



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**PARTICIPACIÓN DE LINFOCITOS B EN LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A :

MARTHA JACKELINE PÉREZ VEGA

ASESOR: DR. SALVADOR FONSECA CORONADO



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.



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

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

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

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

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

Participación de linfocitos B en la infección por el virus del Dengue

Que presenta la pasante: Martha Jackeline Pérez Vega
 Con número de cuenta: 410024182 para obtener el Título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Junio de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|---------------|-------------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | Dr. Marco Antonio Vega López | |
| VOCAL | Dr. Andrés Romero Rojas | |
| SECRETARIO | Dr. Salvador Fonseca Coronado | |
| 1er. SUPLENTE | MVZ. Angel Germán Martínez Sosa | |
| 2do. SUPLENTE | M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez | |

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

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| i) ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS | iii |
| ii) ABREVIATURAS | v |
| iii) RESUMEN | 1 |
| iv) OBJETIVO GENERAL | 2 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 1.1. Aspectos generales y clasificación clínica | 3 |
| 1.2. Fases de la enfermedad..... | 6 |
| 1.3. Epidemiología y situación en México | 6 |
| 1.4. Diagnóstico | 10 |
| 1.5. Tratamiento y prevención | 11 |
| 1.6. Agente etiológico | 12 |
| v) JUSTIFICACIÓN | 16 |
| 2. PATOGENIA | 17 |
| 2.1. Estrategia de replicación viral | 17 |
| 2.2. Participación del sistema inmune en la patogenia..... | 19 |
| 2.3. Tropicismo celular y receptores | 23 |
| 3. DESARROLLO Y FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS B | 28 |
| 3.1. Ontogenia de linfocitos B..... | 28 |
| 3.2. Pre-pro-B..... | 29 |
| 3.3. Pro-B..... | 30 |
| 3.4. Pre-B y célula B inmadura..... | 30 |
| 3.5. Maduración de linfocitos B | 33 |
| 3.6. Marcadores de linfocitos B | 34 |
| 4. PARTICIPACIÓN DE LOS LINFOCITOS B EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE | 35 |
| 4.1. Linfocitos B como blanco principal de la infección | 35 |
| 4.2. Participación de los linfocitos B en la patogenia de la enfermedad | 42 |
| 5. POSIBLE MECANISMO DE INFECCIÓN | 45 |
| 5.1. Arquitectura del ganglio linfático y migración de células B..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 5.2. Infección de linfocitos B por DENV en órganos linfoides secundarios y su participación como diseminadores del virus | 48 |
| 5.3. Los linfocitos B infectados con DENV pueden actuar como células efectoras de la respuesta inmune | 53 |
| vi) CONCLUSIONES | 58 |
| vii) PERSPECTIVAS | 59 |
| viii) REFERENCIAS..... | 60 |
| ix) URLS | 70 |

i) ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa Global de Consenso del <i>International Research Consortium on Dengue Risk Assessment, Management and Surveillance</i> | 3 |
| Figura 2. Clasificación clínica de los casos de dengue propuesta por la OMS en 1997 y 2009..... | 5 |
| Figura 3. Fases del dengue..... | 7 |
| Figura 4. Incidencia y serotipos virales aislados en casos confirmados de dengue por entidad federativa en México durante el año 2013..... | 9 |
| Figura 5. Algoritmo de diagnóstico de dengue por laboratorio | 10 |
| Figura 6. (A) Estructura y (B) Genoma del virus del dengue | 13 |
| Figura 7. Representación esquemática de la topología membranal de la poliproteína de DENV..... | 15 |
| Figura 8. Ciclo de replicación DENV. | 18 |
| Figura 9. Esquema representativo de la inoculación de DENV por la picadura del mosquito vector y células como potenciales blancos en la infección | 20 |
| Tabla 1. Células que reaccionaron fuertemente a la tinción con anticuerpo monoclonal anti complejo DENV | 27 |
| Figura 10. Desarrollo de los linfocitos B en médula ósea y rearreglo de los genes de inmunoglobulina | 31 |
| Figura 11. Representación del receptor de célula B..... | 32 |
| Figura 12. Marcadores celulares durante el desarrollo de los linfocitos B..... | 34 |
| Figura 13. Citometría de flujo de PBMC infectadas con DENV. | 38 |
| Figura 14. Comparativo de los niveles de RNA viral dos días antes de la disminución de la fiebre en plasma y en subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica en infecciones primarias (1°) y secundarias (2°)..... | 39 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. Niveles de RNA viral en plasma y células mononucleares de sangre periférica..... | 40 |
| Figura 16. Niveles de RNA viral en plasma y subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica en fiebre por dengue (FD) y fiebre hemorrágica por dengue (FHD)..... | 41 |
| Figura 17. Mecanismo de expansión viral mediado por la fagocitosis de cuerpos apoptóticos con partículas infectivas | 44 |
| Figura 18. Arquitectura del ganglio linfático..... | 47 |
| Figura 19. Copias de RNA de polaridad positiva (+) y polaridad negativa (-) de DENV en PBMC sin fraccionar..... | 49 |
| Figura 20. Migración del linfocito B en un órgano linfoide secundario..... | 51 |
| Figura 21. Expresión de mRNA del TLR-2 al TLR-10 en células B humanas de sangre periférica..... | 54 |

ii) ABREVIATURAS

ADCC: *Antibody dependent cellular cytotoxicity* (Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos)

ADE: *Antibody dependent enhancement* (Infección facilitada por anticuerpos)

BCR: *B cell Receptor* (Receptor de célula B)

CD: *Cluster of Differentiation* (Marcador de diferenciación)

CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (Antígeno linfocitario T citotóxico 4)

DCSIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (CD209)* (Molécula de adhesión intracelular específica de células dendríticas)

DENV: Virus del dengue

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

Fc: *Fraction Crystallizable Region* (Fragmento cristalizable)

FcR: *Fraction Crystallizable Receptor* (Receptor del fragmento cristalizable)

FD: Fiebre por Dengue

FDC: *Follicular Dendritic Cell* (Célula dendrítica folicular)

FHD: Fiebre hemorrágica por Dengue

GRP: *Glucose-regulated Protein* (Proteína regulada por glucosa)

HEV: *High endothelial venule* (Vénula de endotelio alto)

HLA: *Human Leukocyte Antigen* (Antígeno leucocitario humano)

HSP: *Heat shock protein* (Proteína de choque térmico)

ICAM: *Intercellular Adhesion Molecule* (Molécula de adhesión intercelular)

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica

MBL: *Mannose Binding Lectin* (Lectina de unión a manosa)

MCP: *Monocyte Chemotactic Protein* (Proteína quimiotáctica de monocitos)

MIF: *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (Factor inhibidor de la migración de macrófagos)

MRC: *Marginal reticular cell* (Célula reticular marginal)

NO: Óxido nítrico

NS: *Nonstructural* (No estructural)

NTPasa: Nucleósido trifosfatasa

PAI: Activador del plasminógeno

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cell* (Célula mononuclear de sangre periférica)

PAX-5: *Transcription factor paired box protein 5* (factor de transcripción 5 tipo caja pareada)

PE: *Phycoerythrin* (Ficoeritrina)

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscrita en tiempo real

RAG: *Recombination-activating gene* (Gen activador de recombinación)

RdRP: *RNA-dependent RNA polymerase* (RNA polimerasa dependiente de RNA)

RE: Retículo endoplásmico

RNA: *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

RTPasa: RNA 5' trifosfatasa

SCD: Síndrome por choque de dengue

TAP: *Transporter Associated with antigen Processing* (Transportador Asociado al Procesamiento de Antígeno)

TGF: *Transforming Growth Factor* (Factor de Crecimiento Transformante)

TLR: *Toll like receptor* (Receptor tipo toll)

TNF: *Tumor Necrosis Factor* (Factor de Necrosis Tumoral)

VCAM: *Vascular Cell Adhesion Molecule* (Molécula de adhesión celular vascular)

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Factor de crecimiento endotelial vascular)

iii) RESUMEN

El dengue es una enfermedad viral transmitida por la picadura de un mosquito vector infectado con cualquier serotipo de los virus del dengue (DENV-1, -2,-3,-4), que provocan una enfermedad febril autolimitada en la mayoría de los casos. Sin embargo, en ocasiones la enfermedad evoluciona a formas graves, los mecanismos mediante los cuales algunos pacientes cursan con una infección asintomática y otros desarrollan complicaciones hemorrágicas no están del todo definidos. La evidencia clínica y epidemiológica disponible sugiere una importante participación del sistema inmune en la patogenia de la enfermedad, de tal forma que las células de este sistema son los blancos de la infección por el virus del dengue.

Debido a que no existe un modelo animal de experimentación, los estudios de la infección natural son limitados, hasta el momento aquellos que han planteado identificar la célula blanco de la infección refieren que los linfocitos B son las principales células mononucleares de sangre periférica infectadas por DENV, los patrones de tráfico celular de los linfocitos B entre la sangre y los tejidos linfáticos sugieren que éstas podrían estar implicadas en la diseminación del virus por el organismo.

Por otro lado, los linfocitos B infectados con DENV producen citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , que han sido identificadas como responsables de las manifestaciones hemorrágicas y por ende, la evolución a cuadros graves de la enfermedad. Aunado a esto, se ha documentado la apoptosis en células B tras la infección con el virus del dengue. Es por ello que se cree que los linfocitos B tienen un papel que va más allá de la producción de anticuerpos durante la infección.

Este trabajo pretende exponer las evidencias que apoyan esa hipótesis y proponer los posibles mecanismos mediante los cuales los linfocitos B podrían ser partícipes en la patogenia de la enfermedad.

iv) **OBJETIVO GENERAL**

Conocer a través de una investigación hemero-bibliográfica el papel de los linfocitos B durante la infección por el virus del dengue que sirva como referencia y fuente de consulta para futuras investigaciones.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Revisar los aspectos principales de la enfermedad.
- Describir de manera general la ontogenia de los linfocitos B en el humano.
- Exponer las evidencias publicadas que señalan a los linfocitos B como blancos de la infección natural.
- Proponer los mecanismos por los cuales la infección del virus del dengue en linfocitos B podría desempeñar un papel importante en la patogenia de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales y clasificación clínica

El dengue es una enfermedad infecciosa transmitida al humano por la picadura de mosquitos pertenecientes al género *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* infectados con cualquier serotipo de los virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) (Guzman y cols., 2010).

Es la enfermedad transmitida por vector más importante a nivel mundial, se estima que en 2013 había 3600 millones de personas en riesgo de contraer el padecimiento (St. John, Abraham y Gubler, 2013) debido a que el dengue es endémico en zonas tropicales y subtropicales del sureste de Asia, el Pacífico, América, África y el Caribe (Murray, Quam y Wilder-Smith, 2013) (Figura 1).

