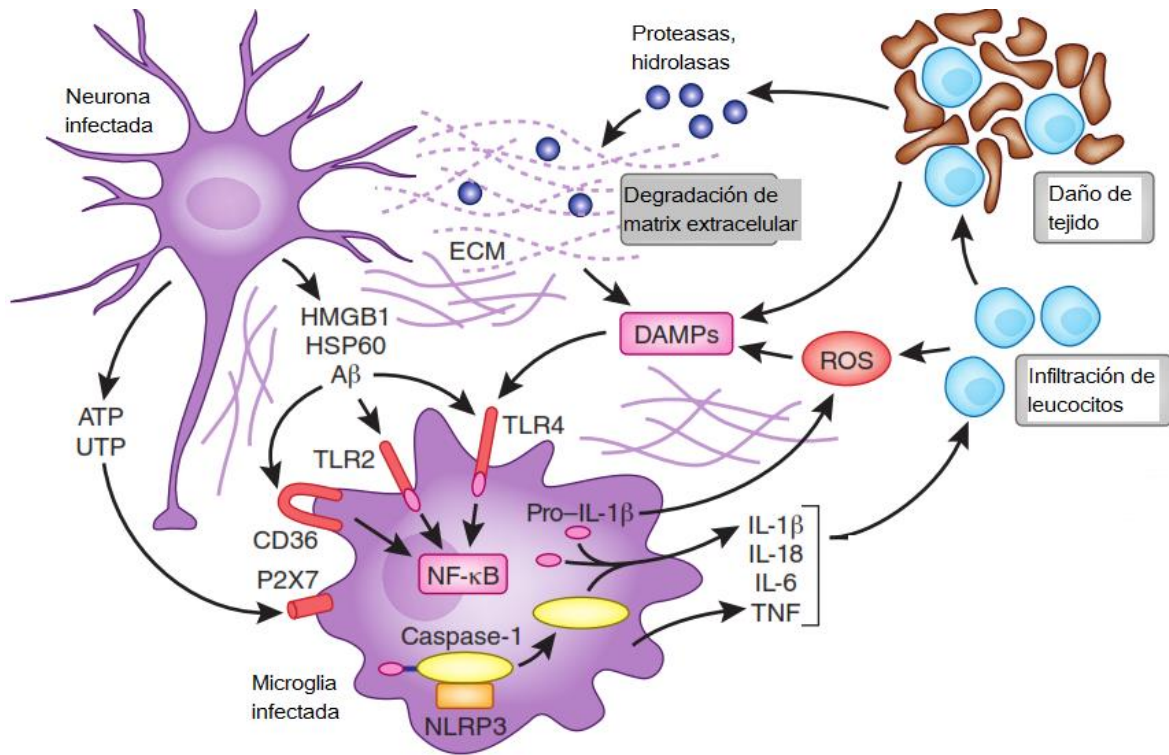


Figura 19. Respuesta innata inflamatoria del SNC. Modificado de Iadecola & Anrather, 2011.

4. Activación de células endoteliales de la barrera hematoencefálica

Se puede suponer que las células endoteliales de la BHE son el objetivo primario de los virus neurotrópicos ya que éstos deben atravesarlas de alguna forma para poder llegar al cerebro. Se ha visto que el virus del Dengue, puede infectar a estas células (Celso Ramos et al., 1998) lo que podría facilitar su paso hacia el SNC. En el caso del WNV, se ha confirmado que las células endoteliales de microvasculatura cerebral también son infectadas (Verma et al., 2009), y que esto podría desregular el funcionamiento de la BHE. Esto quiere decir que cuando las células endoteliales son infectadas por estos virus, pasan por un proceso de activación.

Aunque la respuesta a la infección en células neuronales y gliales puede generar un fenotipo inflamatorio, la infección de células endoteliales también puede promover la adhesión de leucocitos y secreción de moléculas que desestabilicen la unidad neurovascular. Cuando existe daño endotelial, las células expresan marcadores como V-CAM, E-selectina, P-selectina o TF (factor tisular) (Huerta-Zepeda et al., 2008). Estas moléculas reclutan leucocitos que pueden alterar la función de barrera. Además, como respuesta a la activación, las proteínas de TJ pueden desregular su expresión ya sea inhibiendo su síntesis o deslocalizándose haciendo que las uniones intercelulares sean más débiles, como se nombró anteriormente para el caso de WNV (Verma et al., 2009).

No solamente las moléculas de adhesión de superficie son afectadas durante el proceso de activación, sino que se activa la expresión de citocinas. En el caso del virus del Dengue se ha

observado que células primarias derivadas de cordón umbilical humano incrementan la expresión de IL-6 24 h post infección y de IL-8 48 h post infección (Huang et al., 2000).

Otro producto de activación de células endoteliales son las vesículas extracelulares, que tienen un papel importante en el transporte y la comunicación intercelular, y pueden ser indicadoras del estado de activación de la célula de la cual provienen.

4.1. Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VE) son partículas derivadas de membrana heterogéneas tanto en composición como en tamaño, producidas por todos los tipos de células, tanto en procariontes como en eucariotes. En la actualidad se les ha descrito una gran variedad de funciones desde reguladores homeostáticos hasta mediadores en diferentes procesos patológicos (Yáñez-Mo et al., 2015).

Dependiendo de su origen, composición y tamaño, las VE se clasifican en tres grupos: exosomas, cuerpos apoptóticos y micropartículas. Los exosomas son VE rodeadas por una bicapa fosfolipídica que miden aproximadamente 10-100 nm. Son generadas por cuerpos multivesiculados (MVB) que se funden con la membrana plasmática y pueden llevar en su interior siRNA y en su exterior moléculas específicas como las tetraspaninas y moléculas del complejo de histocompatibilidad. Por otro lado, los cuerpos apoptóticos son vesículas de 1-5 μm que se generan a partir de células en apoptosis. Estas vesículas se caracterizan por tener altos contenidos de DNA y membranas con fosfatidilserina en su superficie y se especializan en la transferencia horizontal de DNA. Por último, las micropartículas (MP), microvesículas o ectosomas, son vesículas de membrana de 100 nm a 1 μm que se generan a partir de la membrana citoplasmática de las células. Aunque, así como los exosomas, se producen en estado basal, su cantidad aumenta en situaciones de activación o estrés celular (György et al., 2011).

4.1.1. Micropartículas endoteliales

Ya que estas MP se generan a partir de la membrana celular, llevan en su superficie moléculas características del tejido del que provienen que pueden ser utilizadas como marcadores para su identificación y su estado de activación. Además, pueden llevar en su interior una gran cantidad de moléculas como lípidos, RNA (van Dommelen et al., 2012) o incluso citocinas, MMPs y proteínas regulatorias (Schindler, Little, & Klegeris, 2014).

Las MP, son producidas cuando el Ca^{2+} intracelular activa a diversas proteínas como la Calpaína o la Gelsolina que, a su vez, activan a la Escramblasa y la Flopasa y desactivan a la Translocasa. La función de ésta última, es mantener la simetría de la membrana, por lo que cuando se desactiva, promueve la translocación de la membrana de tal forma que la superficie interior se externaliza, y la Fosfatidilserina (FS) se acomoda hacia la superficie extracelular. Este proceso de recambio de la membrana se facilita ya que con la activación de la Calpaína y la Gelsolina, los filamentos de actina que unen a la membrana con el interior de la célula se rompen, y la FS no permanece unida con el espacio intracelular (Enjeti, Lincz, & Seldon, 2008). Después de este proceso de recambio, ocurre una evaginación en la cual la membrana celular forma una vesícula que es liberada hacia el exterior de la célula. En la figura 20, se puede observar el proceso de formación de las micropartículas.

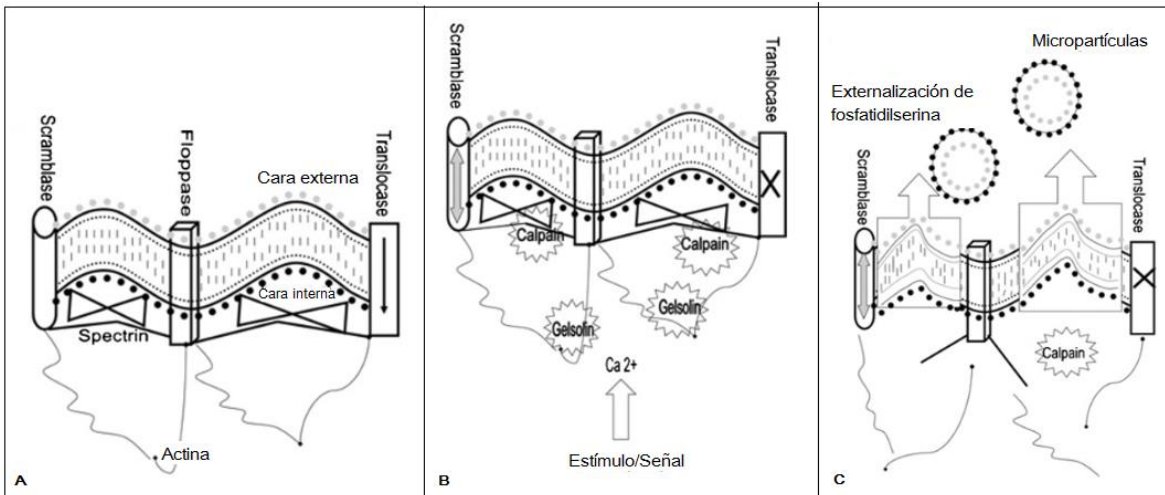


Figura 20. Formación de MP (Enjeti et al., 2008). **A:** en condiciones normales, los filamentos de actinase mantienen unidos a proteínas que regulan la simetría de la membrana, como escramblasas, flopasas y translocasas. **B:** cuando un estímulo aumenta la liberación de Ca^{2+} , se activa la calpaína y la gelsolína que activan a la escrambasa y flopasa, e inactivan a la translocasa desregulando la simetría de la membrana. **C:** los fosfolípidos aniónicos se translocan a la cara externa de la membrana, los filamentos de actina se separan de las proteínas de membrana, y las MP se generan por evaginación.

Las MPE se caracterizan por tener marcadores de superficie como CD31 (molécula de adhesión plaquetaria de células endoteliales), CD144 (VE-caderina) y Fosfatidilserina (detectada por marcaje con Anexina-V) (Berezin, Zulli, Kerrigan, Petrovic, & Kruzliak, 2015; György et al., 2011; Tenreiro et al., 2016). Con ayuda de citometría de flujo se ha determinado que las MPE circulantes pueden utilizarse como biomarcadores de diferentes enfermedades, ya que incrementan su concentración en situaciones de daño al endotelio vascular, debido al aumento de Ca^{2+} intracelular derivado de estos estímulos. De hecho, las MPE producidas pueden llevar en su superficie marcadores de daño endotelial como TF, V-CAM o E-Selectina y citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 e IL-8 por lo que, si entran en contacto con células sanas, pueden promover la patogénesis de éstas (Amabile, Rautou, Tedgui, & Boulanger, 2010).

El incremento en MPE circulantes se ha reportado en patologías del sistema cardiovascular como síndromes coronarios, infarto al miocardio, preclamsia, hipertensión pulmonar o vasculitis. Interesantemente, en desórdenes del sistema nervioso central como cáncer, enfermedad de Alzheimer, malaria cerebral, esclerosis múltiple y traumas cerebrales los niveles de MPE también aumentan considerablemente (Schindler et al., 2014). Aunque en estos desórdenes no es típico un daño al endotelio vascular, sí hay activación de estas células promoviendo la producción de MPE, lo que podría indicar que estas MP podrían ser importantes en algún proceso relacionado con estas enfermedades, ya sea establecimiento o resolución.

La importancia de estas MPE ha sido comprobada en diversos estudios en dónde se han identificado micropartículas con TF en su superficie, que generan un fenotipo pro-coagulante que puede ocasionar desórdenes hemostáticos (Owens III & Mackman, 2011). Incluso se ha reportado que las MPE pueden ocasionar patologías en individuos sanos. En un estudio realizado en el año 2014, se

determinó la cantidad de MP circulantes en ratones infectados con Malaria cerebral. Se observó que el incremento era mayor para MPE, micropartículas derivadas de plaquetas y derivadas de eritrocitos. Por esta razón, tomaron MPE purificadas de ratones enfermos y las inyectaron en ratones sanos. Encontraron que las MPE podían ocasionar una patología cerebral y pulmonar similar a la que se desarrolla en la Malaria cerebral (El-Assad, Wheway, Hunt, Grau, & Combes, 2014) por lo que se puede concluir que las MPE además de servir como biomarcadores de diferentes enfermedades, pueden ocasionar respuestas patológicas por sí mismas.

5. Modelos de estudio

En la actualidad, no existe un modelo de infección que presente todas las manifestaciones del Dengue. Los primates no humanos han sido ampliamente usados principalmente en el desarrollo de vacunas y en el estudio de ADE, aun así, su costo y dificultad de manejo no los hace un modelo adecuado para estudiar aspectos específicos de la enfermedad (Guabiraba & Ryffel, 2014).

Los ratones inmunocompetentes pueden disminuir la carga viral durante la infección sin desarrollar signos de la enfermedad. Aun así, cuando se inoculan con cepas virales adaptadas a ratones o por vías artificiales como la intraperitoneal (IP) o la intracraneal (IC) sí se desarrollan signos específicos. Específicamente para el caso de las afectaciones al SNC, desde 1991 se han utilizado los ratones inmunocompetentes para estudiar la permeabilidad de la BHE. En este estudio, ratones albinos suizos fueron inoculados por vía IP e IC con DENV-2 cosechado a partir de una suspensión de cerebro de ratón, es decir, un virus neuroadaptado. Aunque no se detectaron partículas virales en el cerebro de los ratones inoculados IP, la permeabilidad de BHE fue incrementando hasta el día 10 PI, cuando la concentración de Azul de Evans en el cerebro fue mayor (Chaturvedi, Dhawan, Khanna, & Mathur, 1991).

La apertura o incremento de la permeabilidad de BHE y las afectaciones al SNC han sido reportadas con diferentes serotipos y diversas cepas virales: Una cepa de DENV-2 aislado de un paciente con Dengue no grave inoculado por vía IP generó viremia en el tejido cerebral de ratones SCID inmunocomprometidos (An, Kuroda-Kimura, Hirabayashi, & Yasui, 1999); en ratones BALB/c adultos se observó inflamación perivascular en el cerebelo al ser infectados por vía IP con DENV-2 aislado de suero humano (Barreto et al., 2004); ratones BALB/c adultos inoculados por vía IC con una cepa DENV-2 NGC neuroadaptada, obtuvieron altos niveles de mortalidad desde el día 7 al 15% PI y manifestaciones claras de afectaciones al SNC como parálisis y alteraciones en la médula espinal (Oliveira et al., 2016); y una cepa neuroadaptada de DENV-4 inoculada por vía IP en ratones generó encefalitis, parálisis y apertura de la BHE (M. L. Velandia-Romero, Acosta-Losada, & Castellanos, 2012).

Diferentes cepas de un mismo serotipo también generan observaciones diferentes, por ejemplo, diferentes aislados de DENV-1 inoculados por vía intravenosa (IV) tienen diferentes tropismos en ratones BALB/c dependiendo de la gravedad del aislado. Específicamente, aislados de pacientes con SCD presentan un tropismo marcado hacia el SNC encontrándose así genoma viral en el cerebro de los ratones infectados desde el día 3 PI (Tuiskunen et al., 2011).

Aunque los ratones inmunocompetentes no desarrollan signos de la enfermedad, sí generan permeabilidad de BHE e incluso tropismo hacia el sistema nervioso central por lo que pueden

representar un buen modelo para estudiar estos fenómenos específicos durante el contexto de la infección por DENV.