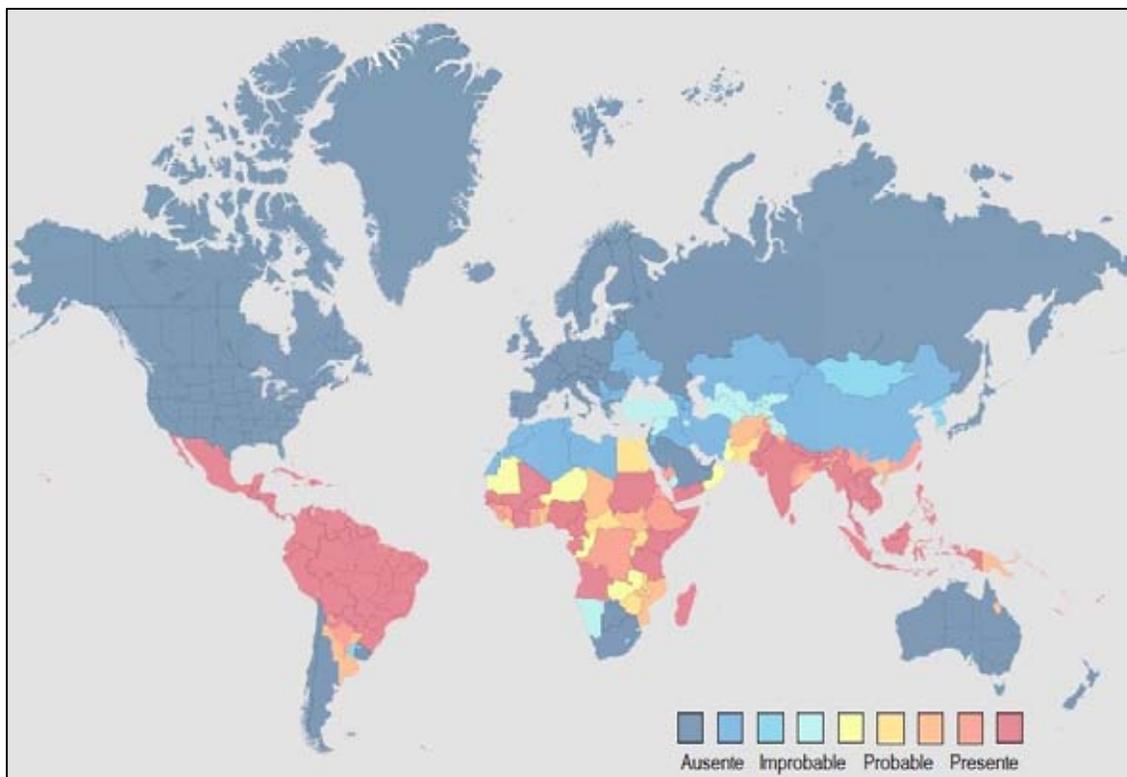


Figura 1. Mapa Global de Consenso del *International Research Consortium on Dengue Risk Assessment, Management and Surveillance (IDAMS)*. Regiones de riesgo definidas en base al consenso de fuentes incluyendo: vigilancia nacional, reportes de investigación, cuestionarios y reportes formales. Recuperado y modificado de <http://www.healthmap.org/dengue/es/> en octubre de 2014.

Asimismo, la alta tasa de crecimiento poblacional, urbanización, globalización y falta de control efectivo del vector contribuyen a que el dengue sea un problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que anualmente ocurren de 50 a 200 millones de infecciones, incluyendo 50 mil hospitalizaciones por complicaciones asociadas a manifestaciones hemorrágicas (Murray, Quam y Wilder-Smith, 2013).

El dengue se presenta como un cuadro febril agudo, en el cual la mayoría de los pacientes se recuperan después de un curso clínico benigno y de resolución espontánea, una pequeña proporción progresa a una enfermedad grave, caracterizada principalmente por aumento de la permeabilidad vascular, con hemorragia o sin ella (WHO, 2009).

La infección por cualquiera de los virus del dengue se manifiesta con una amplia gama de signos y síntomas. En 1997 la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó los casos de dengue de acuerdo a los signos y síntomas presentados durante la enfermedad; fiebre por dengue (FD) caracterizada por: fiebre, mialgias, artralgias, exantema, leucopenia, dolor retro-orbital y manifestaciones hemorrágicas; fiebre hemorrágica por dengue (FHD): prueba de torniquete positiva, acumulación de líquidos, hemorragia en mucosas, aumento de hematocrito, trombocitopenia e hipoproteïnemia; y síndrome por choque de dengue (SCD), en el cual se presentan todas las manifestaciones de la FHD sumado a hipotensión y síntomas relacionados con la infiltración plasmática (Halstead, 2012).

Considerando que el dengue se presenta como un espectro continuo de enfermedad en lugar de enfermedades distintas (Hadinegoro, 2012), en 2009 la OMS sugirió una clasificación de acuerdo a niveles de gravedad: dengue no grave (FD y FHD), que incluye aquellos casos con y sin signos de alarma, los signos de alarma son: vómito, dolor abdominal, hepatomegalia, edema, letargia, hemorragia en mucosas, aumento del hematocrito y trombocitopenia, por lo que se recomienda la hospitalización de los casos de dengue con signos de alarma (WHO, 2009) y los casos graves de dengue caracterizados por extravasación plasmática grave que conduce a choque hipovolémico (SCD), acumulación de líquidos con insuficiencia respiratoria; sangrado intenso, y compromiso orgánico

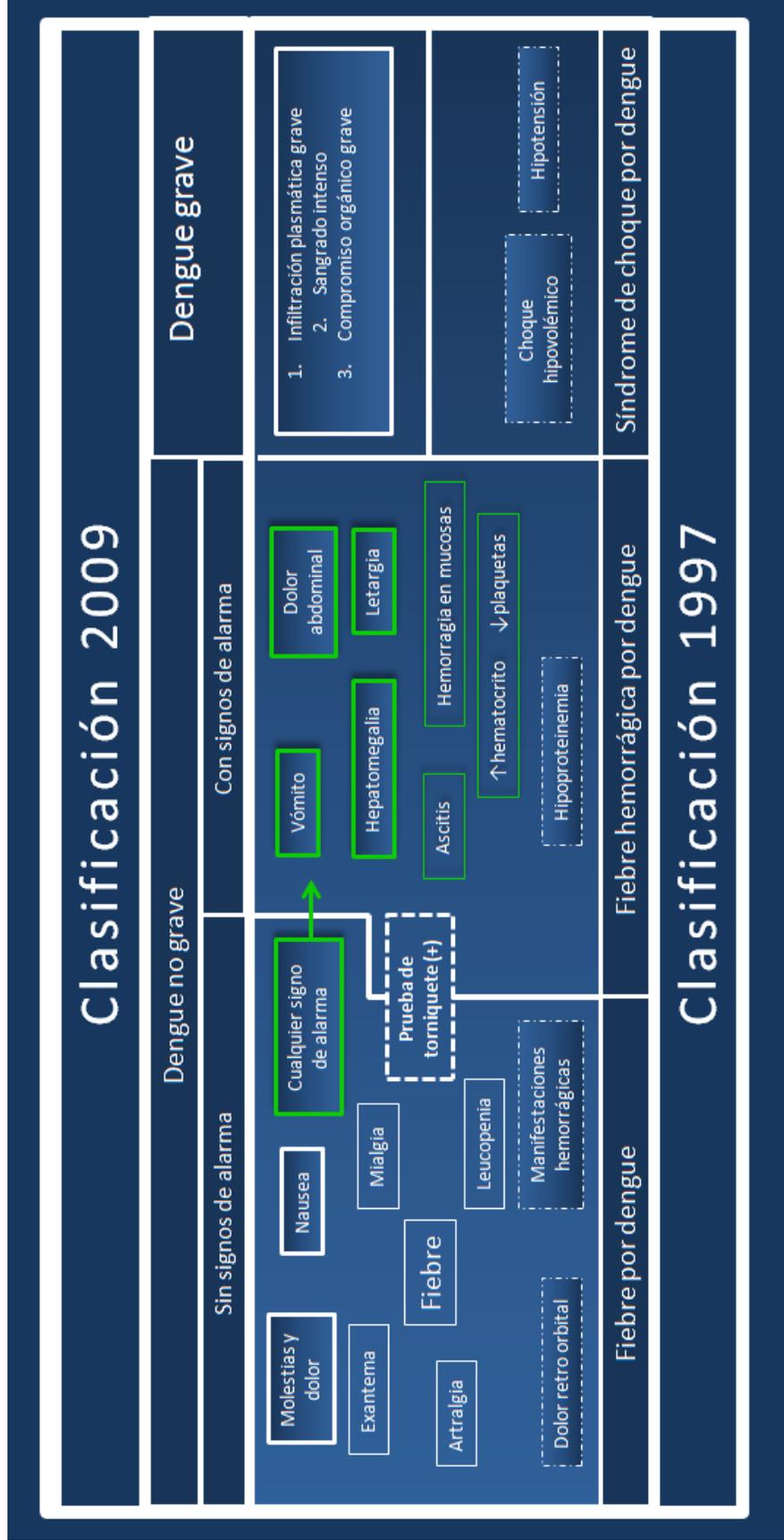


Figura 2. Clasificación clínica de los casos de dengue propuesta por la OMS en 1997 y 2009. En verde se enmarcan los signos de alarma, los cuadros de línea gruesa muestran los parámetros propuestos en la clasificación de 2009, los cuadros de línea discontinua muestran los parámetros propuestos en la clasificación de 1997, los cuadros de líneas delgadas muestran los signos y síntomas compartidos entre clasificaciones, la prueba de torniquete pasó de ser característica de la FHD a un signo del dengue sin signos de alarma (Fuente original).

grave que involucra hígado, sistema nervioso central, corazón u otros órganos (WHO, 2009) (Figura 2).

1.2. Fases de la enfermedad

De acuerdo a los síntomas, carga viral y evolución de la enfermedad, el dengue se puede clasificar en fases para facilitar su estudio.

El periodo de incubación comienza con la picadura del mosquito infectado y dura de cinco a siete días, tras los cuales comienza el periodo de viremia y los síntomas febriles que pueden durar de dos a siete días. Durante la fase de viremia, mosquitos no infectados pueden adquirir el virus al alimentarse (Mongkolsapaya y cols., 2003).

El día cero se designa al día de disminución de la fiebre, 48 horas después la carga viral baja hasta volverse indetectable y el paciente tiende a mejorar. Después del día cero se presentan los signos de alarma y la progresión a formas graves de la enfermedad (Mongkolsapaya y cols., 2003) (Figura 3).

1.3. Epidemiología y situación en México

El primer registro compatible con la sintomatología del dengue se encuentra reportado en una enciclopedia médica china que data de 992 d.C., la enfermedad era descrita como una “intoxicación por agua” relacionada con insectos voladores (Murray, Quam y Wilder-Smith, 2013).

El término dengue, se origina como una adaptación de la frase Swahili *ka dinga pepo*, que significa “un ataque repentino causado por un espíritu maligno o plaga”, el Dr. James Christie propuso que la frase y la enfermedad atravesaron el Pacífico desde el este de África hacia el Caribe en 1827 (Rigau-Pérez, 1998).

En Cuba esta frase se popularizó y asoció con la palabra española “dengue”, mientras que en las Antillas británicas se asoció con la palabra “dandy”, ambos términos indican gestos de fastidio, movimientos dolorosos y pasos torpes en los pacientes (Rigau-Pérez, 1998).