Planteamiento del Problema

Los reportes de casos graves de infección por Flavivirus con consecuencias en el sistema nervioso central son cada vez más frecuentes, por lo que es importante poder identificar los posibles mecanismos de neuropatogénesis con el propósito de evitar la propagación de estos virus hacia el cerebro, y a su vez, evitar la aparición de secuelas neurológicas.

En el caso del DENV, se sabe que cepas neurovirulentas infectan diferentes células, incluyendo las células endoteliales de microvasculatura cerebral, lo que podría promover respuestas patológicas en tejidos o células adyacentes. La activación de estas células, como consecuencia de la infección por DENV, podría promover la generación de diversos productos de activación (como las micropartículas), o la desregulación de las proteínas de unión intercelular y de adhesión (ICAM-1 y P-selectina), lo que podría afectar de forma directa o indirecta a las células del sistema nervioso central.

Teniendo en cuenta que las micropartículas endoteliales tienen un papel importante en el establecimiento o resolución de desórdenes del sistema nervioso central, se evaluará la capacidad de activación del DENV en células endoteliales de vasculatura cerebral (HBEC-5i) y su efecto en la expresión de proteínas de unión intercelular (ICAM-1 y P-selectina). Se determinará la presencia e influencia de sus productos de activación (micropartículas) en la permeabilidad de barrera hematoencefálica en un modelo in vivo. Así, se podrán elucidar algunos mecanismos involucrados en la neuropatogénesis durante la infección con DENV, que podrían ser importantes también para otros Flavivirus encefalitogénicos.

Con base en estos antecedentes, se propuso la hipótesis de trabajo que se presenta a continuación.

Hipótesis

Las células endoteliales de barrera hematoencefálica (HBEC-5i) infectadas con DENV pueden incrementar la producción de micropartículas, que podrían promover un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Objetivos

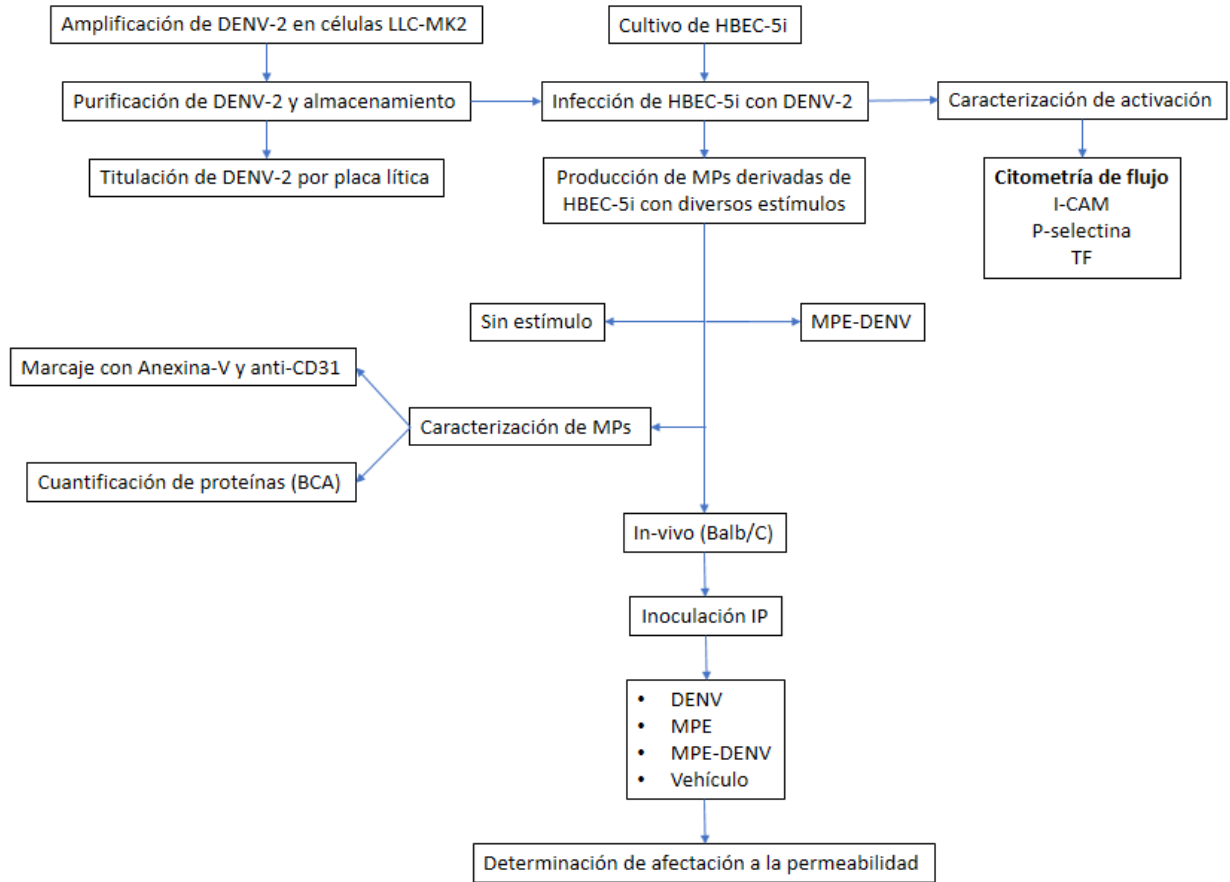
1. Objetivo General

Evaluar el efecto de las micropartículas endoteliales cerebrales derivadas de células infectadas con DENV (MPE-DENV) en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

2. Objetivos específicos

- Determinar si las células HBEC-5i son susceptibles a infección con DENV.
- Evaluar la activación de HBEC-5i estimuladas con DENV, determinada por la expresión de P-Selectina, TF e I-CAM.
- Evaluar la producción de MP a partir de HBEC-5i estimuladas con DENV por citometría de flujo.
- Caracterizar las MP derivadas de células HBEC estimuladas con DENV por citometría de flujo (detección de fosfatidilserina y CD31).
- Evaluar la permeabilidad endotelial durante la estimulación con MPE-DENV en ratones Balb/c por extravasación de Na-FITC y Azul de Evans.

Diseño Experimental



Materiales y Métodos

1. Cultivo celular

Las células LLC-MK2 (ATCC® CCL-7.1™) (células de riñón de Mono Rhesus) se cultivaron en medio DMEM suplementado con SFB al 10%.

Las células HBEC-5i (ATCC® CRL-3245™) (células endoteliales de microvasculatura de cerebro humano) se cultivaron en medio DMEM: F12 suplementado con SFB al 10% y 40µg/mL de suplemento de crecimiento endotelial (ECGS).

2. Amplificación, obtención y titulación del virus Dengue

Se cultivaron células LLC-MK2 (ATCC® CCL-7.1™) hasta formar una monocapa con una confluencia aproximada del 85% en una caja de cultivo F-75. Se desechó el medio y se agregaron 250 µL de una solución viral del virus Dengue, serotipo 2, cepa Nueva Guinea C. (DENV-2 NGC) con un título desconocido (aproximadamente a una MOI -multiplicidad de infección-de 0.1). Posteriormente, se agregaron 4.75 mL de medio DMEM sin suplementar y se dejó en la incubadora a 37°C y 5.0% de CO₂. Después de dos horas, se retiró el medio agregado previamente y se agregaron aproximadamente 25 mL de medio nuevo suplementado al 2.5% con suero fetal bovino (SFB). Nuevamente se introdujo en la incubadora y se dejó durante 8 días o hasta observar efecto citopático. Pasado este tiempo, las células se sometieron a dos ciclos de congelado/descongelado con el fin de lisar las células y liberar su contenido. Posteriormente, con un raspador de células se frotaron las paredes de la caja de cultivo hasta no observar células adheridas. Con el fin de purificar el virus, se centrifugó la suspensión celular a 3,500 rpm con el fin de eliminar el detritus celular. Por último, del sobrenadante se tomaron alícuotas de 500 mL y se guardaron a -70°C hasta el momento de la titulación.

Para la titulación del virus, se sembraron células LLC-MK2 con 1 mL de medio DMEM suplementado al 10% con SFB en una caja de cultivo de 12 pozos hasta formar una monocapa con una confluencia del 100%. Alternamente, se prepararon 11 diluciones en serie del virus previamente recolectado con un factor de dilución de 10, generando así 11 soluciones con factores de dilución de 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ y 10¹¹ en medio DMEM sin suplementar. Después, se retiró el medio de cada uno de los pozos, se lavó dos veces con PBS y se agregaron 400 µL de cada dilución a cada pozo. Para esto, se empezó desde la solución más diluida hasta la más concentrada, utilizando como control negativo medio sin suplementar.

La caja se puso en la incubadora durante 2 horas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Posteriormente se retiró el medio, se lavó nuevamente con PBS y se agregaron 2 mL de DMEM no suplementado con metilcelulosa aproximadamente al 3%. La caja se incubó nuevamente hasta observar el efecto citopático (aproximadamente 2 semanas).

Después de este periodo de incubación, se retiró el medio y se lavó varias veces con PBS hasta eliminar la metilcelulosa. Se fijaron las células con metanol puro, que posteriormente fue eliminado por evaporación. Posteriormente, las monocapas fueron teñidas con cristal violeta por 15 minutos, se retiró el colorante sobrante y se lavó con agua de la llave.

Con ayuda de un microscopio, se contaron las placas virales obtenidas en cada uno de los pozos y se eligió la mayor dilución en la que el número de placas estaba bien diferenciado, para los cálculos de unidades formadoras de placa.

3. Análisis de infección de células endoteliales humanas de cerebro (HBEC-5i)

Las células HBEC-5i fueron cultivadas según las especificaciones de ATCC. Con el fin de determinar la permisividad de estas células para la infección con DENV-2, se realizó una cinética de infección con MOIs de 1 y 5, y tiempos de infección de 72 y 96 horas. Para esto, el medio de las células de una botella F-75 fue retirado y las monocapas se lavaron con buffer salino de fosfatos de Dulbecco (D-PBS) y se despegaron con tripsina al 0.25% en EDTA 0.53 mM. Estas células fueron sembradas en cajas de 6 pozos (aproximadamente 200,000 células por pozo). Después de 48 horas, el medio fue retirado y las células fueron contadas e infectadas con DENV-2 en medio sin suplementar a diferentes MOI. Las células fueron incubadas durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ y el inóculo fue removido. Se agregaron 3 mL de medio nuevo y se incubaron las diferentes cajas de cultivo durante 72 y 96 h.

Después de cumplido el tiempo de infección determinado, se retiró el medio y las monocapas fueron lavadas con PBS IX (10 g de NaCl, 1 g de KCl, 13.5 g de Na₂HPO₄ 7H₂O y 1.2 g de KH₂PO₄ en 1 L de agua miliQ a pH 7.3 para PBS 5X). Posteriormente, se agregaron 500 uL de tripsina y se dejó durante 5 segundos. La tripsina fue retirada y se agregó 1 mL de PBS IX frío a cada pozo. Las cajas fueron puestas a 4°C durante 10 minutos y se recolectaron las células en tubos eppendorf de 1 mL. Estas células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y el pellet fue resuspendido en PBS IX y centrifugado nuevamente. El pellet obtenido fue resuspendido en un buffer de fijación con paraformaldehído (PFA) al 2% en PBS (pH 7.4) y almacenado a 4°C durante 10-15 minutos. Pasado este tiempo, el pellet fue lavado con PBS nuevamente y se resuspendió en PBS hasta la conjugación con el anticuerpo primario.

Cuando las células de todos los ensayos a diferentes tiempos estuvieron fijadas y resuspendidas en PBS, se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en una solución de bloqueo con BSA al 1% en PBS durante 30 minutos a 4°C. Después se centrifugó nuevamente y el pellet se resuspendió en 100 µL de una dilución 1:500 del anticuerpo primario monoclonal anti-Dengue virus (MAB8705 de Millipore) en BSA al 0.5% en PBS. Se incubó durante toda la noche a 4°C y se centrifugó nuevamente. Se realizó un lavado con PBS para eliminar el anticuerpo libre y se resuspendió nuevamente en una dilución 1:500 del anticuerpo secundario policlonal de burro anti-ratón IgG conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 555 (A-31570 de Invitrogen) en BSA al 0.5% en PBS. Se incubó durante 2 horas a 4°C y, por último, se centrifugó y se resuspendió en PBS para analizar la infección por citometría de flujo.

Las muestras se leyeron en el Citómetro BD FACSCalibur™ y se analizaron con el programa FlowJo v10.1.

4. Activación de HBEC-5i por estimulación con virus Dengue

En 3 cajas de 6 pozos fueron sembradas aproximadamente 200,000 células HBEC-5i por pozo. Las cajas se incubaron durante 48 horas hasta alcanzar una confluencia del ~95% y se estimularon con DENV a MOI de 1 y 5. Las células tratadas fueron incubadas durante 24, 48 y 72 h a 37°C y 5% de

CO₂, y posteriormente, fueron despegadas con tripsina, fijadas con PFA 2% y almacenadas en PBS 1% hasta la conjugación con el anticuerpo.

Las células fijadas se bloquearon incubando con PBS/BSA al 1% durante 30 minutos a 4°C y se incubaron con el anticuerpo a la dilución estandarizada. El ab anti-Human CD54 (ICAM-1) conjugado con FITC de TONBO Biosciences (Cat. #35-0549) se utilizó con una dilución de 1:400, el ab anti-Human CD62P (P-selectina) conjugado con FITC de Santa Cruz Biotechnology (CTB201): sc-8419 se utilizó con una dilución de 1:300 y el ab anti Factor Tisular o TF (Cat. #4503) de American Diagnostica Inc. a la misma dilución. Todas las diluciones se realizaron en PBS/BSA 0.5%. La incubación se realizó durante 2 horas a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se hizo un lavado con PBS 1X y las células obtenidas se resuspendieron en 500µL de PBS 1X para ser analizadas por citometría de flujo.

La lectura de las muestras se realizó en el Citómetro BD FACSCalibur™ y los resultados se analizaron con el programa FlowJo v10.1.

5. Cinética de producción de micropartículas endoteliales derivadas de HBEC-5i

Las células HBEC se cultivaron de acuerdo a las especificaciones de ATCC. Brevemente, 200,000 células por pozo, fueron cultivadas en 3 cajas de 6 pozos e incubadas durante 48 horas hasta alcanzar una confluencia de ~95%. Las células fueron infectadas con DENV-2 NGC a MOI de 1 y de 5. Cada una de las cajas fue incubada durante 24, 48 y 72 h post-infección. Después de transcurrido el tiempo, el sobrenadante de las células fue almacenado y centrifugado a 500 g. El pellet fue descartado, y el sobrenadante fue ultracentrifugado durante 45 minutos a 18,000 g, con un rotor SW40Ti (10,060 rpm). El sobrenadante obtenido fue descartado y el pellet fue resuspendido en 200 µL de medio RPMI sin suplementar (Whewy, Latham, Combes, & Grau, 2014) y almacenado a -70°C hasta su análisis por citometría de flujo.

Las proteínas en las micropartículas fueron cuantificadas con el kit Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Cat. #23235).

6. Análisis de micropartículas endoteliales por citometría de flujo

Las MPE almacenadas previamente fueron caracterizadas por presencia de fosfatidilserina (FS) y CD31 (PECAM-1) en su superficie. Para esto, 10 µL de MPE fueron incubados con 40 µL de Anexina-V acoplada a FITC de Biolegend (Cat. #640906) a una dilución de 1:200 durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con agitación orbital (100 rpm). Cada muestra fue llevada a 500 µL con PBS 1X filtrado dos veces por membrana de 0.22 µm.