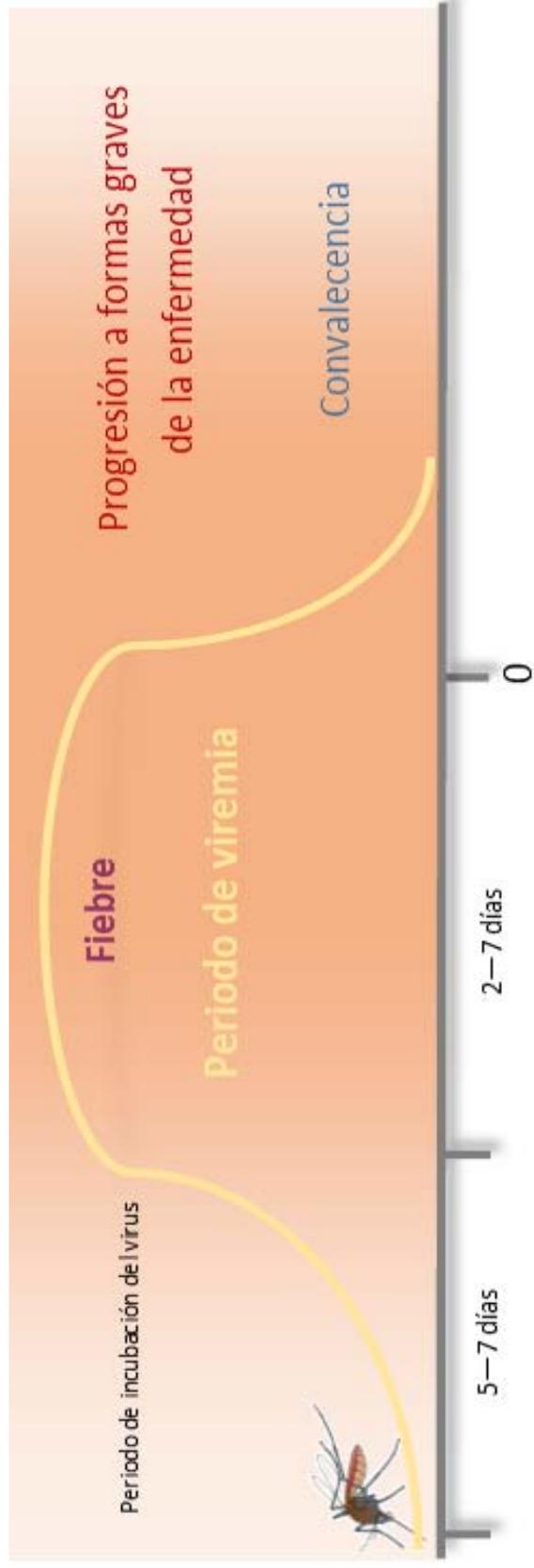


Figura 3. Fases del dengue. A partir de la picadura del mosquito hasta la resolución de la infección (Fuente original).

En 1800 el vector estaba ampliamente distribuido en las zonas costeras tropicales del mundo debido a la expansión comercial marítima, estas embarcaciones navieras permitieron el transporte de humanos y criaderos del mosquito, completándose el ciclo de transmisión (Murray, Quam y Wilder-Smith, 2013).

La expansión de la enfermedad ocurrió durante la Segunda Guerra Mundial, cuando las tropas comenzaron a dispersarse y utilizar el transporte moderno dentro y entre países (Murray, Quam y Wilder-Smith, 2013). Estos aspectos y la rápida urbanización condujeron a un aumento de la transmisión del dengue y la circulación de distintos serotipos principalmente en el sureste de Asia (Gubler, 1998).

Los registros de la transmisión del dengue en México datan de 1941, cuando se notificaron 6955 casos, cifra que fue descendiendo a medida que avanzaban las medidas de erradicación de la fiebre amarilla y malaria propuestas por la Organización Panamericana de la Salud, de esta manera se eliminó el vector y por lo tanto se restringió la transmisión del DENV a través del territorio nacional (Narro-Robles, 1995), y del continente americano (Murray, Quam y Wilder-Smith, 2013).

La campaña terminó a finales de los años setenta, por lo tanto, la enfermedad reemergió y se diseminó por el territorio en menos de 10 años (Narro-Robles, 1995), de tal forma que a partir de 1984 y hasta 1993 se notificaron únicamente 26 casos, posteriormente se reportaron 30 casos en 1994 y en 1995 se confirmaron un total de 358 casos de FHD por parte de la Dirección General de Epidemiología en 18 estados de la república con una tasa de mortalidad del 7.8%. En ese mismo año se realizaron 245 aislamientos virales desde agosto hasta diciembre, lo que representa el 36% de estos en un periodo de 14 años (Briseño-García y cols., 1996).

La amplia distribución de los casos, del vector y la hiperendemicidad demostraba un riesgo latente para la población (Briseño-García y cols., 1996).

A la fecha se ha reportado la circulación de los cuatro serotipos de dengue en el país, durante el año 2013 se confirmaron un total de 62,330 casos; de los cuales 18,667 (30%) eran casos de FHD y 43,663 (60%) casos de FD. Se observó un incremento del 24% de casos confirmados en 2013 respecto a 2012, el estado con

mayor número de casos confirmados fue Veracruz con 8,799, Baja California Sur fue el estado con mayor incidencia: 475.56 (por cien mil habitantes). Se notificaron un total de 104 defunciones (Secretaría de Salud, 2013).

El InDRE reportó en 2013 un total de 6,311 aislamientos del virus con una predominancia del 49% del DENV-1, seguido por el DENV-2 con el 48% mientras que el DENV-3 y -4 concentraron el 3% (Secretaría de Salud, 2013) (Figura 4).

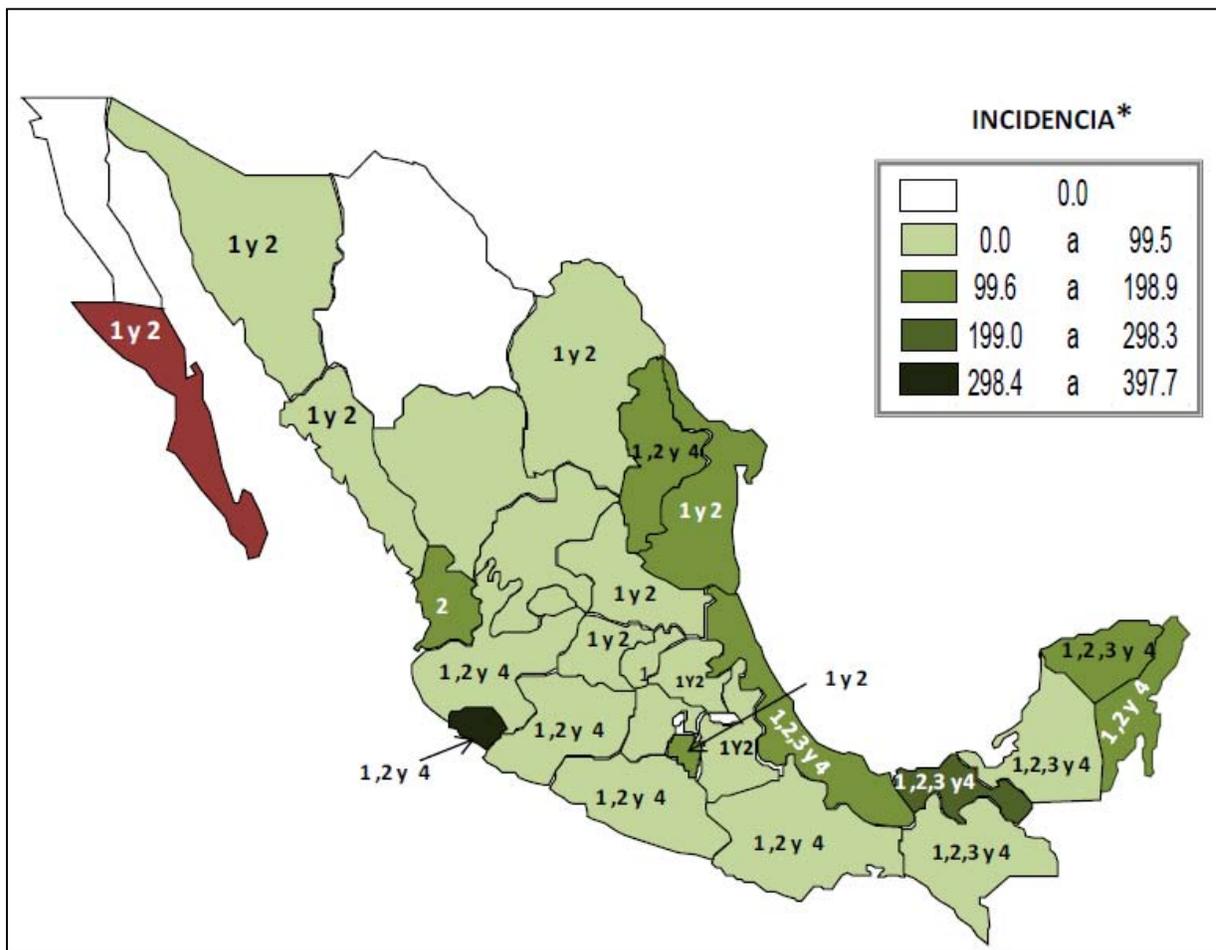


Figura 4. Incidencia y serotipos virales aislados en casos confirmados de dengue por entidad federativa en México durante el año 2013 (Tomado de: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2013/Pano_dengue_se_m52_sem2013.pdf, Consultado en enero de 2014).

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de dengue se lleva a cabo mediante el aislamiento de la partícula viral, la identificación a través de inmunofluorescencia o la detección del genoma viral (mediante RT-PCR en tiempo real o punto final), también se puede diagnosticar con técnicas serológicas que evidencien la presencia de antígenos virales o de anticuerpos, en 2008 la Secretaría de Salud implementó un algoritmo de diagnóstico que utiliza muestras de suero obtenidas después del inicio de la fiebre (Secretaría de Salud, 2008) (Figura 5).

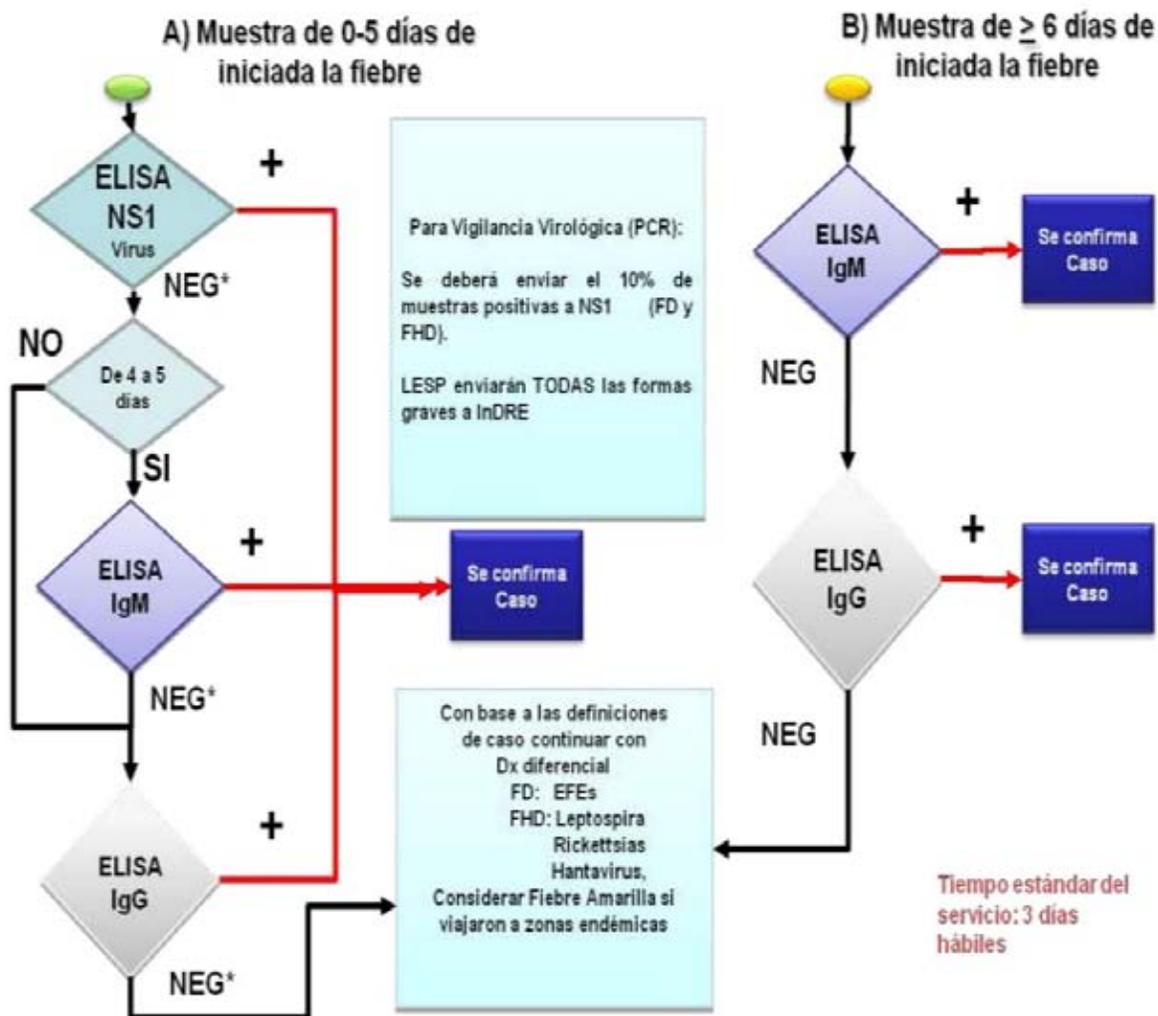


Figura 5. Algoritmo de diagnóstico de dengue por laboratorio (Secretaría de Salud, 2008).