Por otro lado, 10 µL de MPE fueron incubados con 40 µL de solución de anticuerpo primario monoclonal anti-CD31 (PECAM-1) de Sigma-Aldrich (Cat. #P8590) a una dilución de 1:300 durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con agitación orbital (100 rpm). Posteriormente, a estas muestras se agregaron 40 µL de solución de anticuerpo secundario policlonal de burro anti-ratón IgG conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 555 de Invitrogen (Cat. #A-31570) a una dilución de 1:800 y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con agitación orbital (100 rpm). Cada muestra se llevó a 500 µL con PBS 1X filtrado 2 veces por membrana de 0.22 µm. Todas las muestras fueron leídas en el Citómetro BD FACSCalibur™.

Para la determinación de la población adecuada, se utilizó PBS 1X filtrado 2 veces por membrana de 0.22 μm como control para excluir el área de ruido electrónico. El área de análisis fue obtenida utilizando controles de tamaño de 0.1 μm (Latex beads, polystyrene 0.1 μm LB1 Sigma-Aldrich) y 1 μm (Microbead NIST Traceable Particle Size Standard 1.00 μm).

Los resultados se analizaron con el programa FlowJo v10.1.

7. Cuantificación de permeabilidad de barrera hematoencefálica in-vivo

7.1. Estandarización de condiciones

Se evaluó la permeabilidad de BHE in-vivo en ratones BALB/c de 20 g según el protocolo previamente reportado (Hurtado-Alvarado, Dominguez-Salazar, Velazquez-Moctezuma, & Gomez-Gonzalez, 2016). Brevemente, cada ratón fue inoculado por vía IP con el DENV previamente amplificado y titulado y con las MPE-DENV. Para este ensayo, se utilizó una n de 3 y se analizaron los siguientes grupos: control negativo (medio RPMI), DENV 1.12×10^4 (1.12×10^4 ufp), DENV 1.12×10^6 (1.12×10^6 ufp), MPE-DENV 2.76 μg (2.76 μg de proteína) y MPE-DENV 27.6 μg (27.6 μg de proteína).

A los 5 y 10 días PI, los ratones inoculados fueron anestesiados con sobredosis de pentobarbital sódico (0.1 mL, 0.063 g/kg de peso) por vía IP. Después de asegurar que los ratones estuvieran insensibilizados, se realizó una incisión torácica de 5mm para exponer el corazón. Posteriormente, se inyectó coctel de trazadores (Na-FITC 10 mg/mL y azul de Evans 1 mg/mL) en el ventrículo izquierdo y se dejó en circulación durante 3 minutos. Después de realizar un pequeño corte en la aurícula derecha, se perfundió con solución salina (0.9%) en el ventrículo izquierdo para lavar el exceso de trazador que no hubiera permeado en el tejido. Por último, el cerebro fue extraído y almacenado en oscuridad a -70°C hasta su análisis.

Para el análisis el cerebro se seccionó en tres partes: cerebelo, corteza y áreas subcorticales, y cada una de ellas se homogenizó en 300 μL de PBS. Posteriormente, se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue mezclado con 300 μL de metanol. Después de centrifugar nuevamente, el sobrenadante fue colectado y la absorbancia fue obtenida en el DTX 880 Multimode detector (Beckman Coulter) con el protocolo "Fluorescein Top Read (96)" a 485 nm y el protocolo "Rhodamine Top Read (96)" a 535 nm. Se determinó la cantidad de cada trazador presente en el tejido cerebral y se definió el tiempo de mayor permeabilidad como el momento en el que la concentración de trazador en el cerebro fuera mayor.

7.2. Cuantificación de permeabilidad de barrera hematoencefálica en diversas condiciones

Después de determinar las condiciones adecuadas de mayor permeabilidad tanto de tiempo como de concentración de estímulos, se cuantificó la permeabilidad de barrera en diferentes condiciones. Para este ensayo se utilizó una n de 3, y se utilizaron los siguientes grupos: control negativo (medio RPMI), DENV 1.12×10^4 (1.12×10^4 ufp), MPE-DENV 2.76 μg (2.76 μg de proteína), MPEb (MP extraídas de HBEC-5i sin infectar. 2.76 μg) y DENV + MPE-DENV (1.12×10^4 ufp + 2.76 μg de proteína).

Los ratones se inocularon y después del tiempo determinado previamente, se perfundieron con el coctel de trazadores y la solución salina. Los cerebros fueron extraídos y seccionados en diferentes

regiones (cerebelo, corteza y regiones subcorticales) y se almacenaron a -70°C hasta su análisis, cuando fueron homogenizados, centrifugados y analizados como se nombró previamente.

Resultados

1. Amplificación, obtención y titulación del virus Dengue

El virus del Dengue DENV-2 NGC se amplificó en células epiteliales de riñón de mono verde (LLC-MK2). El efecto citopático característico de la infección con DENV para estas células se observó 8 días post infección (PI). Se generaron sincicios derivados de la formación de “células gigantes” multinucleadas con apariencia irregular y se observó desprendimiento de células, lo que llevó a la generación de espacios vacíos en la monocapa (figura 22).



Figura 21. Efecto citopático de DENV-2 NG en LLC-MK2 8 días PI. **Izquierda:** control. Se observa una monocapa confluyente de células adherentes. **Derecha:** cultivo infectado. Se forman sincicios y espacios sin crecimiento de células.

Para la obtención del virus las células fueron lisadas con ciclos de congelación-descongelación, con el objeto de recuperar la mayor cantidad de virus posible. La suspensión celular fue centrifugada a 3500rpm para separar el detritus celular de los viriones, y el sobrenadante fue almacenado a -70°C . Después de su purificación, el virus se tituló por ensayo de placa lítica. Las placas observadas corresponden a células que se han desprendido de la monocapa, y como el medio está inmovilizado con metilcelulosa, se determina que cada placa se formó por una progenie viral que infectó una célula, y al replicarse, los nuevos viriones generados infectaron las células adyacentes. Con el número de placas formadas por cada dilución del DENV, se calcula el título viral. En este caso, por duplicado, se encontraron 4 y 5 placas a un factor de dilución de 10^5 (figura 23).

Teniendo en cuenta que se habían utilizado $400\ \mu\text{L}$ de solución viral, es posible calcular la cantidad de unidades formadoras de placa por mL. En este caso, el factor de corrección por volumen fue de 2.5. El número de placas se obtiene del promedio de las placas encontradas en ambas cajas del duplicado y, con estos valores, se halló el título viral utilizando la siguiente fórmula:

$$ufp/mL = (\text{No. de placas})(\text{Factor de dilución})(\text{Factor de corrección por volumen})$$

$$ufp/mL = (4.5)(10^5)(2.5)$$

$$ufp/mL = 1.12 \times 10^6$$

Esto quiere decir que el virus obtenido, presenta un título viral de 1.12×10^6 unidades formadoras de placa (ufp) por mililitro.

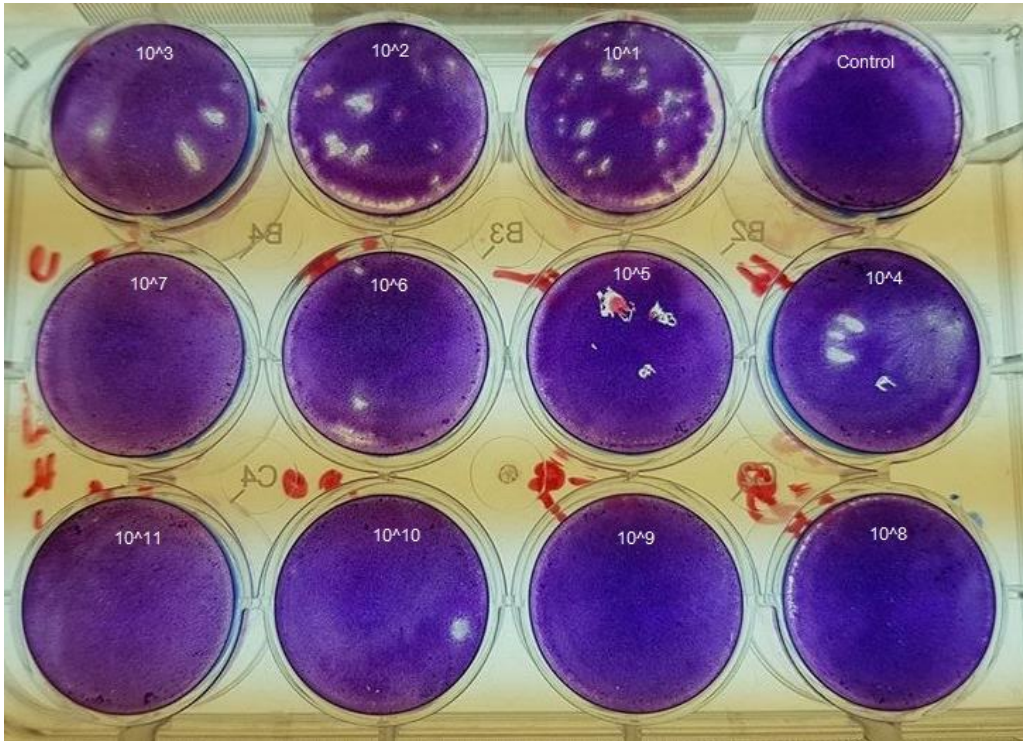


Figura 22. Ensayo de placa lítica para DENV-2 NGC. En la dilución de 10^6 se observa la formación de placas líticas como consecuencia del efecto citopático del virus.

2. Infección de HBEC-5i

Con el objetivo de evaluar la permisividad de infección del endotelio vascular cerebral, las células HBEC-5i fueron infectadas con el DENV a diferentes multiplicidades de infección (MOI) y a diferentes tiempos post-infección (PI). Para esto, las células de un pozo (de una caja de 6 pozos) fueron tripsinizadas y contadas, con el fin de determinar la cantidad de virus a utilizar para los siguientes ensayos. Se encontraron aproximadamente 600,000 células en cada pozo y a partir de este número se hicieron los cálculos para determinar la cantidad de DENV-2 NGC a utilizar para alcanzar las MOI deseadas.

Las células HBEC-5i fueron infectadas con MOI de 1 y 5. En diferentes ensayos, se observó que antes de las 72 h no se presentó efecto citopático, ni se observaban intensidades de fluorescencia específicas para DENV mediante citometría de flujo lo que indica que posiblemente durante este tiempo las células son resistentes a la infección (datos no mostrados). Por esta razón, se incrementó el tiempo de análisis hasta 96 h PI.

En la figura 24, se puede observar el porcentaje de HBEC-5i DENV+ a 72 y 96 h PI. Como eran tiempos largos de análisis, para mantener el cultivo en buenas condiciones se cambió 1 mL diario de medio con el fin de evitar estrés celular. Así, se observó que a las 96 h PI con MOI de 1 y 5, un 2.76 y 3.01% de células estaban infectadas, respectivamente.

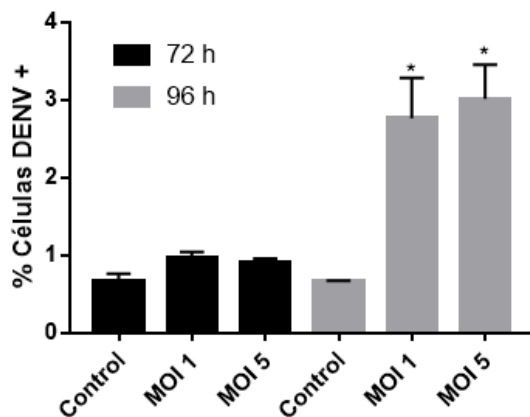


Figura 23. Porcentaje de células DENV + ($p < 0.05$). A las 96 h PI se detectan células HBEC-5i infectadas que expresan antígeno viral en su superficie con MOI de 1 y 5.

3. Activación de HBEC-5i por estimulación con virus Dengue

Para evaluar si las células HBEC-5i responden a estímulos sobre-expresando moléculas de adhesión presentes en células endoteliales, se evaluó la capacidad de respuesta de éstas, utilizando como control positivo TNF α . Este estímulo de activación se dejó durante 24 horas y se determinó la expresión de I-CAM y P-Selectina (figura 25). En este caso, se observó que el endotelio cerebral expresa ICAM-1 constitutivamente y que esta molécula aumenta su expresión durante su activación en presencia de TNF α . Por otro lado, P-selectina únicamente se expresa en células activadas. Como el aumento de expresión de I-CAM (24.63%) fue mucho mayor que el aumento de expresión de P-Selectina (1.11%), se utilizó I-CAM como marcador de activación para los ensayos siguientes.

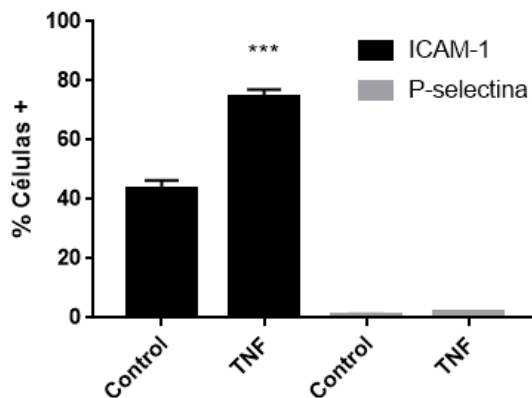


Figura 24. Porcentaje de células ICAM-1+ y P-Selectina + en respuesta a 70 ng por pozo de TNF α ($p = 0.0002$). El porcentaje de células que expresan ICAM-1 por estímulo con TNF α es significativamente mayor en comparación con el control.

El área de análisis para determinar la población ICAM-1 + se determinó utilizando como control negativo células sin marcaje y sin estimulación (figura 26).

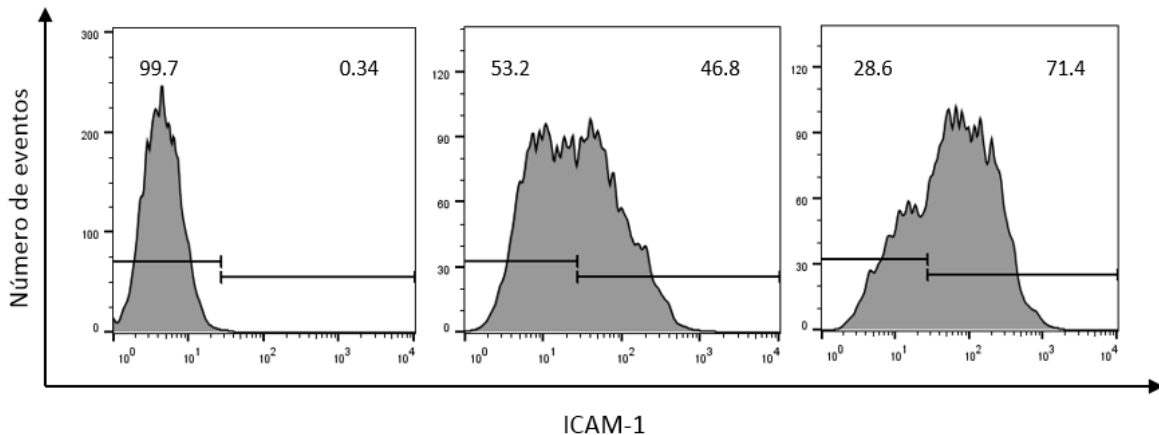


Figura 25. Determinación de población ICAM-1 positiva y negativa con porcentajes. De izquierda a derecha: HBEC-5i sin anticuerpo, HBEC-5i sin estímulo (control) y HBEC-5i con TNF α (70ng por 600,000 células).

Para determinar si el DENV activa las células HBEC-5i, los cultivos se estimularon con DENV con MOI de 1 y de 5, y se observó que desde las 24 h PI ICAM-1 se sobre-expresa considerablemente con una MOI de 5 (31.35% células expresan ICAM-1 en comparación al 19.1% del control, figura 27) y que esta sobre-expresión continúa hasta las 72 h PI. Esto quiere decir que desde las 24 h PI las células ya se encuentran activadas, favoreciendo la generación de productos de activación como las MP.

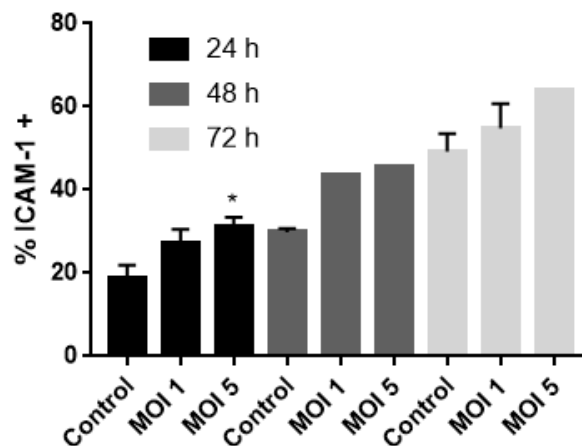


Figura 26. Expresión de I-CAM en HBEC-5i frente a estímulo con diferentes concentraciones de DENV (MOI 1 y 5) a diferentes tiempos PI (24 a 72 h) ($p < 0.05$). En todos los casos, el porcentaje de ICAM-1 expresado por células infectadas, fue mayor que el control.

La activación de las células a las 24 h PI posterior a la estimulación con DENV a MOI 5 fue caracterizada mediante la expresión del receptor de activación endotelial denominado Factor Tisular ó TF, por la expresión de P-selectina y de ICAM-1 (figura 28). Se encontró que las HBEC-5i expresan TF constitutivamente en niveles basales (42.65%) que se sobre-expresa posteriormente a la estimulación con DENV (46.55%), al igual que para ICAM-1. La expresión de P-selectina no se incrementó con el estímulo.

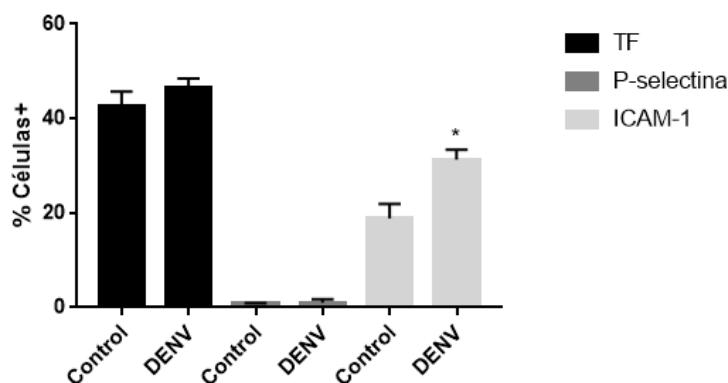


Figura 27. Expresión de TF, P-selectina e ICAM-1 24 h PI con DENV ($p < 0.05$). La expresión de ICAM-1 es significativamente mayor en células infectadas con DENV en comparación con células no infectadas.

4. Cinética de producción de micropartículas endoteliales derivadas de HBEC-5i

Para determinar a qué tiempo PI y con qué MOI se genera la mayor cantidad de MP derivadas únicamente por la estimulación con DENV, se infectaron las células con MOI de 1 y de 5. Las MPE fueron extraídas y se analizaron de acuerdo a su tamaño con el Citómetro FACSCalibur. Teniendo en cuenta que las MP comprenden tamaños de 0.1 a 1 μm , fue necesario estandarizar los límites de detección en el citómetro de flujo para eliminar señales inespecíficas.

Para establecer el área de análisis de MPE se utilizaron perlas de poliestireno de 0.1 μm y de 1 μm . Adicionalmente, se usó PBS 1X filtrado dos veces para determinar el área de señales inespecíficas o ruido electrónico. En la figura 29, se pueden observar en color azul las perlas de 1 μm y en color rojo las perlas de 0.1 μm . Como las MP oscilan entre este rango de tamaño, estas perlas son un buen control para determinar el área de análisis. Además, las señales de granularidad inferiores a 10^1 obtenidas por la lectura de PBS 1X filtrado dos veces, se eliminaron del análisis con el fin de disminuir resultados inespecíficos.

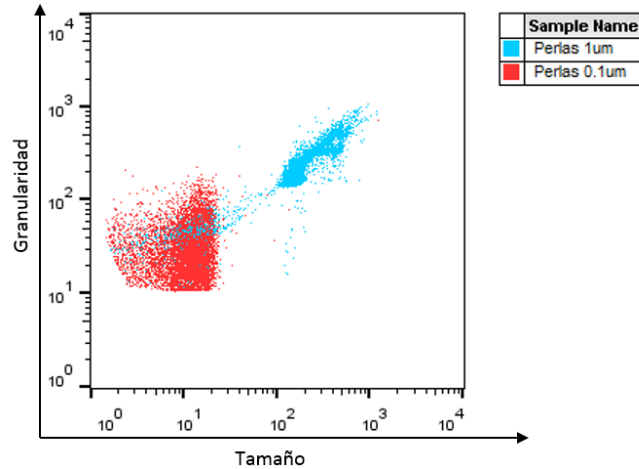


Figura 28. Determinación de área de análisis de MPE en Citómetro FACSCalibur. En azul, detección de partículas de 1 μm . En rojo, detección de partículas de 0.1 μm .

Durante el análisis se adquirieron 10,000 eventos en total y se determinó su porcentaje respecto al número total de eventos (figura 30). Como se puede observar, a las 24 h con una MOI de 5 se alcanza el mayor porcentaje de MP (13.1%) en comparación con el control (2.33%) lo que sugiere una respuesta de activación aguda. Esto indica que a las 24 h PI es cuando mayor cantidad de MP se producen como resultado del estímulo específico del DENV.

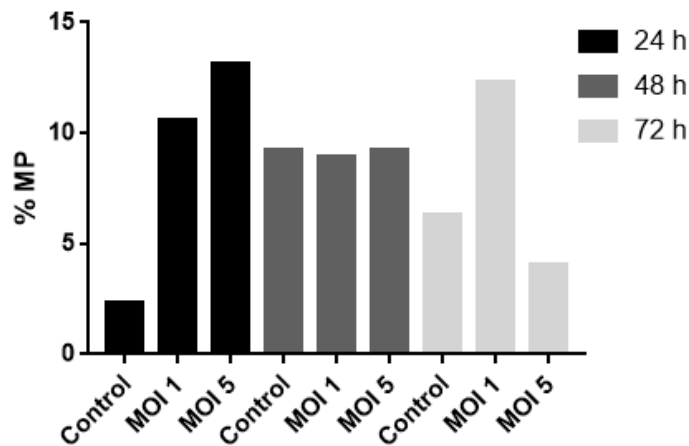


Figura 29. Porcentaje de MP producidas por infección con diferentes concentraciones de DENV (MOI 1 y 5) a diferentes tiempos PI (24 a 72 h).

Para los siguientes análisis, se determinaron las dosis de MP a utilizar con el kit Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Las MP derivadas de células infectadas con DENV con una MOI de 5, 24 h PI producidas por 4'000,000 de células HBEC-5i correspondieron a 276 \pm 20 μg de proteína.

5. Análisis de micropartículas endoteliales por citometría de flujo

Con el objetivo de caracterizar a las MP, se determinó la presencia de fosfolípidos aniónicos como FS (con Anexina-V), presentes en células activadas, así como de PECAM-1 (con anti-CD31), el cual es un marcador de origen endotelial en la superficie celular. En la figura 31, se puede observar el porcentaje de MP FS + derivadas de la estimulación con DENV. A las 24 h PI con una MOI de 5 se genera la mayor cantidad de MPE FS + (10.4%) como consecuencia del estímulo con DENV, en comparación con el control (4.41%). Cabe anotar que, aunque a las 48 h PI el porcentaje de MPE FS+ generadas a partir de la estimulación con DENV con MOI de 5 es alto (13.5%), el control de este tiempo de análisis también presenta un porcentaje incrementado (9.7%) en comparación con el control a las 24 h PI, lo que indica que a las 48 h PI hay mayor producción de MPE, no solo debido al estímulo con DENV sino a acumulación en el medio o activación celular por estímulo del sobre crecimiento en el cultivo.

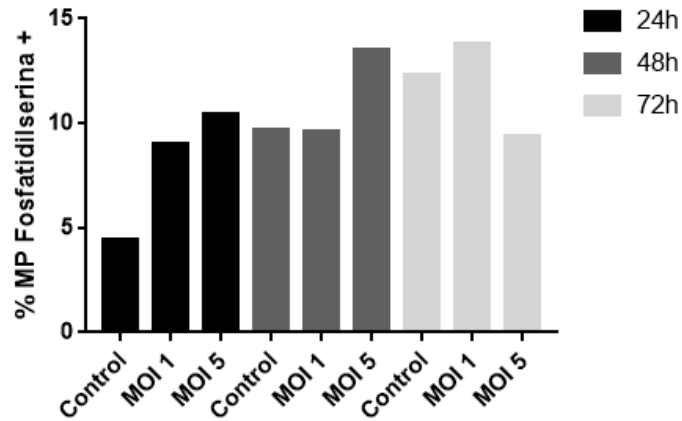


Figura 30. Porcentaje de MP FS + producidas por infección con diferentes concentraciones de DENV (MOI 1 y 5) a diferentes tiempos PI (24 a 72 h).

Respecto a la identificación de las MP por su origen, se utilizó como marcador PECAM-1 o CD31. En la figura 32, se pueden observar los porcentajes de MP CD31+ derivados de células sin y con estímulo (DENV MOI 1 y 5). En todas las condiciones, se generaron MP CD31+ por lo que se puede confirmar que son de origen endotelial que, como se observó anteriormente, también expresan FS en su superficie, presente en células activadas. A las 24 h PI se encontró un alto porcentaje de MPE CD31+ (11.5%) en comparación con el control (4.05%). Cabe anotar que, aunque hay un alto porcentaje de MPE CD31+ a las 48 h PI, este porcentaje podría deberse a acumulación de MPE en el medio o a producción debida a activación celular inespecífica, como se observó en la figura 31, por lo que los tiempos cortos de análisis (24 h PI) son más adecuados para la obtención de MPE generadas a partir de la estimulación con DENV.

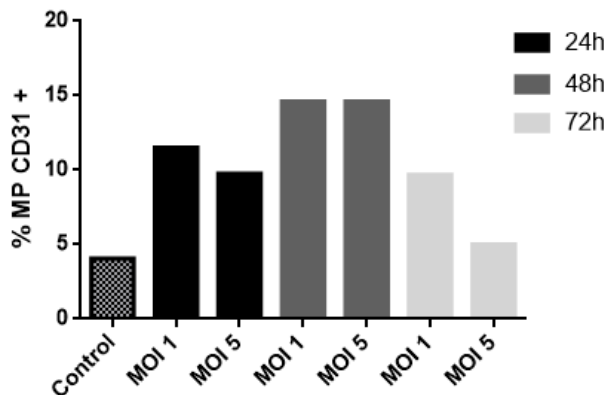


Figura 31. Porcentaje de MP CD31+ generadas por infección con diferentes concentraciones de DENV (MOI 1 y 5) a diferentes tiempos PI (24 a 72 h).

6. Cuantificación de permeabilidad de barrera hematoencefálica in-vivo

6.1. Estandarización de condiciones

Para determinar las condiciones experimentales del modelo murino de permeabilidad de barrera hematoencefálica (BHE), se utilizaron ratones Balb/c de 20 g, como se mencionó previamente (ver materiales y métodos), según el protocolo reportado (Hurtado-Alvarado et al., 2016). Brevemente, 6 ratones por condición fueron inoculados con dos concentraciones de cada estímulo: control negativo (medio RPMI), DENV 1.12×10^4 (1.12×10^4 ufp), DENV 1.12×10^6 (1.12×10^6 ufp), MPE-DENV 2,76 μ g (micropartículas derivadas de células endoteliales infectadas con DENV, 2,76 μ g de proteína) y MPE-DENV 27,6 μ g (27,6 μ g de proteína). La permeabilidad de BHE fue analizada en dos tiempos PI (5 y 10 días PI) para determinar las condiciones de análisis para los ensayos siguientes. A los 5 o 10 días PI, los ratones fueron perfundidos con un coctel de trazadores de Na-FITC y Azul de Evans, y sus cerebros fueron extraídos y divididos por regiones para el análisis (cerebelo, corteza y áreas subcorticales). Después de obtener el tejido y de procesarlo para extraer los trazadores, se construyó una curva patrón con concentraciones conocidas obtenidas de diluciones en serie de ambos trazadores para determinar la cantidad de trazadores en el tejido (figura 33).

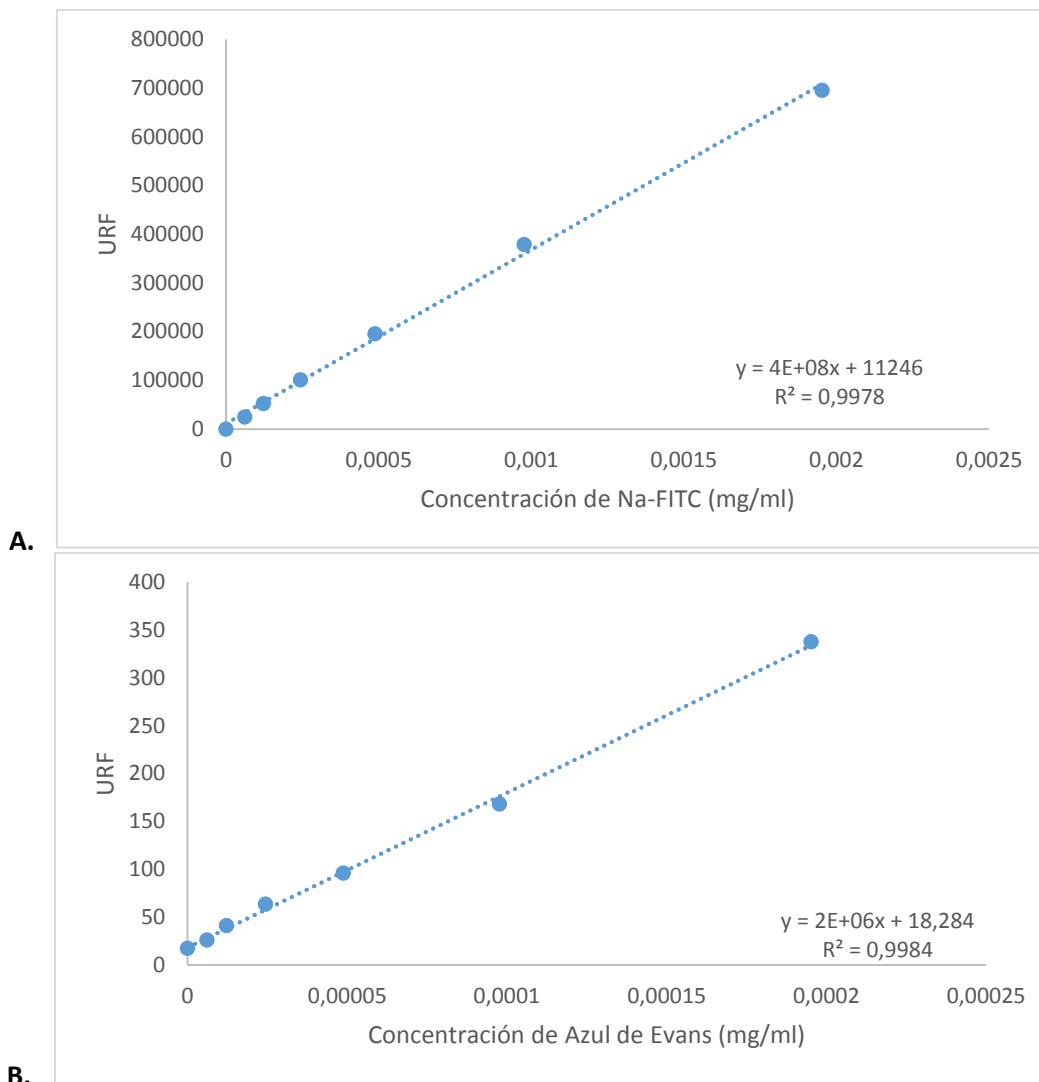


Figura 32. Curvas de calibración de los trazadores utilizados para los análisis de permeabilidad, con ecuaciones de recta (y) y coeficiente de correlación (r^2). **URF:** Unidades relativas de fluorescencia.