a) Muestras obtenidas entre 0-5 días posteriores al inicio de la fiebre.

Se puede determinar el antígeno viral (NS1) por ELISA, un resultado positivo confirma el caso. Si el caso es negativo se realiza la siguiente prueba indicada en el algoritmo: identificación de IgG por ELISA (cuando la muestra tenga de 0-3 días de iniciada la fiebre) o ELISA para IgM (cuando la muestra tenga de 4-5 días de iniciada la fiebre), un resultado positivo en ambos casos, confirma el caso. Si el resultado para IgM es negativo se deberá realizar un ELISA para IgG, si el resultado es positivo, se confirma el caso y si es negativo se considera una muestra negativa para dengue y se deberá realizar diagnóstico diferencial para otros arbovirus y enfermedades febriles exantemáticas (Secretaría de Salud, 2008).

b) Muestras obtenidas a partir del sexto día del inicio de la fiebre.

Únicamente se determinan anticuerpos de tipo IgM e IgG por ELISA. En ambos casos, un resultado positivo confirma el caso (Secretaría de Salud, 2008).

Para vigilancia epidemiológica, se selecciona el 10% de las muestras positivas a NS1 en casos de FD, con las cuales se realiza cultivo y aislamiento viral para poder identificar el serotipo infectante. De igual manera, los casos de extrema urgencia y todas las muestras de FHD se analizan mediante RT-PCR (Secretaría de Salud, 2008; Islas-Arenas, 2013).

1.5. Tratamiento y prevención

El tratamiento se basa en recomendar al paciente sin signos de alarma reposo, ingesta de líquidos, uso de paracetamol como medida paliativa, evitar el uso de ácido acetil-salicílico y antiinflamatorios no esteroideos, mientras que en los casos con signos de alarma se requiere la hospitalización inmediata del paciente, el manejo hídrico es a base de hidratación oral en las formas leves y en caso necesario se recurre al uso de soluciones parenterales como la solución de Hartman o solución salina fisiológica (Secretaría de Salud, 2006).

En ningún caso está recomendado el uso de antivirales (Secretaría de Salud, 2006), ya que podrían generar variabilidad genética en el virus.

De igual manera no se recomienda el uso de corticoesteroides (Secretaría de Salud, 2006), ya que varios estudios han demostrado que no disminuyen la mortalidad, la necesidad de transfusiones, las complicaciones, ni los días de hospitalización (Martínez, 2008) y a pesar de tampoco encontrar un incremento de la viremia (Tam y cols., 2012), los autores de dichos estudios no recomiendan su uso a menos de que se trate de estudios clínicos (Martínez, 2008).

La administración de vitamina K tampoco está recomendada en los casos de hemorragia (Secretaría de Salud, 2006) ya que su función como activador de factores de coagulación no lograría su objetivo debido a la trombocitopenia observada en los casos graves de dengue.

En la actualidad hay diferentes vacunas que se encuentran en desarrollo, entre ellas vacunas inactivas, atenuadas, de subunidades, quiméricas y vacunas de DNA (Yauch y Shresta, 2014).

La existencia de cuatro serotipos y la interferencia viral, complican la producción de una vacuna efectiva. Una vacuna eficiente contra el dengue debe proveer inmunidad neutralizante a largo plazo evitando el fenómeno ADE y hasta el momento ninguna ha logrado proveer evidencia suficiente para su comercialización (Yauch y Shresta, 2014).

Por lo tanto, la prevención del dengue recae en el control eficiente del vector, el control larvario evita los criaderos del mosquito principalmente en cúmulos de agua en las viviendas, mientras que la aplicación de adulticidas evitan el desarrollo de la larva y la propagación del mosquito (Secretaría de Salud, 2006).

1.6. Agente etiológico

Los virus del dengue pertenecen al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Los viriones maduros son esféricos, envueltos y tienen un diámetro aproximado de 40 a 50 nm (Lindenbach, Heinz-Jürgen y Rice, 2007) (Figura 6).

El material genético es una cadena sencilla de RNA con una longitud de 10.7 kb de polaridad positiva con un único marco abierto de lectura, hacia el extremo N-terminal se encuentran codificadas las proteínas estructurales de cápside, membrana y envoltura (Lindenbach, Heinz-Jürgen y Rice, 2007).

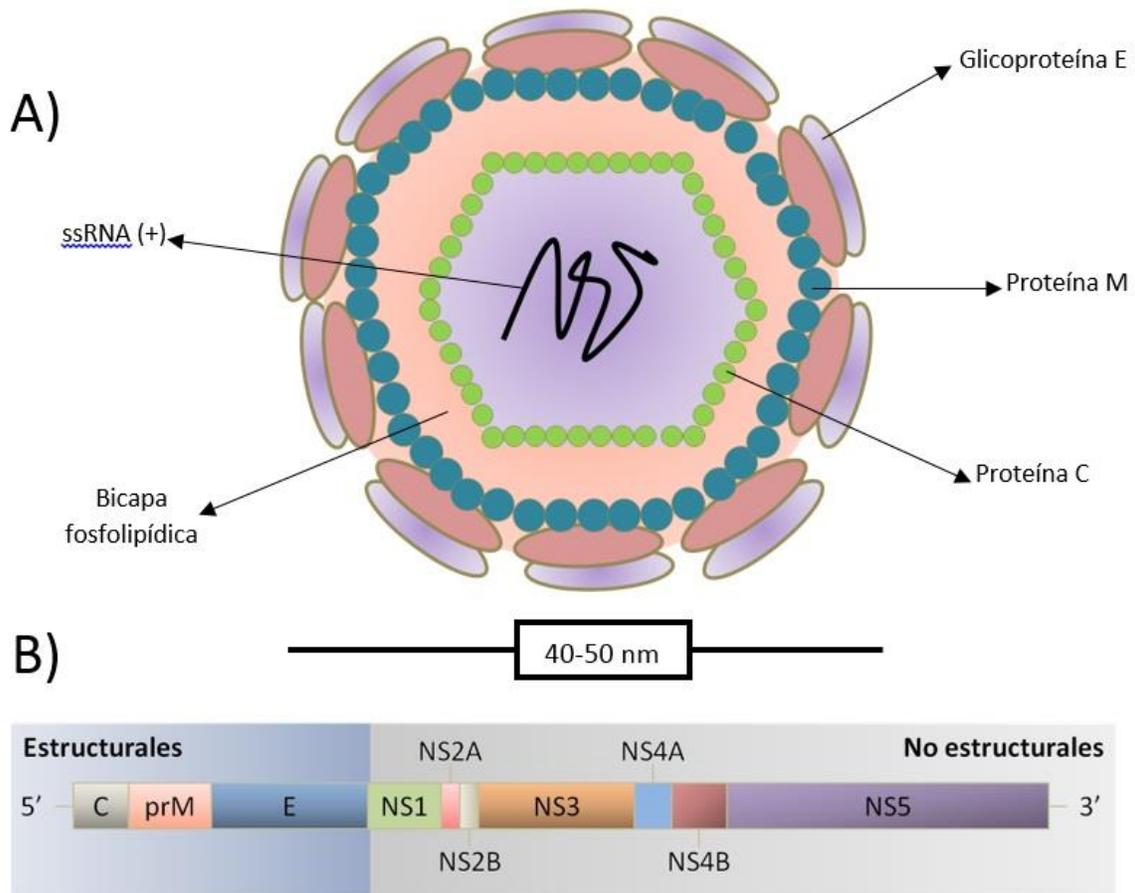


Figura 6. (A) Estructura y (B) Genoma del virus del dengue que codifica la poliproteína viral compuesta por 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales. Las proteínas estructurales C (cápside), prM (precursor de membrana), E (envoltura). Proteínas no estructurales (NS del inglés *nonstructural*) NS1, N2A y NS2B, NS3, NS4A y NS4B, NS5 (Fuente original).

La proteína de cápside (C) tiene un peso de 11 kDa y envuelve al RNA viral de tal manera que se forma una nucleocápside icosaédrica la cual tras el proceso de ensamblaje se envolverá en una bicapa fosfolipídica que servirá como lugar de anclaje de las otras dos proteínas estructurales (Velandía y Castellanos, 2011).

La proteína de membrana (sintetizada como un precursor de membrana prM) tras la maduración, se convierte en la proteína M con un peso de 26 kDa (Velandía y Castellanos, 2011).

La glicoproteína E pesa 50 kDa y posee tres dominios denominados I, II y III (Velandía y Castellanos, 2011); en los viriones maduros se encuentra formando complejos heterodiméricos de tipo cabeza-cola que le dan un aspecto liso a la superficie viral (Lindenbach, Heinz-Jürgen y Rice, 2007).

E es la responsable de la unión al receptor y, de la fusión de las membranas tras la endocitosis (Lindenbach, Heinz-Jürgen y Rice, 2007), además de ser la proteína contra la cual se generan la mayoría de anticuerpos neutralizantes (Wahala y de Silva, 2011).

Por otro lado, en el extremo C-terminal se encuentran codificadas las proteínas no estructurales (NS del inglés *nonstructural*) que cumplen con diversas funciones (Lindenbach, Heinz-Jürgen y Rice, 2007) (Figura 7).

NS1 tiene un papel importante en la replicación del RNA y se puede hallar soluble en el plasma, en membranas o en el espacio extracelular (Rothman, 2011).

NS2A está involucrada en el ensamblaje viral, NS2A, NS4A y NS4B, actúan como antagonistas del IFN, inhibiendo su señalización (Lindenbach, Heinz-Jürgen y Rice, 2007).

NS2A y NS2B actúan como serín proteasas durante el procesamiento proteolítico de las demás proteínas no estructurales (Falgout y cols., 1991; Velandía y Castellanos, 2011).

NS3 tiene actividad de RTPasa, NTPasa y helicasa, mientras que NS2B le confiere estabilidad al dominio serín proteasa de NS3 durante su actividad proteolítica (Lindenbach, Heinz-Jürgen y Rice, 2007).

La función de helicasa de NS3 actúa desenrollando las estructuras secundarias que se forman en el extremo 3' del RNA viral para favorecer la unión de la polimerasa

NS5 sobre el RNA y dar inicio a la replicación (Velandía y Castellanos, 2011).

NS4A señala la translocación de NS4B al lumen del retículo endoplásmico y está implicada en el reordenamiento de las membranas celulares durante la replicación viral, NS4B también interactúa con NS3 para regular la replicación del RNA, además es esencial para la replicación viral en cultivo celular y, en modelos animales, podría ser una clave determinante para la secreción de citocinas como IL-6, IL-8, TNF- α e IFN- γ (Acosta, Kumar y Bartenschlager, 2014).

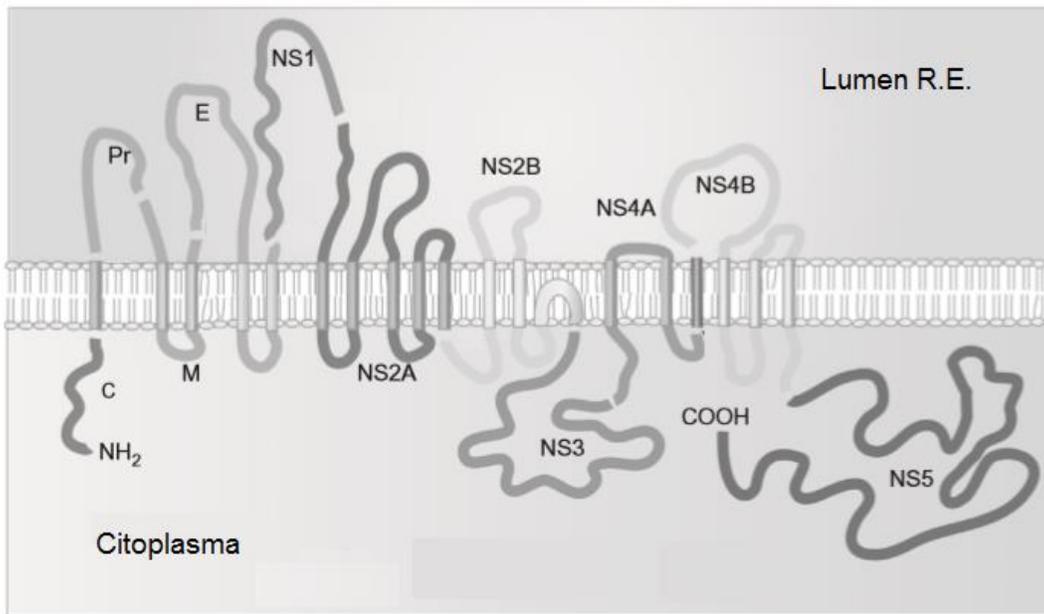


Figura 7. Representación esquemática de la topología membranar de la poliproteína de DENV (Modificado de Acosta, Kumar y Bartenschlager, 2014).

NS5 está altamente conservada en los flavivirus, el extremo amino terminal posee actividad enzimática de metiltransferasa y guaniltransferasa responsables del *capping* y la metilación del extremo 5' del RNA mientras que en el extremo carboxi terminal se ubica el dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) (Velandía y Castellanos, 2011), además, NS5 es un inductor de IL-8 (Acosta, Kumar y Bartenschlager, 2014) y al interactuar con NS3 aumenta sus actividades de NTPasa y RTPasa (Lindenbach, Heinz-Jürgen y Rice, 2007).

v) JUSTIFICACIÓN

Debido a que existe evidencia que posiciona a los linfocitos B como las células blanco del dengue y, se ha documentado la producción de citocinas proinflamatorias y la inducción de apoptosis a partir de la infección; surge la inquietud de generar un documento que analice los mecanismos que involucren a los linfocitos B en la diseminación viral, patogenia y progresión a cuadros graves de la enfermedad a partir de las evidencias publicadas hasta la fecha, de tal forma que esta compilación hemero-bibliográfica sirva como apoyo de investigaciones futuras.

2. PATOGENIA

Para comprender el daño observado en las formas graves de la enfermedad y la razón por la cual algunos pacientes cursan una infección autolimitada, se deben conocer los elementos involucrados en la interacción virus-célula y comprender los mecanismos de replicación y la respuesta inmune inducida por dichos eventos.

Además, se debe tener en cuenta, que existen factores asociados al virus y al hospedero que favorecen las condiciones para contraer el dengue, sin olvidar los aspectos clínicos, inmunológicos, patológicos y epidemiológicos relacionados con la enfermedad.

2.1. Estrategia de replicación viral

La partícula viral se internaliza en la célula blanco por medio de endocitosis, la formación de la vesícula endosomal y la baja de pH (~6.0) provoca la trimerización de la glicoproteína E y la fusión de las membranas permitiendo la liberación al citoplasma de la nucleocápside y del material genómico viral (Acosta, Kumar y Bartenschlager, 2014) (Figura 8).

Se ha demostrado la localización de proteínas no estructurales y de dsRNA en membranas vesiculares inducidas por virus formadas por la invaginación de la membrana del retículo endoplásmico (RE), por lo tanto se piensa que tanto la replicación como la traducción se llevan a cabo en dichas estructuras (Acosta, Kumar y Bartenschlager, 2014).

La traducción del RNA da lugar a la poliproteína viral (Figura 6), durante esta etapa NS1 puede secretarse al espacio extracelular en su forma soluble o asociarse a las membranas celulares generando la producción de anticuerpos anti-NS1. La replicación del material genómico inicia con la síntesis de una molécula de RNA de polaridad negativa (-) llamado intermediario de replicación (IR) que sirve como molde para la síntesis de nuevas cadenas de polaridad positiva (+), la asociación de ambas hebras (+ y -) forman una molécula de RNA

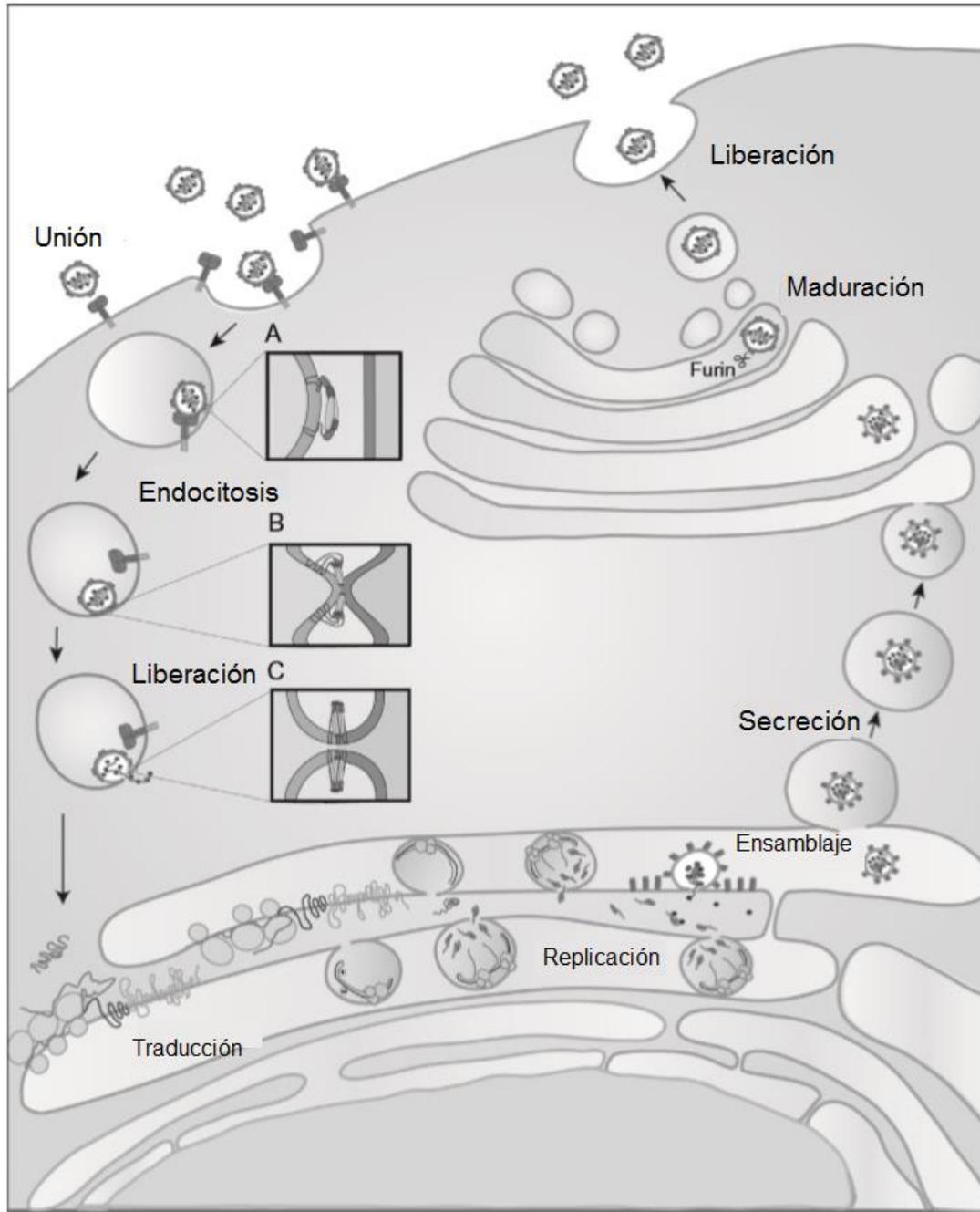


Figura 8. Ciclo de replicación DENV. El virus se une a su receptor y entra a la célula por endocitosis. La fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal libera la nucleocápside y el RNA viral en el citoplasma. La traducción del RNA genera una poliproteína compuesta por tres proteínas estructurales (C, prM, y E) y siete proteínas no estructurales (NS1/NS2A/NS2B/NS3/NS4A/NS4B y NS5) las cuales son escindidas por proteasas virales y celulares. La replicación viral se lleva a cabo en vesículas membranales derivadas del RE inducidas por proteínas virales. El ensamblaje viral se lleva a cabo en el RE y los viriones inmaduros brotan del RE para madurar en el compartimento trans del AG donde se genera el procesamiento proteolítico de prM por furina. Las partículas virales maduras se secretan al medio extracelular (Modificado de Acosta, Kumar y Bartenschlager, 2014).

de doble cadena (forma replicativa), la nueva cadena de RNA (+) se libera del IR y puede iniciar un nuevo ciclo de traducción o ser utilizada durante el ensamblaje de nuevos viriones (Bartenschlager y Miller, 2008; Rothman, 2011).

Los viriones se ensamblan en la membrana del R.E. y entran en el lumen como partículas inmaduras con una superficie rugosa debido a la trimerización de heterodímeros E/prM que forman espículas en la envoltura viral. Dichos viriones pueden ser liberados de la célula mediante exocitosis y por si solos no son infectivos, sin embargo, se generan anticuerpos específicos contra la proteína prM (Wahala y de Silva, 2011).

Durante la maduración, en el compartimiento trans del aparato de Golgi, una proteasa celular (furina) escinde a prM para generar a la proteína M, lo cual resulta en el rearrreglo de los trímeros E/prM que dan lugar a la formación de heterodímeros que descansan de manera paralela sobre la superficie de la membrana fosfolipídica, dando un aspecto liso a los viriones maduros, los cuales salen de la célula mediante exocitosis (Wahala y de Silva, 2011; Rothman, 2011).