A. Na-FITC. **B.** Azul de Evans.

Obteniendo las ecuaciones de recta para ambos trazadores, se calcularon las concentraciones de Na-FITC y Azul de Evans de cada una de las regiones cerebrales analizadas. Para esto, se determinó la fluorescencia de cada muestra por triplicado obteniéndose así 3 lecturas de URF (unidades relativas de fluorescencia) para cada región del cerebro en cada uno de los sujetos de análisis. Con estos valores, se calculó la concentración de trazadores en cada muestra, y teniendo en cuenta el peso (g) del tejido extraído, se determinó la cantidad de trazador (μg) por gramo de cerebro. Las cantidades de Na-FITC y Azul de Evans en el cerebelo, la corteza y las áreas subcorticales de cada población de análisis se pueden observar en las figuras 34, 35 y 36, respectivamente.

En el cerebelo, los valores más altos de permeabilidad, tanto para Na-FITC como para Azul de Evans, se encontraron al quinto día PI con las concentraciones más bajas de MPE-DENV y DENV ($2.76 \mu\text{g}$ de

proteína y 1.12×10^4 ufp, respectivamente). Como se puede observar en la figura 34, la cantidad de Na-FITC que atravesó la BHE como consecuencia de la estimulación con MPE-DENV 2.76 μg (7.29 $\mu\text{g/g}$) fue significativamente diferente a la del control (1.32 $\mu\text{g/g}$) durante el día 5 PI. Así mismo, para Azul de Evans también hubo una diferencia significativa entre la población con MPE-DENV 2.76 μg (1.13 $\mu\text{g/g}$) y la población control (0.19 $\mu\text{g/g}$) a los 5 días PI. Cabe anotar que la estimulación con DENV en ambas concentraciones (1.12×10^4 y 1.12×10^6 ufp), no alcanzó los valores de permeabilidad observados por las MPE-DENV 2.76 μg , e incluso, hubo una diferencia significativa entre las concentraciones de ambos trazadores presentes en los cerebros de los ratones inoculados con MPE-DENV 2.76 μg y la dosis más alta de DENV (1.12×10^6 ufp). En contraste, durante el día 10 PI los valores más altos de permeabilidad se observaron en la población infectada con DENV 1.12×10^4 ufp (6.60 $\mu\text{g/g}$ de Na-FITC y 1.16 $\mu\text{g/g}$ de Azul de Evans). En este caso, no hubo diferencia entre la cantidad de trazadores que ingresaron a la BHE como consecuencia de la estimulación con ambas concentraciones de MPE-DENV.

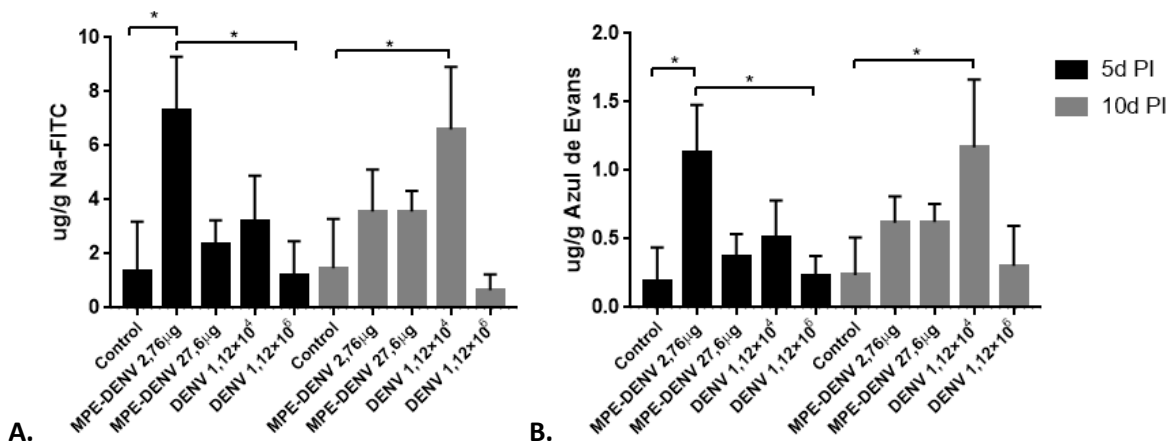


Figura 33. Cantidad de trazadores en el cerebelo de ratones inoculados con MPE-DENV (2.76 μg y 27.6 μg) y DENV (1.12×10^4 ufp y 1.12×10^6 ufp), analizados a 5 y 10 días PI. **A.** Na-FITC. **B.** Azul de Evans. ($p < 0.05$)

A diferencia del cerebelo, en la corteza se alcanzaron los valores mayores de permeabilidad a los 10 días PI con MPE-DENV 27.6 μg (10.38 $\mu\text{g/g}$ de Na-FITC y 1.61 $\mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) en comparación con el control (2.33 $\mu\text{g/g}$ de Na-FITC y 0.34 $\mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) (figura 35). Durante el día 5 se observó un incremento en la permeabilidad para Na-FITC y Azul de Evans en los ratones inoculados con MPE-DENV 2.76 μg (7.28 $\mu\text{g/g}$ de Na-FITC y 1.07 $\mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) con respecto a los controles. Además, se observó que en esta región la susceptibilidad al DENV es mayor ya que solamente aumenta la permeabilidad a ambos trazadores (4.43 $\mu\text{g/g}$ de Na-FITC y 0.72 $\mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) con la dosis alta (1.12×10^6 ufp).

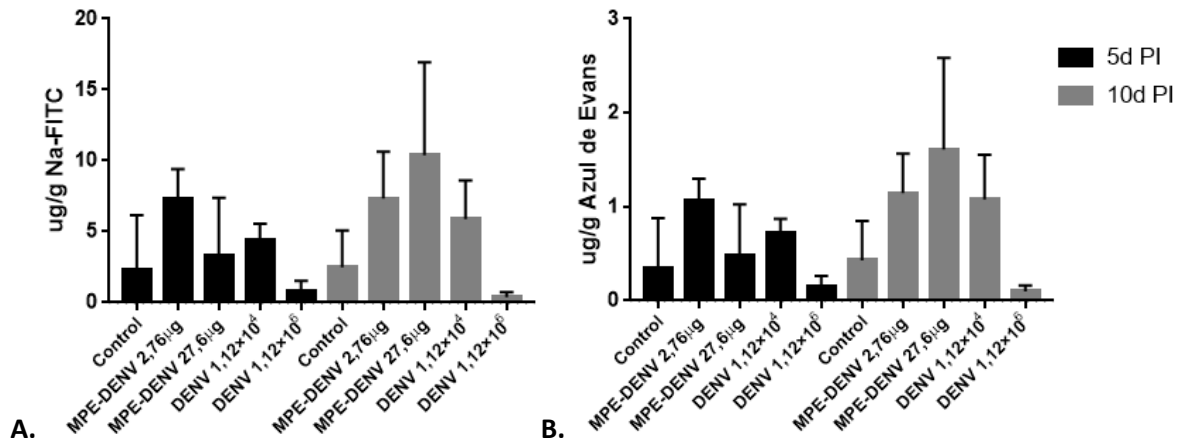


Figura 34. Cantidad de trazadores en corteza de ratones inoculados con MPE-DENV (2.76 μg y 27.6 μg) y DENV (1.12 × 10⁴ ufp y 1.12 × 10⁶ ufp), analizados a 5 y 10 días PI. **A.** Na-FITC. **B.** Azul de Evans.

Para las áreas subcorticales se encontraron resultados similares a los resultados observados en el cerebelo. En este caso, los mayores valores de permeabilidad fueron observados durante el día 5 PI en ratones estimulados con MPE-DENV 2.76 μg (3.48 μg/g de Na-FITC y 0.59 μg/g de Azul de Evans) en comparación con los controles (0.84 μg/g de Na-FITC y 0.16 μg/g de Azul de Evans). En esta región hubo diferencias incluso más significativas entre los valores de permeabilidad generados por inoculación de MPE-DENV 2.76 μg/g y las dos concentraciones de DENV. Los ratones infectados con DENV 1.12 × 10⁴ ufp tuvieron concentraciones de 1.97 μg/g y 0.36 μg/g para Na-FITC y Azul de Evans, mientras que con la concentración mayor de DENV (1.12 × 10⁶ ufp) se obtuvieron valores de 0.54 μg/g y 0.09 μg/g, en el mismo orden. Cabe anotar que, aunque en el día 10 se obtuvieron concentraciones altas de permeabilidad en esta región con MPE-DENV 27.6 μg (2.79 μg/g de Na-FITC y 0.51 μg/g de Azul de Evans) y DENV 1.12 × 10⁴ ufp (2.56 μg/g de Na-FITC y 0.55 μg/g de Azul de Evans), en el grupo control también se obtuvieron altos valores de ambos trazadores en las áreas subcorticales (1.60 μg/g de Na-FITC y 0.30 μg/g de Azul de Evans), por lo que no se puede asegurar que los estímulos hayan promovido el aumento de permeabilidad observado.

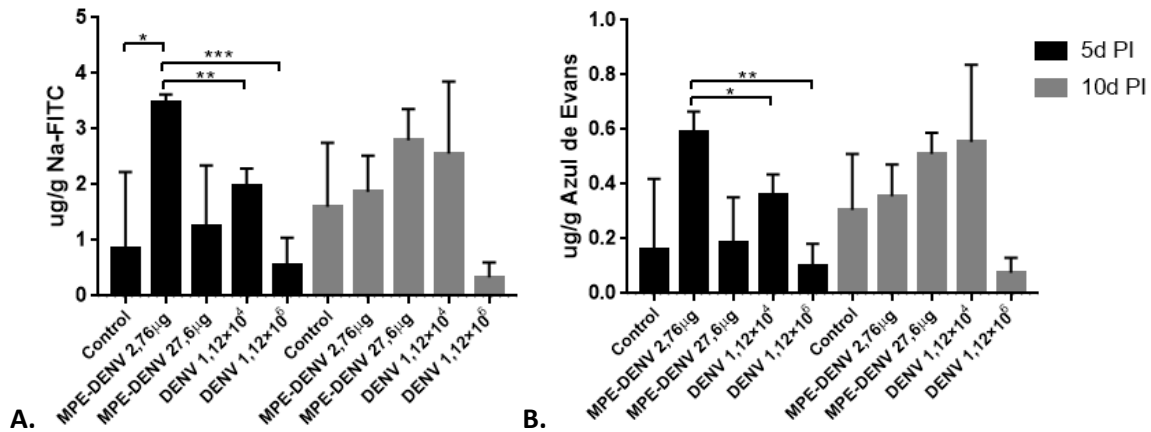


Figura 35. Cantidad de trazadores en áreas subcorticales de ratones inoculados con MPE-DENV (2.76 μg y 27.6 μg) y DENV (1.12 × 10⁴ ufp y 1.12 × 10⁶ ufp), analizados a 5 y 10 días PI. **A.** Na-FITC. **B.** Azul de Evans. (* p < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.001)

En resumen, durante el día 5 PI se genera una mayor permeabilidad de BHE para Na-FITC y Azul de Evans en cerebelo y áreas subcorticales con la concentración menor de MPE-DENV (2.76 μg de proteína) y la dosis menor de DENV (1.12 × 10⁴ ufp), mientras que en la corteza se genera mayor permeabilidad al día 10 PI con la concentración más alta de MPE-DENV (27.6 μg de proteína). Con el fin de disminuir resultados inespecíficos, y teniendo en cuenta que las diferencias más significativas se encontraron entre los controles y los grupos estimulados tanto con DENV como con MPE-DENV a los 5 días PI, los siguientes análisis se llevaron a cabo utilizando únicamente este tiempo PI.

6.2. Cuantificación de permeabilidad de barrera hematoencefálica en diversas condiciones

Para caracterizar el aumento de permeabilidad observado durante el día 5 PI en la estandarización de condiciones para el modelo murino (figuras 34, 35 y 36), se siguió el protocolo de perfusión y análisis mencionado anteriormente. En este caso, 3 ratones por cada condición fueron inoculados con las concentraciones determinadas previamente (MPE-DENV 2.76 μg y DENV 1.12 × 10⁴ ufp). Los grupos analizados fueron: control negativo (medio RPMI), DENV 1.12 × 10⁴ (1.12 × 10⁴ ufp), MPE-DENV 2.76 μg (2.76 μg de proteína), MPEb (MP extraídas de HBEC-5i sin infectar) y DENV + MPE-DENV (1.12 × 10⁴ ufp + 2.76 μg de proteína). Con curvas de calibración como las observadas en la figura 33, se calcularon las concentraciones de Na-FITC y Azul de Evans en el cerebelo, corteza y áreas subcorticales de los ratones de cada grupo de análisis (figuras 37, 38 y 39).

En el cerebelo se pudo observar que la concentración de Na-FITC y Azul de Evans que atraviesa la BHE es mayor en los ratones inoculados con MPE-DENV 2.76 μg (7.29 μg/g de Na-FITC y 1.13 μg/g de Azul de Evans) que, en los otros grupos, incluso los inoculados con MPE-DENV y DENV (7.01 μg/g de Na-FITC). Aun así, en los ratones también inoculados con MPE-DENV y DENV, se obtuvo una concentración ligeramente mayor de Azul de Evans en el cerebelo (1.22 μg), que para el grupo de MPE-DENV, lo que podría indicar que la mezcla de MPE-DENV y DENV incrementa la permeabilidad a proteínas, debido al tamaño de este trazador. Respecto a los ratones inoculados con MPEb (3.27

$\mu\text{g/g}$ de Na-FITC y $0.56 \mu\text{g/g}$ de Azul de Evans), se pudo observar que no se genera un aumento de la permeabilidad tan alto como el que se genera por las MPE-DENV, lo que indica que el efecto observado es, principalmente, debido a la presencia de MPEb derivadas de células infectadas con DENV (MPE-DENV). Cabe anotar que la mezcla MPE-DENV + DENV genera un aumento de permeabilidad ($7.01 \mu\text{g/g}$ de Na-FITC y $1.22 \mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) significativamente mayor al del DENV, en ambos trazadores ($3.20 \mu\text{g/g}$ de Na-FITC y $0.51 \mu\text{g/g}$ de Azul de Evans).