2.2. Participación del sistema inmune en la patogenia

La picadura del mosquito vector inicia la infección al inyectar viriones en los estratos de la piel, las partículas virales entran en contacto con las células de la epidermis infectando queratinocitos (Limon-Flores y cols., 2005) y células de Langerhans (Martina, Koraka y Osterhaus, 2009).

Además, en la epidermis residen otras células del sistema inmune como los linfocitos T CD8⁺, mientras que en la dermis se encuentran macrófagos, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T $\alpha\beta$, linfocitos T $\gamma\delta$ y células NKT (Nestle y cols., 2009; Pasparakis, Haase y Nestle, 2014), todas pudiendo ser blancos potenciales de la infección.

Por otro lado las células dendríticas de la dermis y las células de Langerhans de la epidermis expresan altos niveles de DC-SIGN (Tassaneetrithep y cols., 2003) facilitando la infección mediada por receptor (Figura 9).

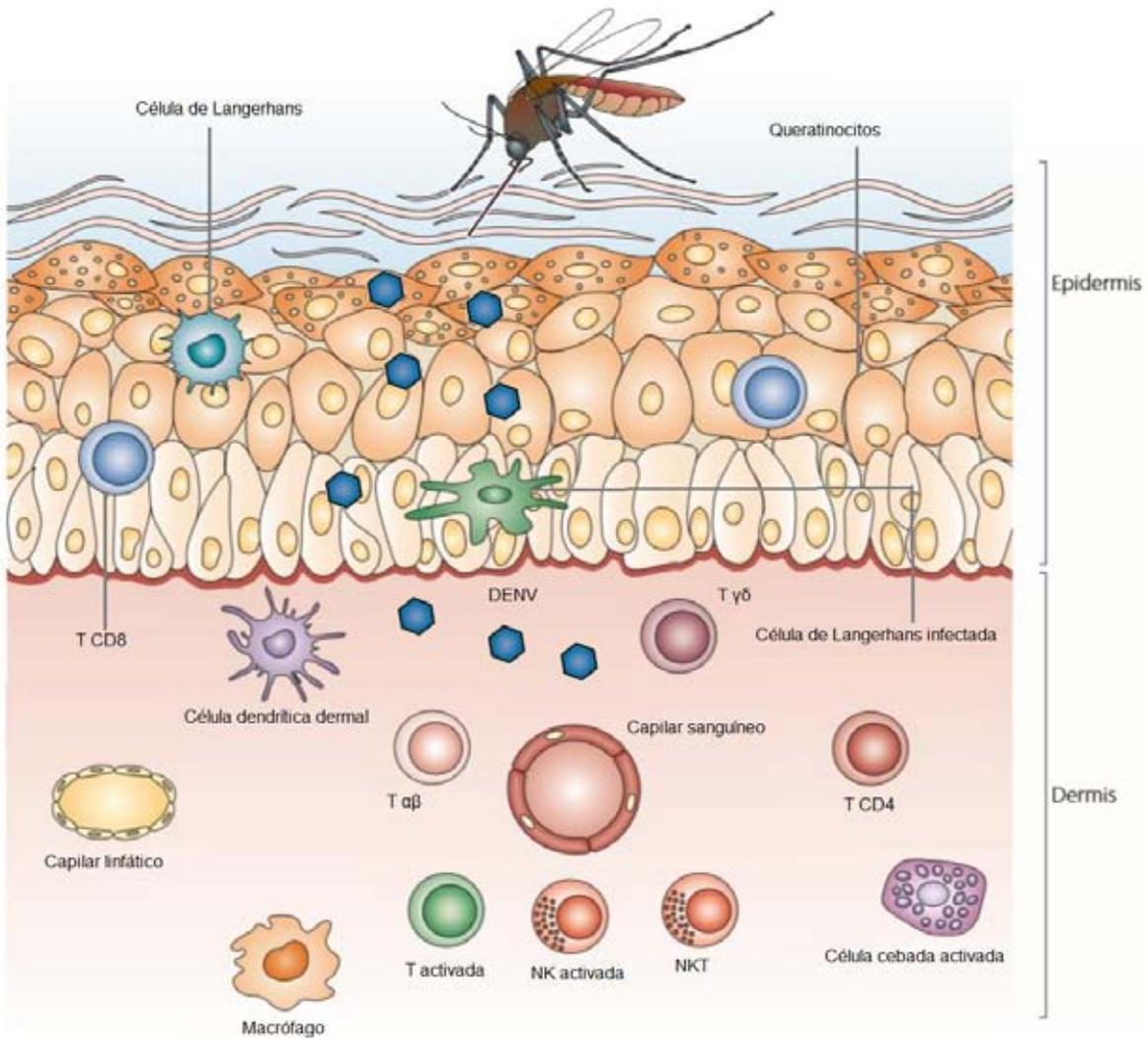


Figura 9. Esquema representativo de la inoculación de DENV por la picadura del mosquito vector y células como potenciales blancos en la infección (Modificado de Nestle y cols., 2009).

La infección puede activar células cebadas de la dermis provocando una respuesta local inflamatoria y por lo tanto el reclutamiento de leucocitos provenientes de la circulación sanguínea como células NK y linfocitos T, el drenaje linfático y vascular de la dermis permite el tráfico de células infectadas hacia los ganglios linfáticos más cercanos donde el virus es capaz de infectar y replicarse en células fagocíticas las cuales pueden transitar por la linfa hacia otros ganglios iniciando el periodo de incubación y la expansión viral (St. John, Abraham y Gubler, 2013).

La evidencia epidemiológica sugiere que, en el caso de una segunda infección con un serotipo viral diferente al de la primoinfección, existe una alta probabilidad de desarrollar formas graves de la enfermedad. Éste fenómeno fue descrito por Halstead y O’rourke en 1977, quienes explicaron que durante una segunda infección con un virus heterólogo se producen anticuerpos de reactividad cruzada, que no pueden neutralizar pero si aumentar la infección gracias a la formación de complejos virus-anticuerpo y la unión a receptores Fc (FcR) en monocitos y macrófagos. Éste fenómeno se conoce como “infección facilitada por anticuerpos” o ADE (*Antibody Dependent Enhancement*) (Halstead y O’rourke, 1977; Lei y cols., 2001; Kurane, 2007).

La respuesta humoral frente al DENV se caracteriza principalmente por la producción de anticuerpos contra la glicoproteína E, de los cuales, algunos anticuerpos producidos contra un epítipo lineal de E reconocen plasminógeno humano e inhiben la actividad de la plasmina (Lei y cols., 2001).

En sueros de pacientes se han encontrado inmunoglobulinas anti prM que generan complejos Ag-Ac con partículas inmaduras inicialmente no infectivas, facilitando la entrada a las células mediante la unión del complejo a un FcR, y por lo tanto, aumentando la progenie viral (Rothman, 2011).

Los anticuerpos generados contra NS1 reconocen plaquetas y células endoteliales que estimulan la expresión de IL-6, IL-8, ICAM-1 y MCP-1 y la producción de óxido nítrico (NO) induciendo apoptosis (Lin y cols., 2005), exacerbando la inflamación y aumentando el riesgo de extravasación plasmática.

Los anticuerpos anti NS1 que reconocen la proteína unida a membrana celular pueden inducir citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) o activar la vía clásica del complemento como lo hacen los complejos Ag-Ac formados con anticuerpos de reactividad cruzada o aquellos que reconocen a NS1 soluble en el espacio extracelular (Martina, Koraka y Osterhaus, 2009; Rothman, 2011).

La importancia del complemento en la patogenia de la enfermedad no se limita a la etapa de viremia, se ha reportado que los niveles de C3a y C5a (productos de

activación del complemento) están relacionados con la progresión a FHD y se elevan al tiempo que disminuye la fiebre cuando la extravasación plasmática se vuelve más aparente (Kurane, 2007).

Aunado a lo anterior, las diferencias en la gravedad de la enfermedad pueden observarse en niveles individuales y de población. Diversos estudios epidemiológicos indican que existen factores genéticos del hospedero implicados en la susceptibilidad a desarrollar cuadros graves de la enfermedad (Martina, Koraka y Osterhaus, 2009).

Varios alelos del HLA-I y HLA-II están asociados con el desarrollo de la FHD, así como algunos polimorfismos de nucleótido único (SNP's) en el gen de TNF- α , Fc γ RII, DC-SIGN, CTLA-4, CTLA-1, TGF- β , receptor de vitamina D, así como en TAP1 y TAP2. La deficiencia en la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa permite una elevada producción viral en monocitos, el polimorfismo en el gen de lectina de unión a manosa 2 MBL-2, ha mostrado estar asociado a la trombocitopenia e incrementa el riesgo al desarrollo de la FHD (Martina, Koraka y Osterhaus, 2009; St. John, Abraham y Gubler, 2013).

Todos estos eventos tienen como consecuencia la activación celular y la producción aparentemente sin control de múltiples factores pro-inflamatorios, mediadores de la inflamación y receptores solubles, que en conjunto se les conoce como la "tormenta de citocinas", ya que solas o en combinación median cambios funcionales en las células endoteliales promoviendo la vasculopatía característica de las formas graves del dengue (Rothman, 2011).

En los pacientes que progresan a SCD se observan niveles altos de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, TGF1 β , TNF- α , IFN- γ (Martina, Koraka y Osterhaus, 2009). La IL-8 tiene efecto en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 (Lin C y cols., 2005), mientras que las IL-6 e IL-8 alteran la coagulación y fibrinólisis (Martina, Koraka y Osterhaus, 2009).

Otros factores solubles también están involucrados, como es el caso de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) que actúa sinérgicamente con TNF- α

para inducir la expresión del factor tisular en células endoteliales. Mientras que MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1), causa aperturas en las uniones de las células endoteliales *in vitro* y eleva la permeabilidad endotelial *in vivo*. Se ha documentado de igual forma la presencia de trombopoyetina, sVCAM-1, sICAM-1, antígeno de von Willebrand, trombosmodulina, E-selectina, factor tisular, PAI-1 (inhibidor activador de plasminogeno 1) y activador de plasminógeno tisular (Martina, Koraka y Osterhaus, 2009; Rothman, 2011).

2.3. Tropismo celular y receptores

El virus del dengue es capaz de infectar *in vitro* a una gran variedad de células, como células dendríticas, monocitos/macrófagos, linfocitos B y T, células endoteliales, hepatocitos, y células neuronales humanas (Clyde, Kyle y Harris, 2006), así como una gran variedad de líneas celulares representativas de poblaciones monocíticas humanas (K562, THP-1, Raji, HS-Sultan, Daudi, Jurkat, Molt4, Molt3) (Kurane y cols., 1990), células de insectos (C6/36, AP-61 y TRA-284) (Kuno y cols., 1985), primates no humanos (Vero, BS-C-1, CV-1, LLC-MK2) (Rodenhuis-Zybert, Wilschut y Smit, 2010) y otros mamíferos (BHK-21) (Manning y Collins., 1979).

El amplio rango de permisividad celular a la infección por DENV indica que el virus debe adherirse a un receptor de membrana ampliamente distribuido o utiliza múltiples receptores para mediar la infección (Rodenhuis-Zybert, Wilschut y Smit, 2010).