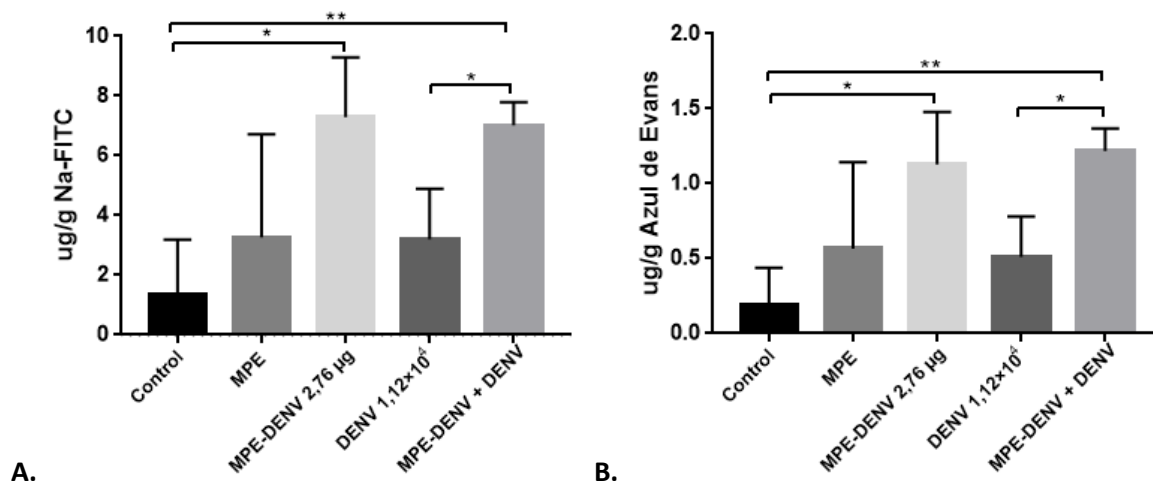


Figura 36. Cantidad de trazadores en el cerebelo de ratones inoculados con MPE-DENV ($2.76 \mu\text{g}$), MPEb ($2.76 \mu\text{g}$), DENV (1.12×10^4 ufp) y MPE-DENV + DENV, analizados a 5 días PI. **A.** Na-FITC. **B.** Azul de Evans. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Aunque en la corteza se observaron los mayores valores de permeabilidad durante el día 10 PI (figura 35), en el día 5 se observaron resultados similares a los de cerebelo (figura 37). En este caso, la estimulación con MPE-DENV $2.76 \mu\text{g}$ también generó los mayores valores de permeabilidad ($7.28 \mu\text{g/g}$ de Na-FITC y $1.07 \mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) en comparación con los otros grupos. Aunque las concentraciones de ambos trazadores en el tejido de ratones inoculados con DENV 1.12×10^4 ufp ($4.43 \mu\text{g/g}$ de Na-FITC y $0.72 \mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) fueron mayores que las del grupo control ($2.33 \mu\text{g/g}$ de Na-FITC y $0.34 \mu\text{g/g}$ de Azul de Evans), no alcanzaron los valores de los ratones inoculados con MPE-DENV + DENV ($5.90 \mu\text{g/g}$ de Na-FITC y $1.03 \mu\text{g/g}$ de Azul de Evans). En este caso, los valores de permeabilidad obtenidos con MPE-DENV + DENV estuvieron ligeramente alejados de los valores del grupo MPE-DENV, lo que podría indicar que el DENV no incrementa el efecto observado por las MPE-DENV. Respecto a las concentraciones de ambos trazadores que se encontraron en la corteza de los ratones del grupo MPEb ($1.95 \mu\text{g/g}$ de Na-FITC y $0.38 \mu\text{g/g}$ de Azul de Evans), fueron iguales o menores que las concentraciones del grupo control, lo que confirma que el efecto observado es característico de las MPE generadas por células infectadas con DENV.

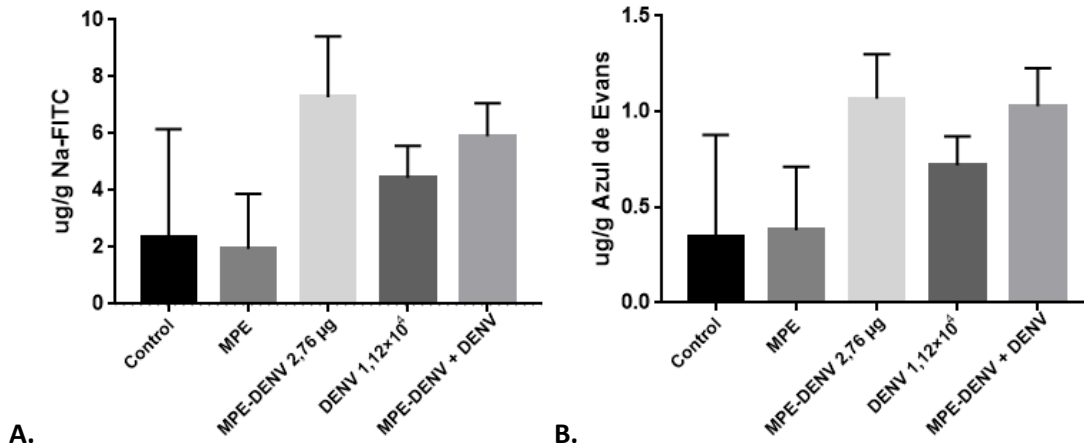


Figura 37. Cantidad de trazadores en la corteza de ratones inoculados con MPE-DENV (2.76 μg), MPEb (2.76 μg), DENV (1.12×10^4 ufp) y MPE-DENV + DENV, analizados a 5 días PI. **A.** Na-FITC. **B.** Azul de Evans.

Las concentraciones de Na-FITC y Azul de Evans en las áreas subcorticales, también fueron mayores en el grupo de ratones inoculados con MPE-DENV 2.76 μg (3.48 $\mu\text{g/g}$ de Na-FITC y 0.59 $\mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) en comparación con el grupo control (0.84 $\mu\text{g/g}$ de Na-FITC y 0.16 $\mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) y con el grupo inoculado con DENV 1.12×10^4 ufp (1.97 $\mu\text{g/g}$ de Na-FITC y 0.36 $\mu\text{g/g}$ de Azul de Evans). Cabe anotar que en las áreas subcorticales se obtuvieron los valores con menor desviación estándar para los grupos MPE-DENV y DENV. Además, en el grupo inoculado con MPE se obtuvieron valores menores (1.55 $\mu\text{g/g}$ de Na-FITC y 0.33 $\mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) que para los ratones inoculados con MPE-DENV, lo que comprueba el efecto de específico de las MPE-DENV en la permeabilidad de BHE. Como en el caso del cerebelo, el grupo inoculado con MPE-DENV + DENV presentó concentraciones menores de Na-FITC (3.15 $\mu\text{g/g}$) que el grupo con MPE-DENV, mientras que en la concentración de Azul de Evans, los ratones estimulados con MPE-DENV + DENV (0.66 $\mu\text{g/g}$ de Azul de Evans) presentaron valores mayores que los ratones con MPE-DENV, lo que podría indicar que la combinación MPE-DENV + DENV incrementa la susceptibilidad al incremento de permeabilidad de la BHE para proteínas relativamente grandes.

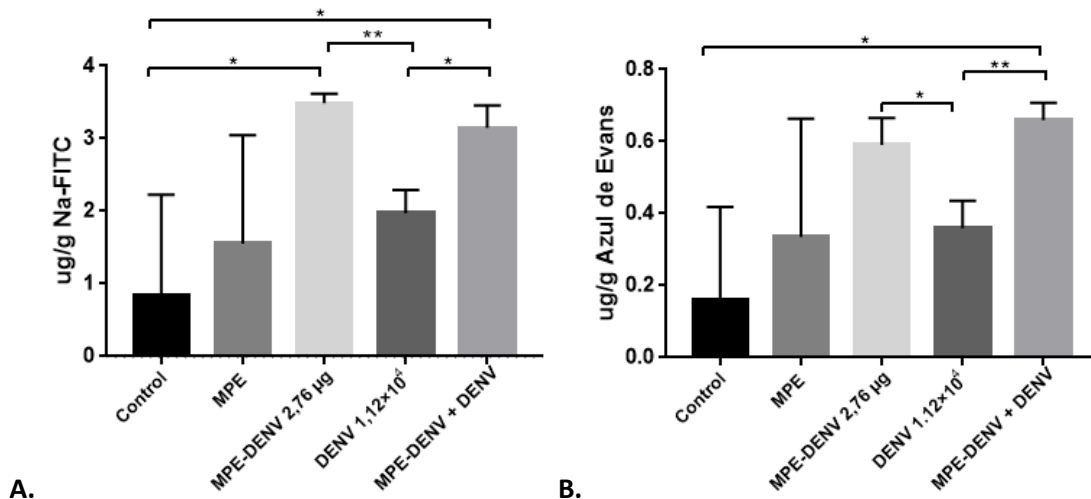


Figura 38. Cantidad de trazadores en áreas subcorticales de ratones inoculados con MPE-DENV (2.76 µg), MPEb (2.76 µg), DENV (1.12x10⁴ ufp) y MPE-DENV + DENV, analizados a 5 días PI. **A.** Na-FITC. **B.** Azul de Evans. (* p < 0.05; ** p < 0.01)

Como se puede observar en las figuras 37, 38 y 39, en cerebelo y áreas subcorticales se genera mayor permeabilidad para los ratones estimulados con MPE-DENV en comparación con los controles. En general, las MPE derivadas de células sin infectar tienen un efecto bajo sobre la permeabilidad que no es diferente al efecto del vehículo, y que es menor al de las MPE-DENV. Como se había observado previamente en el proceso de estandarización, las MPE-DENV generan una permeabilidad significativamente mayor a la del DENV por sí solo. Aun así, si el DENV se inocula junto con las MPE-DENV la permeabilidad aumenta.

Discusión

En el presente estudio se evaluó la participación de las micropartículas endoteliales (MPE) en la neuropatogenia durante la infección por el virus Dengue (DENV). Se adaptó un modelo murino para el estudio de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) con ratones Balb/c inmunocompetentes. Estos ratones se perfundieron con un coctel de trazadores (Na-FITC y Azul de Evans) por vía intra-cardiaca para determinar la concentración de trazadores que atravesaran la BHE desde la sangre hacia el sistema nervioso central (SNC) bajo diversos estímulos. Para la obtención de las MPE, se establecieron las condiciones de infección del DENV en una línea celular de endotelio cerebral humano (HBEC-5i). La cepa viral utilizada en este estudio es la DENV-2 NGC, una cepa prototipo de mediana a baja virulencia. Para la amplificación y titulación viral se usaron células LLC-MK2 derivadas de tejido epitelial de riñón de mono verde. Estas células son susceptibles a la infección ya que poseen en su superficie receptores (el glucoesfingolípido nLc₄Cer, entre otros) que permiten su internalización (Cruz-Oliveira et al., 2015). En las células endoteliales de la BHE (HBEC-5i), la capacidad de infección del DENV difiere dependiendo de su neurotropismo/neurovirulencia: cepas adaptadas a cerebro de ratones lactantes (Myriam Lucia Velandia-Romero, Acosta-Lozada, & Castellanos, 2012) o cepas extraídas de pacientes con manifestaciones neurológicas (Celso Ramos et al., 1998) pueden infectar estas células. Teniendo en cuenta que para este estudio se utilizó una cepa prototipo no neuroadaptada, se llevó a cabo un ensayo de infección para determinar si las HBEC-5i son susceptibles a infección. En otras enfermedades infecciosas, como la malaria cerebral, las células endoteliales del cerebro pueden expresar antígenos por presentación cruzada (Howland, Poh, & Rénia, 2015) por lo que se determinó que la expresión de antígenos en superficie podía ser un indicador de infección. Aunque desde las 24 hasta las 72h PI no se detectó infección, a las 96h con MOI de 1 y 5, el anticuerpo anti-complex DENV se unió a la superficie del 2.76 y el 3.01% de las células, respectivamente, indicando que ya había antígeno viral expresado en la superficie de estas células como consecuencia de la replicación exitosa del DENV dentro de la célula (figura 24).

Aunque las HBEC-5i se infectan a las 96h PI, no es posible afirmar que en este mismo momento la activación por estímulo del DENV sea la mayor. Para evaluar si las HBEC-5i responden a estímulos expresando moléculas de adhesión presentes en células endoteliales, se evaluó la capacidad de respuesta de éstas usando como control positivo TNF α , una citocina pro-inflamatoria que favorece la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales (Abbas & Lichtman, 2004). Se evaluó la expresión de ICAM-1 y de P-selectina, como marcadores de adhesión leucocitaria y plaquetaria, respectivamente. A las 24h post-estímulo, el porcentaje de ICAM-1 aumentó significativamente respecto a las células sin estímulo, mientras que la expresión de P-selectina no aumentó significativamente. Por esta razón, ICAM-1 se definió como marcador principal de activación para las HBEC-5i. ICAM-1 se expresa constitutivamente en la superficie de las células endoteliales y del sistema inmune. Específicamente en la unidad neurovascular, cuando las células endoteliales se activan, ICAM-1 se sobre-expresa como mecanismo para facilitar la adhesión y diapédesis de leucocitos hacia el SNC (Gorina, Lyck, Vestweber, & Engelhardt, 2014) por lo que su sobre-expresión podría facilitar el transporte de otras células o MP por la BHE. Durante la infección por DENV, se observó que desde las 24h PI hay activación celular, lo que se refleja en la sobre-expresión de moléculas de adhesión, como ICAM-1. Como se pudo observar, las células sin tratamiento sobre-expresaron ICAM-1 de forma tiempo-dependiente lo que indica que el sobre crecimiento de las células en el cultivo incrementa la expresión de ICAM-1, y posiblemente, de otras moléculas de

adhesión. Además, el consumo de factores y nutrientes del medio de cultivo es un estímulo inespecífico de activación, por lo tanto, el momento en el que mejor se visualiza la activación por el estímulo único del DENV es a las 24h PI, cuando podría haber menor activación por estímulos inespecíficos, ya sea estrés celular o sobre crecimiento del cultivo.

Para caracterizar el estado de activación de las HBEC-5i a las 24h PI, se evaluó la presencia de TF y P-selectina en la superficie de las células, además de ICAM-1 tomando como mejor estímulo el DENV a una MOI de 5 (figura 28). A diferencia de ICAM-1, P-selectina no presentó un aumento estadísticamente significativo de expresión como consecuencia de la estimulación con el virus. Aun así, se observó que el porcentaje de células que expresan TF aumenta respecto al control. En estado de activación, las células endoteliales exponen TF (Factor Tisular) hacia la sangre para iniciar el proceso de coagulación lo que explica esta sobre-expresión (Maragoudakis & Tsopanoglou, 2010). Aun así, se puede observar que en estado basal un gran porcentaje de células expresan TF debido a activación inespecífica por lo que, en el modelo experimental utilizado, no es un marcador ideal de activación.

Aunque desde las 24h PI las HBEC-5i están activadas, fue necesario determinar si en este mismo tiempo PI se obtienen las mejores condiciones para la producción de MP y con que MOI, por lo que se determinó el porcentaje de MP liberadas en diferentes tiempos (24, 48 y 72h) con diferentes MOI (1 y 5) (figura 30). Teniendo en cuenta que todas las mediciones se llevaron a cabo utilizando las mismas condiciones, el porcentaje de eventos detectados en el área de análisis es proporcional a la cantidad de MP en cada muestra. De este modo, se observó que a las 24h PI y con una MOI de 5 se genera el mayor porcentaje de MP endoteliales. Además, debido a que es un tiempo corto de infección, las MP generadas en su mayoría serán producto de la activación por DENV disminuyendo la posibilidad de tener productos de activación inespecífica, como se confirmó con los bajos porcentajes en las células sin tratamiento a este tiempo de análisis.

Las MP son vesículas heterogéneas tanto en su tamaño como en su composición. Debido al recambio de fosfolípidos en la membrana celular durante su biogénesis, las MP exponen fosfatidilserina en su superficie. Por esta razón, este fosfolípido aniónico se utiliza como marcador en su caracterización. Para las MP generadas a partir de células HBEC-5i infectadas con DENV, a las 24h PI es cuando mayor cantidad de MP fosfatidilserina + se producen en comparación con el control (figura 31). Este hallazgo hace sentido con los resultados anteriores, confirmando que a las 24h PI hay un mayor número de MP generadas específicamente por la activación con el DENV y una menor cantidad de MP generadas por estímulos inespecíficos. Aun así, se puede observar que, en general, los porcentajes de MP fosfatidilserina + son relativamente bajos. Se ha reportado que en plasma humano, hay poblaciones de MP de origen endotelial que no presentan fosfatidilserina en su superficie por razones desconocidas, lo que indica que, específicamente para este tipo de MP, es recomendable utilizar otros marcadores (como intercaladores de membrana) para detectar la población total (Dignat-George & Boulanger, 2011).

En estudios previos, se ha utilizado PECAM-1 (CD31: molécula de adhesión endotelial-plaquetaria) como marcador de origen endotelial para las MP (Berezin et al., 2015). PECAM-1 es una glicoproteína altamente expresada en células endoteliales que modula la localización de la VE-caderina y la β -catenina siendo esencial para el ensamblaje apropiado de las uniones estrechas (Privratsky & Newman, 2014). Como se pudo observar, en todas las condiciones se encontraron MP

PECAM-1 positivas (figura 31). Las MP analizadas conformaron una población con enriquecimiento heterogéneo de PECAM-1, lo que se debe a su biogénesis, ya que la cantidad e identidad de determinadas proteínas en sus superficies es producto del azar.

Para determinar las dosis de MP a utilizar en los siguientes experimentos se hizo una cuantificación de proteínas. Aunque las MP tienen una composición mayoritariamente lipídica, es posible determinar y estandarizar cantidades dependiendo de su concentración de proteínas, como se ha reportado previamente (Franquesa et al., 2014).

El efecto de las MP derivadas de la estimulación de células endoteliales con DENV (MPE-DENV) en la permeabilidad de la BHE se evaluó utilizando un modelo in-vivo con ratones inmunocompetentes de la cepa Balb/c. En reportes previos, los ratones Balb/c han sido utilizados para estudiar las manifestaciones neurológicas del DENV, en donde se ha observado apertura de la BHE por inoculación intraperitoneal, y rigidez, encefalitis e incluso muerte por inoculación intracraneal (Chaturvedi et al., 1991; Guabiraba & Ryffel, 2014; Sanchez-Burgos, Hernandez-Pando, Campbell, Ramos-Castaneda, & Ramos, 2004; M. L. Velandia-Romero et al., 2012). Aunque para este estudio no se utilizó una cepa viral neuroadaptada, si se observó aumento de permeabilidad tanto con el DENV-2 NGC como con las MPE-DENV.

Para el desarrollo del modelo, se inocularon los siguientes estímulos por vía intraperitoneal: control negativo (medio RPMI), DENV 1.12×10^4 (1.12×10^4 ufp), DENV 1.12×10^6 (1.12×10^6 ufp), MPE-DENV 2,76 μ g (micropartículas derivadas de células endoteliales infectadas con DENV, 2,76 μ g de proteína) y MPE-DENV 27,6 μ g (27,6 μ g de proteína). Tomando como referencia reportes previos en los que a los 10 días PI se observaba mayor permeabilidad a Azul de Evans como consecuencia de la infección con un DENV-2 neuroadaptado, se analizaron los cambios de permeabilidad a los 5 y 10 días PI (Chaturvedi et al., 1991). Para determinar el tamaño de moléculas que podrían atravesar la BHE debido a un aumento de permeabilidad, se utilizó un coctel de trazadores de Na-FITC (376.27g/mol) y Azul de Evans (960.81g/mol). La cantidad de Na-FITC encontrada en el cerebro, es proporcional a la cantidad de moléculas menores a 376.27Da que pueden pasar la BHE, específicamente iones y moléculas pequeñas. Por otro lado, el Azul de Evans ha sido ampliamente utilizado en ensayos de permeabilidad de la BHE ya que, al unirse con la albúmina en la sangre, se convierte en un trazador de 67kDa que se utiliza para evaluar si proteínas de pesos moleculares menores a 67kDa podrían entrar al SNC (Saunders, Dziegielewska, Mollgard, & Habgood, 2015). Teniendo en cuenta que ambos trazadores absorben y emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda (485/535 para Na-FITC y 535/595 para Azul de Evans), es posible analizar sus concentraciones en una misma muestra.

Para el análisis de cuantificación de permeabilidad, el cerebro de los ratones fue dividido en tres partes: cerebelo, corteza y áreas subcorticales. Se ha reportado que, durante la infección por DENV, RNA viral ha sido detectado en el cerebro de casos fatales (C. Ramos et al., 1998). Específicamente en ratones Balb/c, en las neuronas de la corteza cerebral es donde se ha encontrado mayor cantidad de antígeno viral por inmunoreactividad (Sanchez-Burgos et al., 2004). Las demás regiones del cerebro, como el hipocampo, tálamo, hipotálamo y los ganglios basales, se encuentran en las áreas subcorticales. Estas regiones fueron determinadas para el análisis de permeabilidad debido a que, tanto en cerebelo como en corteza, hay evidencia de presencia del virus por lo que podría correlacionarse con una posible apertura de la BHE. En otras áreas dentro de las estructuras

subcorticales, por ejemplo el hipotálamo, se han observado efectos de la infección como necrosis localizada, apoptosis y desmielinización, pero no genoma viral ni viriones como tal (Sanchez-Burgos et al., 2004).

Para analizar el aumento de permeabilidad en la BHE, se usaron concentraciones diferentes de DENV y MPE-DENV con el fin de estandarizar las dosis de cada estímulo. En este primer análisis se determinó que las concentraciones menores de DENV (1.12×10^4 ufp) y MPE-DENV (2,76 μg de proteína) generaban los mayores valores de permeabilidad en cerebelo (figura 34) y áreas subcorticales (figura 36), contrario a lo que se había reportado previamente con cepas neuroadaptadas (Chaturvedi et al., 1991). En el cerebelo, a los 5 días PI y con MPE-DENV (2,76 μg de proteína), se encontró que la cantidad de Na-FITC en el tejido fue significativamente mayor a la de los ratones control (7.29 $\mu\text{g/g}$ contra 1.32 $\mu\text{g/g}$). Este aumento de permeabilidad no fue alcanzado ni siquiera por el mismo DENV que, aunque sí generó un aumento respecto al control, no fue comparable con el de las MPE-DENV. Resultados similares se observaron con Azul de Evans, aunque las concentraciones en el tejido fueron menores. Para ambos trazadores se encontraron valores altos de permeabilidad a los 10 días PI con DENV 1.12×10^4 ufp, significativamente mayores a los de los ratones control, lo que indica que en este tiempo ya las MPE-DENV no tienen los mismos efectos que tenían 5 días antes, sino que el DENV por sí solo empieza a afectar la permeabilidad ya sea por su virulencia intrínseca, o por los productos de activación que genere dentro del cuerpo del ratón. Por otro lado, en la corteza se alcanzaron los máximos valores de permeabilidad con la mayor concentración de MPE-DENV (27,6 μg de proteína) (figura 35). Nuevamente, el DENV no alcanzó estos valores, aunque sí se diferenció de los controles. Estos resultados fueron similares para ambos trazadores. A los 5 días PI, el mayor valor de permeabilidad fue alcanzado por las MPE-DENV (2,76 μg de proteína), lo que podría indicar que es posible que la permeabilidad de la corteza se afecte levemente con concentraciones bajas de MPE-DENV, pero requiera de mayores concentraciones e incluso más tiempo para generar un efecto más claro. A partir de estos resultados se podría concluir que la BHE de la corteza podría ser más resistente a los cambios en permeabilidad que la barrera del cerebelo. Este fenómeno de diferenciación en la regulación de la permeabilidad de BHE en diferentes regiones del cerebro, o diferenciación regional de la BHE, ha sido observado en ratones infectados con el virus atenuado de la rabia CVS-F3, en los que, aunque hay incremento en la permeabilidad de BHE no se observan manifestaciones neurológicas. Por esta razón, se propone que la apertura de la barrera podría ser parte de un mecanismo de protección en el que se permitiría la entrada regulada de células inmunes al SNC que podrían clarificar la infección. Específicamente en estos ratones se ha observado que el cerebelo es la región de mayor sensibilidad respecto al aumento de la permeabilidad de BHE (Phares, Kean, Mikheeva, & Hooper, 2006), lo que concuerda con los resultados discutidos previamente.

La respuesta inmune de los ratones juega un papel importante en la regulación de la permeabilidad de esta barrera. Por esta razón, se propone que el cerebelo es la primera región en la que se aumenta la permeabilidad de la BHE para permitir el paso regulado de células del sistema inmune al cerebro (especialmente linfocitos T cooperadores CD4+) para evitar la aparición de las manifestaciones neurológicas, como se ha reportado previamente (Phares et al., 2006). Esta hipótesis podría ser apropiada para el modelo utilizado en este estudio, ya que ninguno de todos los ratones estimulados, manifestó afectaciones neurológicas.

En áreas subcorticales se encontraron resultados similares a los del cerebelo: la mayor permeabilidad se generó por la concentración menor de MPE-DENV (2,76 μg de proteína). Aunque a los 10 días PI se observan valores altos de permeabilidad, no es posible asegurar que estos efectos sean causados por los estímulos inoculados, ya que los controles cuyo estímulo era únicamente vehículo (medio RPMI) también resultaron con altas cantidades de trazadores en el tejido (figura 36).

El hecho de que las concentraciones elevadas tanto del DENV como de las MPE-DENV no hayan generado aumento de la permeabilidad de BHE a los 5 días PI, podría deberse a la respuesta inmune de los ratones. Es probable que concentraciones bajas de estos estímulos no alerten al sistema inmune y no se genere ninguna respuesta que pueda eliminarlos a nivel periférico durante los 5 primeros días. Por otro lado, con concentraciones altas hay mayor probabilidad de que células del sistema fagocítico mononuclear hayan eliminado tanto al DENV como a las MPE-DENV y que por esta razón no se observe aumento en la permeabilidad. Aun así, se puede observar que la permeabilidad ocasionada por la concentración alta de MPE-DENV (27,6 μg de proteína) es mayor que la generada por DENV (1.12×10^6 ufp), lo que podría indicar que algunas MPE-DENV logran escapar a la respuesta inmune y afectar la permeabilidad. Por otro lado, para los 10 días PI las concentraciones bajas de DENV que habrían escapado de la respuesta inmune, podrían generar los productos de activación propios del ratón que podrían promover la apertura tardía de la BHE, lo que explicaría el aumento de permeabilidad que se observó en cerebelo y áreas subcorticales a los 10 días PI. Teniendo en cuenta estas evidencias, los siguientes análisis se llevaron a cabo con MPE-DENV y DENV en concentraciones bajas (2.76 $\mu\text{g/g}$ y 1.12×10^4 ufp, respectivamente) ya que con estas dosis se alcanzaron los valores mayores de permeabilidad.

Para determinar si el efecto de incremento de permeabilidad generado por las MPE-DENV era debido al hecho de ser productos de activación de células estimuladas con DENV, o debido al efecto de inocular ratones con MP producidas por una línea celular derivada de humano, se comparó el efecto de las MPE-DENV con MP generadas de células endoteliales de BHE sin infección (MPEb). En este análisis se usaron las concentraciones determinadas como mejores durante el proceso de estandarización y se tomó el día 5 PI como tiempo óptimo de análisis para estudiar principalmente el efecto de las MPE-DENV sobre la permeabilidad. En todas las áreas analizadas se observó que las MPE-DENV seguían teniendo un efecto significativamente mayor en la permeabilidad de la BHE. Las MPEb tuvieron un efecto bajo que no se diferencia del efecto del vehículo, por lo que se puede concluir que, aunque sí generan un ligero efecto, las MPEb por sí solas no son las causantes del aumento de permeabilidad observado, sino que es el efecto del DENV en las células HBEC-5i lo que genera MPE-DENV capaces de generar un aumento significativo en la permeabilidad. Como se había observado en el ensayo anterior, los mayores valores de permeabilidad en la corteza se alcanzaron a los 10 días PI por lo que en este ensayo (5 días PI), aunque sí se observaron tendencias, no hubo diferencias significativas.

Teniendo en cuenta las condiciones similares ó parecidas a las que se generan las manifestaciones neurológicas durante la infección en humanos, se evaluó el efecto de las mejores concentraciones de DENV y MPE-DENV combinadas (MPE-DENV + DENV) en la permeabilidad de BHE. Como se pudo observar, en todas las regiones analizadas, la permeabilidad generada por las MPE-DENV fue similar a la que causaron las MPE-DENV + DENV. Incluso, las MPE-DENV generaron un aumento ligeramente mayor al de las MPE-DENV + DENV en la permeabilidad a Na-FITC en las tres regiones y a Azul de

Evans en la corteza. Por otro lado, el aumento de permeabilidad fue levemente mayor por MPE-DENV + DENV en comparación con MPE-DENV en cerebelo y áreas subcorticales para Azul de Evans. Esto podría indicar que la mezcla de MPE-DENV con DENV podría incrementar la permeabilidad para proteínas más grandes en estas dos áreas.

Aunque la permeabilidad de BHE ha sido asociada como un efecto negativo de enfermedades del SNC, también constituye un mecanismo regulado de apertura para el paso de células del sistema inmune al SNC. Aunque esto podría proteger al cerebro, también podría ser importante para el desarrollo de enfermedades autoinmunes desmielinizantes facilitando el paso de un exceso de células del sistema inmune, por lo que el proceso general de incremento de la permeabilidad debe estar estrictamente regulado para no ser perjudicial. Cabe anotar que las células del sistema inmune que entran al SNC no necesitan espacios tan grandes para pasar por la BHE ya que durante la diapédesis pueden disminuir su tamaño considerablemente, por lo que no es posible afirmar que estas células no puedan cruzar la BHE debido a la estimulación con MPE-DENV. Análisis de linfocitos CD4+ en el cerebelo por citometría de flujo podrían ser utilizados para comprobar esta hipótesis.

En este estudio se encontró que las micropartículas endoteliales de origen neurovascular generadas a partir de células infectadas por DENV promueven la apertura de la BHE in-vivo, en un modelo murino. Las MPE-DENV (2.76 µg de proteína), por sí solas, incrementaron la permeabilidad de BHE a Na-FITC y Azul de Evans incluso más que el DENV, por lo que podrían ser un mecanismo eficiente para la modulación de la apertura de la BHE. Esta apertura permite el paso de hasta aproximadamente 6 veces más Na-FITC que en condiciones normales (figura 34.A), como se observó en el cerebelo de los ratones 5 días PI. Este hallazgo podría correlacionarse con un estudio previo en el que se encontraron partículas virales en la capa granular del cerebelo en un caso fatal (Celso Ramos et al., 1998). Es posible proponer que las MPE-DENV generan un incremento en la permeabilidad de la BHE que permite el paso de iones, moléculas pequeñas y, en menor medida, de proteínas. Otros estudios serán necesarios para determinar si la apertura de la BHE favorece la presencia de células del sistema inmune en el cerebro, y si estas células podrían estar llevando al DENV en su interior, como se ha reportado previamente con el mecanismo del “caballo de Troya” en células del sistema inmune.