La entrada del virión a la célula está mediada por la unión de la glicoproteína E con su receptor. Se han descrito varios receptores para el DENV, entre los cuales se encuentran HSP-70 y HSP-90 (Reyes-Del Valle, 2005), GRP78, receptor de laminina, receptor de manosa (CD206), heparán sulfato, CD14 (Hidari y Suzuki, 2011; Shah y cols., 2013) y DC-SIGN (del inglés *Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin* o CD209), siendo el receptor mejor caracterizado (Navarro-Sanchez y cols., 2003; Tassaneetrithep y cols., 2003; Lozach y cols., 2005), que interacciona con el virus a través del reconocimiento en sitios glicosilados de la

proteína E (Asn 67 y Asn 153) (Alen y cols., 2012). Éste último se expresa principalmente en células dendríticas inmaduras (Tassaneetrithep y cols., 2003).

La identificación del tropismo tisular y celular del DENV puede tener un impacto mayor en el desarrollo de la infección y la identificación de dichas células es parte clave en el entendimiento de la patogenia del dengue.

Aunque no se ha podido esclarecer por completo que células permiten la replicación de DENV *in vivo*, un consenso general señala a las células pertenecientes al linaje fagocítico mononuclear como blancos principales de la infección en humanos (Clyde, Kyle y Harris, 2006).

Kou y colaboradores (2008) identificaron a los monocitos como las únicas células mononucleares de sangre periférica (PBMC) capaces de replicar el virus del dengue *in vitro* (Kou y cols., 2008). Blackley y colaboradores (2007) afirman que los macrófagos esplénicos son los blancos principales de la infección *in vitro* (Blackley y cols., 2007).

Sin embargo, otros estudios *in vitro* han demostrado la replicación viral activa en cultivos primarios de PBMC y líneas celulares mononucleares humanas representativas de monocitos, linfocitos T y linfocitos B, siendo la línea celular Raji (linfocitos B transformados con virus de Epstein-Barr) la más permisiva a la infección por los cuatro serotipos del virus (Kurane y cols., 1990; Bielefeldt-Ohmann y cols., 2001), además de mostrar una infección persistente pudiendo identificar antígenos virales de DENV después del décimo y vigésimo pase celular, lo anterior sugiere una expansión viral provocada por la interacción célula-célula (Kurane y cols., 1990).

Además, Theofilopoulos y colaboradores realizaron cultivos primarios de linfocitos T y B purificados sin estímulo identificando la adsorción del virus en ambas poblaciones; la replicación y liberación de partículas virales se observó únicamente en linfocitos B (Theofilopoulos y cols., 1976).

Por lo anterior, es evidente la necesidad de estudios que puedan explicar los mecanismos de la infección *in vivo*, pero estos son escasos, no solo por la falta de un modelo animal, sino por las dificultades que representa obtener muestras de pacientes que cursen la enfermedad, especialmente aquellos que sufren de manifestaciones hemorrágicas.

La información disponible hasta la fecha acerca de las células y tejidos susceptibles a la infección viral se ha derivado de la examinación de muestras sanguíneas y tejidos de necropsia de pacientes con dengue.

En los casos fatales, se ha podido acceder a tejidos post-mortem y se han hallado antígenos virales en órganos como el bazo, ganglio linfático, pulmón, riñón, médula ósea (Bhoopat y cols., 1996; Rosen, Drouet y Deubel, 1999; Jessie y cols., 2004; Basilio de Oliveira y cols., 2005; Balsitis y cols., 2009; Pova y cols., 2014), y en células hematopoyéticas dentro de estos tejidos, por otro lado, no se han encontrado antígenos en células del parénquima (Tabla 1) (Bhoopat y cols., 1996).

Esto sugiere que, las células del sistema inmune podrían estar participando en la diseminación viral, especialmente las mononucleares como los monocitos/macrófagos y, los linfocitos T y B (Tabla 1).

Debido a lo anterior, la identificación de la población celular blanco de la infección, a partir de muestras sanguíneas, apoya las teorías que postulan a estas células como participantes en la patogenia del dengue.

Hasta el momento, los estudios que se han planteado identificar la célula mononuclear de sangre periférica blanco de la infección natural, señalan a los linfocitos B como la población celular más susceptible al DENV (Boonpucknavig y cols., 1976; King y cols., 1999; Baclig y cols., 2010; Srikiatkachorn y cols., 2012).

Por otro lado, Durbin y colaboradores, demostraron que los monocitos activados son células blanco de la infección, cabe mencionar que los autores hacen notar las limitaciones en su estudio y refieren que a pesar de sus resultados, la replicación viral podría llevarse a cabo en otras poblaciones celulares como los linfocitos B

(Durbin y cols., 2008), debido a que existen diferencias entre el patrón de tráfico celular de los monocitos con respecto a los linfocitos B (King y cols., 1999).

Los monocitos al egresar de la médula ósea entran a la circulación sanguínea y en caso de inflamación, migran al tejido dañado (Ivashkiv y DiMartino, 2012) donde pueden diferenciarse a macrófagos, los cuales tras realizar su función de fagocito o célula presentadora de antígeno, se eliminan por apoptosis, de esta forma, los macrófagos representan una población que solo transita del órgano linfoide primario al tejido (King y cols., 1999)

Sin embargo, también pueden diferenciarse a células dendríticas con la capacidad de migrar a órganos linfoides (Imhof y Aurrand-Lions, 2004) donde deberán presentar su antígeno a los linfocitos T que migran entre los ganglios (Förster, Braun y Worbs, 2012)

Cabe mencionar que si bien los monocitos se diferencian al entrar a tejidos, hay evidencia que señala su capacidad para entrar al ganglio linfoide a través del HEV durante el proceso inflamatorio (Palframan y cols., 2001), y salir del ganglio a través de los vasos linfáticos eferentes a sangre periférica, de esta forma, la migración podría ser tan compleja como la de los linfocitos.

Los cuales tienen la capacidad de explorar los órganos linfoides en busca de su antígeno específico y en caso de no encontrarlo, regresar al torrente sanguíneo (von Andrian y Mempel, 2003), como resultado es posible observar más linfocitos provenientes de tejidos en sangre periférica que monocitos (King y cols., 1999).

Es por ello que al suponer que la infección por DENV se desarrolla principalmente en órganos linfoides secundarios (Diamond, 2003) se piensa que las células B podrían estar implicadas en la diseminación del virus por el organismo, explicando de cierta manera la presencia de antígenos virales en otros tejidos (Jessie y cols., 2004).

Tabla 1. Células que reaccionaron fuertemente a la tinción con anticuerpo monoclonal anti complejo DENV (D3-2H2-9-21) en tejidos congelados provenientes de pacientes con dengue.

| Órgano | Células del parénquima | Células hematopoyéticas |
|--------------------------|---|---|
| Bazo | RN | Inmunoblastos Linfocitos en la pulpa blanca Células plasmáticas Macrófagos en la pulpa roja |
| Ganglio linfático | RN | Inmunoblastos Linfocitos Células plasmáticas Macrófagos |
| Pulmón | RN | Macrófagos alveolares |
| Riñón | RN | Inmunoblastos Histiocitos Células plasmáticas Linfocitos en el intestino y alrededor de vasos sanguíneos |
| Estómago | RN | Linfocitos en la mucosa Células plasmáticas en la lámina propia |
| Cerebro | Neuronas en el telencéfalo Células de Purkinje y algunas células granulares en el cerebelo Astrocitos, microglia Plexo coroideo alrededor del epitelio y vasos | |

RN= Reacción Negativa

(Tabla modificada de Bhoopat y cols., 1996).

Además, se ha descrito que la infección por DENV en cultivos primarios de linfocitos B induce apoptosis (Fonseca-Coronado, 2005; Vargas-Castillo, 2011) y la expresión de IL-6 y TNF- α (Lin y cols., 2002, Fonseca-Coronado, 2005; Vargas-Castillo, 2011). De esta manera, se piensa que los linfocitos B podrían tener una mayor participación en la patogenia de la enfermedad.

3. DESARROLLO Y FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS B

Los linfocitos B se generan a partir de células troncales hematopoyéticas pluripotenciales y su desarrollo comienza durante la etapa fetal en el hígado y posterior al nacimiento en la médula ósea (LeBien y Tedder, 2008), donde el microambiente favorece el compromiso al linaje de células B, en esta primer etapa comienza la expresión del BCR (Nagasawa, 2006).

Posteriormente, en una segunda etapa, salen de la médula ósea como células inmaduras hacia el bazo donde se diferencian a células maduras inactivas y al terminar este proceso recirculan a través de la sangre y migran a órganos linfoides secundarios, donde se encuentra el microambiente necesario para el reconocimiento de antígenos y la activación completa (Yuseff y cols., 2013) dando como resultado la producción de la forma soluble de su receptor y la organización en diferentes poblaciones celulares en tejidos linfáticos (Rickert, 2013).

Así mismo, la activación por antígeno, provoca la diferenciación a células plasmáticas que son cruciales para mediar la respuesta inmune humoral y tienen la capacidad de regresar y colonizar la médula ósea (Nagasawa, 2006).

3.1. Ontogenia de linfocitos B

Los linfocitos B, como todas las células sanguíneas, provienen de una célula troncal hematopoyética pluripotencial; sobre la que se induce la expresión de receptores, factores de transcripción y genes específicos, gracias al estrecho contacto del estroma con los linfocitos en desarrollo, comprometiendo la célula hacia el linaje de células B (Rodríguez-Alba, 2008) (Figura 10).

Las células del estroma más comunes son los reticulocitos que pueden encontrarse rodeando a los sinusoides como células reticulares adventicias y ramificarse en el espacio hematopoyético, donde producen citocinas que favorecen el desarrollo linfocitario (Nagasawa, 2006) (Figura 10).

Entre las citocinas producidas por el estroma, se encuentra CXCL12, esencial en la generación de células pre-pro-B y la sucesión a pro-B, además de ser necesaria

para la señalización de las células plasmáticas y su retorno a la médula ósea, IL-7 actúa durante la etapa pro-B y pre-B, otras citocinas necesarias para el desarrollo son FLT3L, SCF y RANKL con actividades que siguen sin estar claras (Nagasawa, 2006). Sin embargo, pueden estar actuando como inductores de factores de transcripción necesarios durante el desarrollo de las células B, como E2A, EBF y PAX-5 (Nagasawa, 2006).

Se ha demostrado en médula ósea, la existencia de una población celular (CXCL12^{hi} PECAM⁻ VCAM1⁺) fenotípicamente diferente a los osteoblastos (Nagasawa, 2006).

Por otro lado se han encontrado fibroblastos VCAM1⁺ secretores de IL-7 y por tanto se cree que estas poblaciones celulares participan activamente en el desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea (Nagasawa, 2006).

El progreso sigue las etapas pre-pro-B, pro-B, pre-B y células B inmaduras (Hardy y Hayakawa, 2001; Cambier y cols., 2007).

3.2. Pre-pro-B

Aunque las células de la fracción pre-pro-B están propuestas como los precursores tempranos del desarrollo de los linfocitos B, varios estudios han mostrado que la fracción celular pre-pro-B es heterogénea y puede dar pie u origen a linajes hematopoyéticos diferentes a las de células B como células *natural killer* (NK), células dendríticas (DC) y células dendríticas plasmacitoides (pDC) (Rolink y cols., 1996; Martin y cols., 2003; Diao y cols., 2004; Pelayo y cols., 2005; Nagasawa, 2006; Kikuchi y cols., 2008).

Además, una subpoblación de linfocitos pre-pro-B que expresa la cadena alfa del pre-TCR (pT α) tiene la bipotencialidad de diferenciarse a célula B o T (Martin y cols., 2003).

La ausencia de PAX-5, un factor nuclear que compromete el linaje de linfocitos B, respalda la teoría de que las células pre-pro-B tienen el potencial de diferenciarse hacia células T, NK y DC (Nutt y cols., 1999; Rolink y cols., 1999).