Conclusiones

- Las células endoteliales de barrera hematoencefálica (BHE) son susceptibles a la infección por DENV-2, a las 96 horas post-infección (PI) a multiplicidades de infección (MOI) de 1 y 5.
- Las células endoteliales de BHE sobre-expresan ICAM-1 como consecuencia de su activación. Estas células se activan por interacción con DENV-2, desde las 24 hasta las 72 horas PI con MOI de 1 y 5.
- La interacción con el DENV-2 incrementa la liberación de micropartículas (MP) de células endoteliales de BHE, desde las 24 horas PI.
- Diferentes porcentajes de MP derivadas de células endoteliales de BHE infectadas con DENV-2 (MPE-DENV) presentan fosfatidilserina y PECAM-1 (CD31) en su superficie. La presencia de fosfatidilserina es mayor a las 24 horas PI, mientras que PECAM-1 está presente en todas las condiciones de forma heterogénea.
- Las MPE-DENV (2.76 µg de proteína), por sí solas, incrementan la permeabilidad de BHE a Na-FITC y Azul de Evans incluso más que el DENV, por lo que podrían ser un mecanismo eficiente para la modulación de la apertura de la BHE que podría facilitar la entrada de DENV al cerebro en los casos de DG.
- Las dosis con las que se observaron los mayores valores de permeabilidad fueron 1.12×10^4 ufp de DENV-2 y MPE-DENV con 2.76 µg de proteína. Así mismo, en el día 5 PI se alcanzaron los mayores valores de permeabilidad para el cerebelo y las áreas subcorticales.
- El efecto de las MPE-DENV es mayor que el efecto que generan MP endoteliales derivadas de células sin estímulo (MPEb), lo que confirma que el aumento de permeabilidad observado es causado por las MPE generadas por la estimulación con el virus.
- La regulación de la permeabilidad de BHE es diferente en las diferentes áreas analizadas. Mientras que el cerebelo es más sensible y se permeabiliza más fácilmente, en la corteza se necesita más tiempo y concentraciones más altas para alcanzar valores de permeabilidad elevados.

Perspectivas

- Con el objetivo de elucidar el mecanismo por el cual las micropartículas endoteliales derivadas de células infectadas con DENV (MPE-DENV) incrementan la permeabilidad de la barrera hemoencefálica (BHE), se propone llevar a cabo diferentes ensayos de Western Blot para evaluar si se modifica la expresión de proteínas de unión estrecha y adherente en los cerebros de los ratones.
- Para determinar si el proceso de apertura de la BHE tiene un efecto inflamatorio sobre las células del sistema nervioso central (SNC), proponemos analizar la expresión de marcadores de activación de células microgliales, astrocitos y neuronas en los cerebros de los ratones.
- Con base en los modelos utilizados en el presente estudio, se propone determinar si una cepa neuroadaptada de DENV podría generar un incremento mayor en la permeabilidad de la BHE, en comparación con el observado en una cepa no neuroadaptada.
- Teniendo en cuenta que los reportes de manifestaciones neurológicas para diferentes flavivirus son cada vez más frecuentes, el modelo propuesto en este estudio podría ser utilizado en el estudio de la neuropatogenia del virus del Zika.
- Para caracterizar las MPE-DENV, se propone el análisis proteómico (por espectrometría de masas) para determinar las proteínas presentes en las MP que pudieran participar en el incremento de la permeabilidad de la BHE.

Referencias

- Abbas, A. K., & Lichtman, A. H. (2004). *Inmunología Celular y Molecular*. Madrid: ELSEVIER.
- Abbot, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 41-53.
- Amabile, N., Rautou, P.-E., Tedgui, A., & Boulanger, C. M. (2010). Microparticles: Key protagonists in cardiovascular disorders. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(8), 907-916.
- An, J., Kuroda-Kimura, J., Hirabayashi, Y., & Yasui, K. (1999). Development of a novel mouse model for Dengue virus infection. *Virology*, 263, 70-77.
- Ashhurst, T. M., van Vreden, C., Munoz-Erazo, L., Niewold, P., Watabe, K., Terry, R. L., . . . Cole King, N. J. (2013). Antiviral macrophage responses in flavivirus encephalitis. *Indian Journal of Medical Research*, 138, 632-647.
- Barreto, D., Takiya, C., Paes, M., Farias-Filho, J., Pinhao, A., Alves, A., . . . Barth, O. (2004). Histopathological aspects of Dengue-2 virus infected mice tissues and complementary virus isolation. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 36(2), 121-130.
- Barrows, N. J., Bradrick, S. S., Bidet, K., Anwar, A., Ward, A. M., Jamison, S. F., . . . Garcia-Blanco, M. A. (2014). The interface between dengue virus and the human host *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* (pp. 406-424). Oxfordshire: CABI.
- Bennet, S. N. (2014). Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses *Dengue and dengue hemorrhagic fever* (pp. 323-333). Oxfordshire: CABI.
- Berezin, A., Zulli, A., Kerrigan, S., Petrovic, D., & Kruzliak, P. (2015). Predictive role of circulating endothelial-derived microparticles in cardiovascular diseases. *Clin Biochem*, 48(9), 562-568. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.02.003
- Blitvich, B. J., & Firth, A. E. (2015). Insect-Specific Flaviviruses: A Systematic Review of Their Discovery, Host Range, Mode of Transmission, Superinfection Exclusion Potential and Genomic Organization. *Viruses*, 7, 1927-1959.
- Brenner, M. (2015). Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience Letters*, 565, 7-13.
- Brodal, P. (2010). *The Central Nervous System: Structure and Function*. New York: Oxford University Press.
- Combes, V., Guillemin, G. J., Chan-Ling, T., Hunt, N. H., & Grau, G. E. (2012). The crossroads of neuroinflammation in infectious diseases: endothelial cells and astrocytes. *Trends in parasitology*, 28(8), 311-319.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceicao, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptor and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology reviews*, 155-170.
- Chaturvedi, U. C., Dhawan, R., Khanna, M., & Mathur, A. (1991). Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. *J Gen Virol*, 72 (Pt 4), 859-866. doi: 10.1099/0022-1317-72-4-859
- Dignat-George, F., & Boulanger, C. M. (2011). The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(1), 27-33. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.218123
- El-Assad, F., Wheway, J., Hunt, N. H., Grau, G. E. R., & Combes, V. (2014). Production, fate and pathogenicity of plasma microparticles in Murine Cerebral Malaria. *PLOS Pathogens*, 10(3), e1003839(1003831-1003814).
- Engelhardt, B., & Sorokin, L. (2009). *The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction*. Paper presented at the Seminars in immunopathology.
- Engelhardt, B., & Sorokyn, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology*, 497-511.

- Enjeti, A. K., Lincz, L. F., & Seldon, M. (2008). Microparticles in Health and Disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 34(7), 684-691.
- Epidemiología, D. G. d. (2016). Panorama Epidemiológico de Dengue. from <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-panorama-epidemiologico-de-dengue>
- Flaviviridae. (2016). *ViralZone*. Retrieved from http://viralzone.expasy.org/all_by_species/43.html
- Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Ripoll, E., Luk, F., Salih, M., Betjes, M. G., . . . Merino, A. M. (2014). Update on controls for isolation and quantification methodology of extracellular vesicles derived from adipose tissue mesenchymal stem cells. *Front Immunol*, 5, 525. doi: 10.3389/fimmu.2014.00525
- Gorina, R., Lyck, R., Vestweber, D., & Engelhardt, B. (2014). β 2 Integrin-mediated crawling on endothelial ICAM-1 and ICAM-2 is a prerequisite for transcellular neutrophil diapedesis across the inflamed blood-brain barrier. *The Journal of Immunology*, 192(1), 324-337.
- Gould, E. A., & Solomon, T. (2008). Pathogenic flaviviruses. *The Lancet*, 371, 500-509.
- Guabiraba, R., & Ryffel, B. (2014). Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology*, 141(2), 143-156. doi: 10.1111/imm.12188
- Gubler, D. J. (2014). Dengue Viruses: Their evolution, history and emergence as a global public health problem *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* (pp. 1-29). Oxfordshire: CABI.
- Gubler, D. J., Ooi, E. E., Vasudevan, S., & Farrar, J. (2014). *Dengue and dengue hemorrhagic fever*: CABI.
- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., . . . Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 2667-2688.
- Halstead, S. B. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 350-362.
- Howland, S. W., Poh, C. M., & Rénia, L. (2015). Antivated brain endothelial cells cross-present malaria antigen. *PLOS Pathogens*, 11(6).
- Huang, Y.-H., Lei, H.-Y., Liu, H.-S., Lin, Y.-S., Liu, C.-C., & Yeh, T.-M. (2000). Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63(1, 2), 71-75.
- Huerta-Zepeda, A., Cabello-Gutiérrez, C., Cime-Castillo, J., Monroy-Martínez, V., Manjarrez-Zavala, M. E., Gutiérrez-Rodríguez, M., . . . Ruiz-Ordaz, B. H. (2008). Crosstalk between coagulation and inflammation during Dengue virus infection. *Thrombosis and Haemostasis*, 99(5), 936-943.
- Hurtado-Alvarado, G., Dominguez-Salazar, E., Velazquez-Moctezuma, J., & Gomez-Gonzalez, B. (2016). A2A Adenosine Receptor Antagonism Reverts the Blood-Brain Barrier Dysfunction Induced by Sleep Restriction. *PLoS One*, 11(11), e0167236. doi: 10.1371/journal.pone.0167236
- Iadecola, C., & Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature medicine*, 17(7), 796-808.
- Iglesias, N. G., Byk, L. A., & Gamarnik, A. V. (2014). Molecular virology of dengue virus *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* (pp. 334-364). Oxfordshire: CABI.
- Komarova, Y., & Malik, A. B. (2010). Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annual Reviews of Physiology*, 72(10), 463-493.
- Lanciotti, R., Gubler, D., & Trent, D. (1997). Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *Journal of General Virology*, 2279-2284.
- Lanciotti, R., Lewis, J., Gubler, D., & Trent, D. (1994). Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *Journal of General Virology*, 65-75.

- Lescar, J., & Lok, S.-M. (2014). The structural biology of dengue virus *Dengue and dengue hemorrhagic fever* (pp. 365-376). Oxfordshire: CABI.
- Maragoudakis, M. E., & Tsopanoglou, N. E. (2010). *Thrombin: Physiology and Disease*: Springer New York.
- Merrifield, C. J., & Kaksonen, M. (2014). Endocytic accessory factors and regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, a016733.
- Middlerdorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421-443.
- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2016). Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood-brain barrier. *Current opinion in Immunology*, 38, 18-23.
- Mizuno, T. (2015). Neuron-microglia interactions in neuroinflammation. *Clinical & Experimental Neuroimmunology*, 6, 225-231.
- Morrison, J., & García-Sastre, A. (2014). STAT2 signaling and dengue virus infection. *JAK-STAT*, e27715(27711-27716).
- Neal, J. W. (2014). Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? *Journal of Infection*, 69, 203-215.
- Neuwelt, E. A., Bauer, B., Fahlke, C., Fricker, G., Ladecola, C., Janigro, D., . . . Drewes, L. R. (2011). Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature Reviews: Neuroscience*, 12, 169-182.
- OhAinle, M., & Harris, E. (2014). Dengue pathogenesis: viral factors *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* (pp. 229-248). Oxfordshire: CABI.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Kanazawa, H., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2000). Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci*, 113 (Pt 17), 3073-3084.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*, 88(4), 844-856.
- Oliveira, E., Amorim, J., Paes, M., Azevedo, A., Goncalves, A., Costa, S., . . . Alves, A. (2016). Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route. *Virology*, 489, 95-107.
- Organization, W. H., Research, S. P. f., Diseases, T. i. T., Diseases, W. H. O. D. o. C. o. N. T., Epidemic, W. H. O., & Alert, P. (2009). *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*: World Health Organization.
- Owens III, A. P., & Mackman, N. (2011). Microparticles in Hemostasis and Thrombosis. *Circulation Research*, 108, 1284-1297.
- Phares, T. W., Kean, R. B., Mikheeva, T., & Hooper, D. C. (2006). Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system. *J Immunol*, 176(12), 7666-7675.
- Privratsky, J. R., & Newman, P. J. (2014). PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res*, 355(3), 607-619. doi: 10.1007/s00441-013-1779-3
- Puccioni-Sohler, M., & Rosadas, C. (2015). Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 73(8), 698-703.
- Ramos, C., Sánchez, G., Hernández Pando, R., Baquera, J., Hernández, D., Mota, J., . . . Lláusas, E. (1998). Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever *Journal of Neurovirology*, 4, 465-468.
- Ramos, C., Sanchez, G., Pando, R. H., Baquera, J., Hernandez, D., Mota, J., . . . Llausas, E. (1998). Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol*, 4(4), 465-468.

- Rico-Hesse, R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 479-493.
- Rosen, L. (1977). The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: new data and a different conclusion. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 337-343.
- Sanchez-Burgos, G., Hernandez-Pando, R., Campbell, I. L., Ramos-Castaneda, J., & Ramos, C. (2004). Cytokine production in brain of mice experimentally infected with dengue virus. *Neuroreport*, 15(1), 37-42.
- Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Mollgard, K., & Habgood, M. D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front Neurosci*, 9, 385. doi: 10.3389/fnins.2015.00385
- Screaton, G., & Mongkolsapaya, J. (2014). The acquired immune response in dengue virus infection *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* (pp. 249-267). Oxfordshire: CABI.
- Schindler, S. M., Little, J. P., & Klegeris, A. (2014). Microparticles: A new perspective in central nervous system disorders. *BioMed Research International* Article ID 756327.
- Sejvar, J. J. (2014). Neurological manifestations of Dengue Virus infection *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* (pp. 145-167). Oxfordshire: CABI.
- Silva de Miranda, A., Rodrigues, D. H., Guerra Amaral, D. C., de Lima Campos, R. D., Cisalpino, D., Vilela, M. C., . . . Rachid, M. A. (2012). Dengue-3 encephalitis promotes anxiety-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research*, 230, 237-242.
- Solomon, T., Dung, N. M., Vaughn, D. W., Kneen, R., Thao, L., Raengsakulrach, B., . . . White, N. J. (2000). Neurological manifestations of dengue infection. *The Lancet*(355), 1053-1059.
- Spindler, K. R., & Hsu, T.-H. (2012). Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends in Microbiology*, 20(6), 282-290.
- Suthar, M. S., Diamond, M. S., & Gale Jr, M. (2013). West Nile virus infection and immunity. *Nature Reviews: Microbiology*, 11, 115-128.
- Tenreiro, N., Ferreira, M., Bernardino, L., & Brito, M. (2016). Cellular response of the blood-brain barrier to injury: potential biomarkers and therapeutic targets for brain regeneration. *Neurobiology of Disease*, Accepted manuscript.
- Trung, D. T., & Wills, B. (2014). Clinical features of dengue *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* (pp. 115-144). Oxfordshire: CABI.
- Tuiskunen, A., Wahlström, M., Bergström, J., Buchy, P., Leparc-Goffart, I., & Lundkvist, A. (2011). Phenotypic characterization of patient Dengue virus isolates in BALB/c mice differentiates Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever from Dengue shock syndrome. *Virology Journal*, 8(398).
- van Dommelen, S. M., Vader, P., Lakhal, S., Kooijmans, S. A. A., van Solinge, W., Wood, M. J. A., & Schiffelers, R. M. (2012). Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 161, 635-644.
- Velandia-Romero, M. L., Acosta-Losada, O., & Castellanos, J. E. (2012). In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. *J Neurovirol*, 18(5), 374-387. doi: 10.1007/s13365-012-0117-y
- Velandia-Romero, M. L., Acosta-Lozada, O., & Castellanos, J. E. (2012). In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent Dengue virus. *Journal of Neurovirology*, 18, 374-387.
- Verma, S., Lo, Y., Chapagain, M., Lum, S., Kumar, M., Gurjav, U., . . . Nerurkar, V. R. (2009). West Nile Virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology*, 385, 425-433.

- Virus Taxonomy: 2014 release. (2015). *ICTV online*. Retrieved from <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- Wheway, J., Latham, S. L., Combes, V., & Grau, G. E. R. (2014). Endothelial Microparticles Interact with and Support the Proliferation of T Cells. *The Journal of Immunology*, *193*, 3378-3387.
- Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., & Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews: Microbiology*, 518-528.
- Yáñez-Mo, M., Siljander, P., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borrás, F., Buzas, E., . . . Mar. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*.