La subsecuente proliferación a células pro-B se dirige por el estímulo de citocinas, por lo cual la señalización del receptor de interleucina 7 (IL-7R) es esencial (Rickert, 2013) en la transición de pre-pro-B a pre-B, ya que la señalización de la cadena alfa del receptor de IL-7 (IL-7R α) induce la recombinación de los segmentos D y J de la cadena pesada (Nagasawa, 2006).

3.3. Pro-B

La fase pro-B está regulada por al menos 10 factores de transcripción, como E2A, EBF y PAX-5, este último se caracteriza por su capacidad para unirse a secuencias promotoras en los *loci* de Ig, la expresión de CD19 y de la cadena alfa del heterodímero asociado a IgM y también por su participación en el compromiso y diferenciación de linfocitos B (LeBien y Tedder, 2008). La presencia de IL-7 regula positivamente a EBF (Nagasawa, 2006) que en conjunto con EBF inducen la transcripción de genes que incluyen a los genes λ -5, VpreB, y los componentes RAG-1 y RAG-2 de la V(D)J recombinasa (Rodríguez-Alba, 2008).

Así, estos factores permiten el inicio de la recombinación de los segmentos en el locus de la cadena pesada D_HJ_H y posteriormente gracias a la inducción de IL-7, la unión al segmento V_H (Carsetti, 2000) y la expresión de dicha cadena que se pareará con la cadena no polimórfica ligera sustituta (Rickert, 2013), compuesta por VpreB y λ -5, proteínas homólogas a las porciones V_L y C_L del polipéptido LC respectivamente, para formar el receptor de célula pre-BCR (Figura 11), marcando la transición de pro-B a pre-B (Cambier y cols., 2007; Surova y Jumaa, 2014) (Figura 10).

3.4. Pre-B y célula B inmadura

La transición de la etapa pre-B al linfocito inmaduro es el punto final del desarrollo dentro de la médula ósea (Rodríguez-Alba, 2008).

Este paso está asociado con una proliferación baja, disminución de la expresión de los genes que codifican para la cadena sustituta, el aumento de los genes de rearreglo de inmunoglobulina (Rodríguez-Alba, 2008) en el locus de la cadena ligera

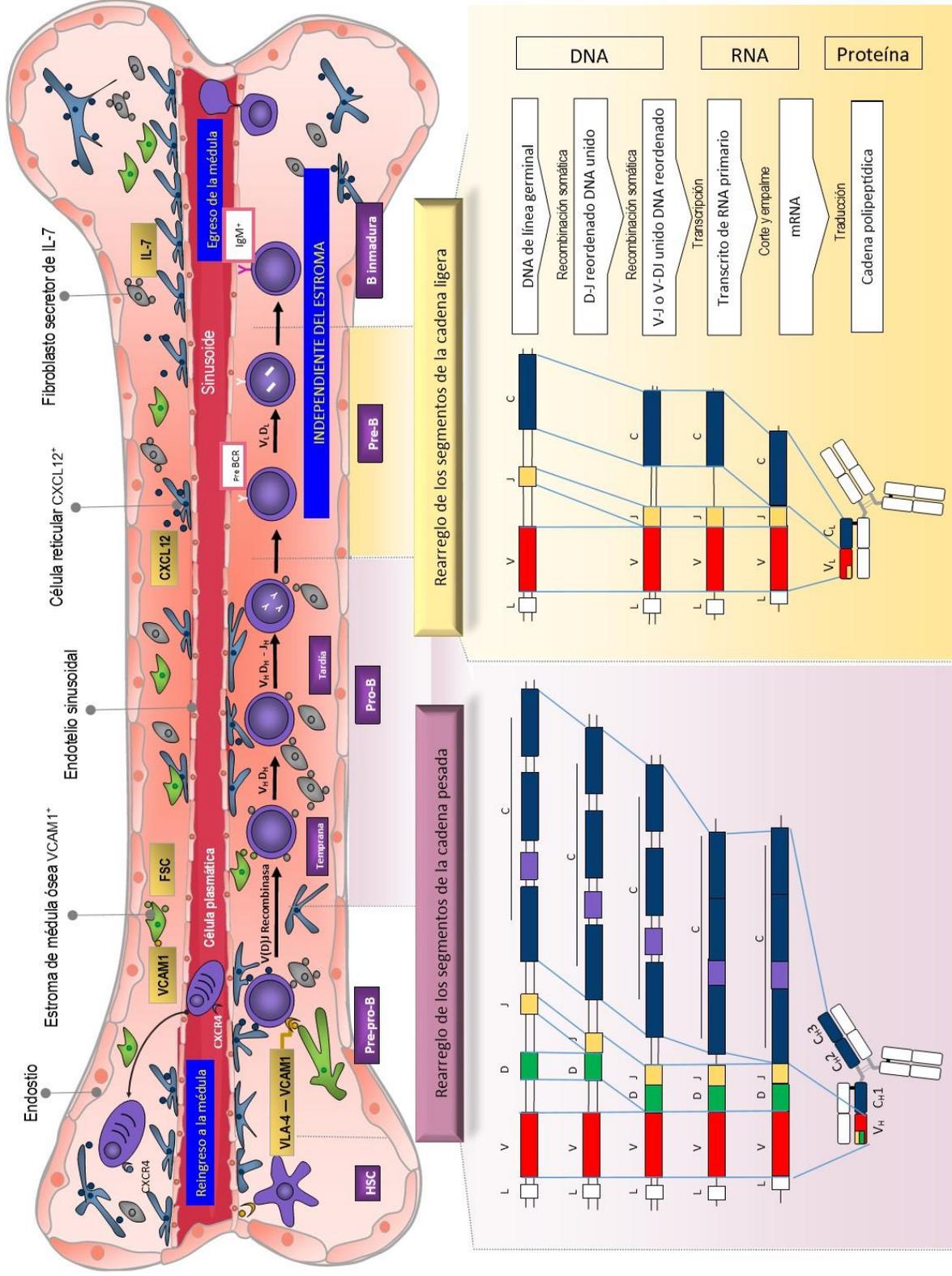


Figura 10. Desarrollo de los linfocitos B en médula ósea y rearreglo de los genes de inmunoglobulina (Fuente original).

que dan lugar al receptor de célula B (BCR). En este proceso uno de los segmentos de la región de Diversidad (D) se une a uno de los segmentos Variables (V) (Melchers, 2005).

Esta cadena reemplazará a la cadena ligera sustituta, dando como resultado la generación y expresión en superficie del BCR en la superficie (Figura 10), un heterotetrámero formado por dos cadenas pesadas idénticas (HCs) y dos cadenas ligeras idénticas junto con un heterodímero de cadenas Ig α /Ig β (CD79a y CD79b), esencial para la transducción de la señal, este complejo proteico se localiza en la membrana plasmática (Surova y Jumaa, 2014) (Figura 11).

La adquisición de un BCR funcional distingue las células pre-B de los linfocitos B inmaduros (Rickert, 2013).

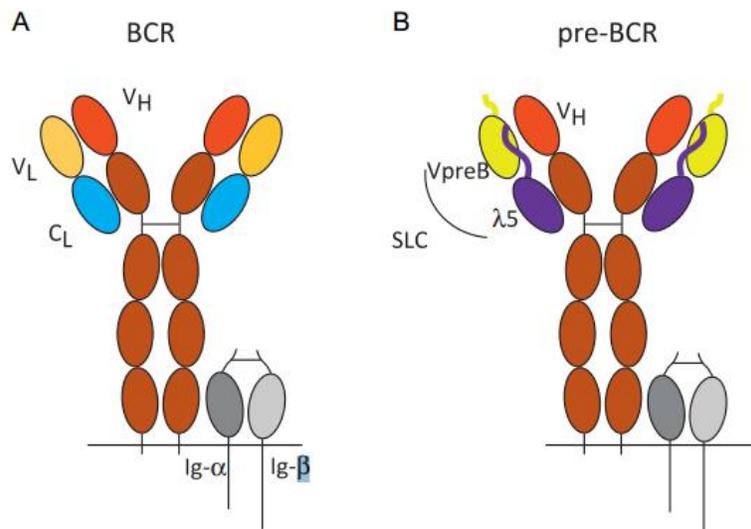


Figura 11. Representación del receptor de célula B. A) En café se muestran los dominios constantes, en rojo y amarillo se esquematiza la región variable de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) respectivamente, mientras que en azul se señala el dominio constante de la cadena ligera (CL). En gris se muestra el heterodímero formado por Ig α /Ig β (CD79a y CD79b). B) En morado se esquematiza λ -5 y VpreB, que forman la cadena ligera sustituta (SLC), en café se muestran los dominios constantes, mientras que en gris, se señala el heterodímero formado por Ig α /Ig β (CD79a y CD79b) (Surova y Jumaa, 2014).

3.5. Maduración de linfocitos B

Las células B inmaduras egresan de la médula ósea para completar su maduración principalmente en el bazo (Rodríguez-Alba, 2008) y en órganos linfoides secundarios dentro de los compartimientos perifoliculares de memoria y centros germinales en los ganglios linfáticos (Edwards y Cambridge, 2006), placas de Peyer y otros tejidos linfoides mucosales (Cyster, 2010).

En estos órganos, pueden diferenciarse en varias subpoblaciones (células B foliculares, células B de la zona marginal, y células B del centro germinal), esta diferenciación está determinada por las influencias del microambiente (Rickert, 2013).

Los centros germinales constituyen un compartimiento de alta proliferación que da origen a células B de memoria que expresan un BCR de alta afinidad y células plasmáticas. Por otro lado, los linfocitos B de la zona marginal están localizados en la interface entre la circulación y el tejido linfoide y responden de manera rápida a los ligandos de TLRs, así como a antígenos por medio de la diferenciación a células plasmáticas con o sin el estímulo de linfocitos T (Rickert, 2013).

La maduración de los linfocitos B da lugar a la expresión de CXCR5 en la membrana lo que le permite migrar a los folículos dentro de los ganglios linfoides, ya que actúa como el receptor de CXCL13, una quimiocina producida por células foliculares del estroma, entre las que se encuentran las células reticulares marginales en la región subcapsular del folículo (MRCs) y células dendríticas foliculares (fDC) en el centro (Cyster, 2010).

Los linfocitos B pueden pasar un día en estos sitios y regresar a la circulación sanguínea para ingresar a otros tejidos, el movimiento de las células B puede ser dependiente o independiente del estroma, de tal forma que el relativamente libre tránsito del linfocito B en el folículo le permite la interacción con fDC, MRCs, y de igual forma con células localizadas alrededor del perímetro del folículo, incluyendo macrófagos asociados al seno folicular y células T asociadas con células dendríticas. Esta migración facilita el encuentro con su antígeno cognato por medio

del transporte en masa de antígenos opsonizados al perímetro folicular (Cyster, 2010).

3.6. Marcadores de linfocitos B

Durante el desarrollo de los linfocitos B hay expresión de moléculas de membrana que se han utilizado para identificar los estadios de maduración de las células e incluso para diferenciarlas de otras poblaciones celulares.

Por ejemplo, CD19 es un correceptor de células B presente en las primeras fases de maduración celular por lo que se usa como marcador para linfocitos B de igual forma que CD20 cuya función es la formación de canales de calcio y por ende la regulación de la activación celular (LeBien y Tedder, 2008) (Figura 12).

Otro marcador es CD21, que es el receptor para el componente del complemento C3d (Berger, 2012). En contraste, CD38 tiene una expresión discontinua durante el desarrollo de los linfocitos B (Dürig y cols., 2002) (Figura 12).

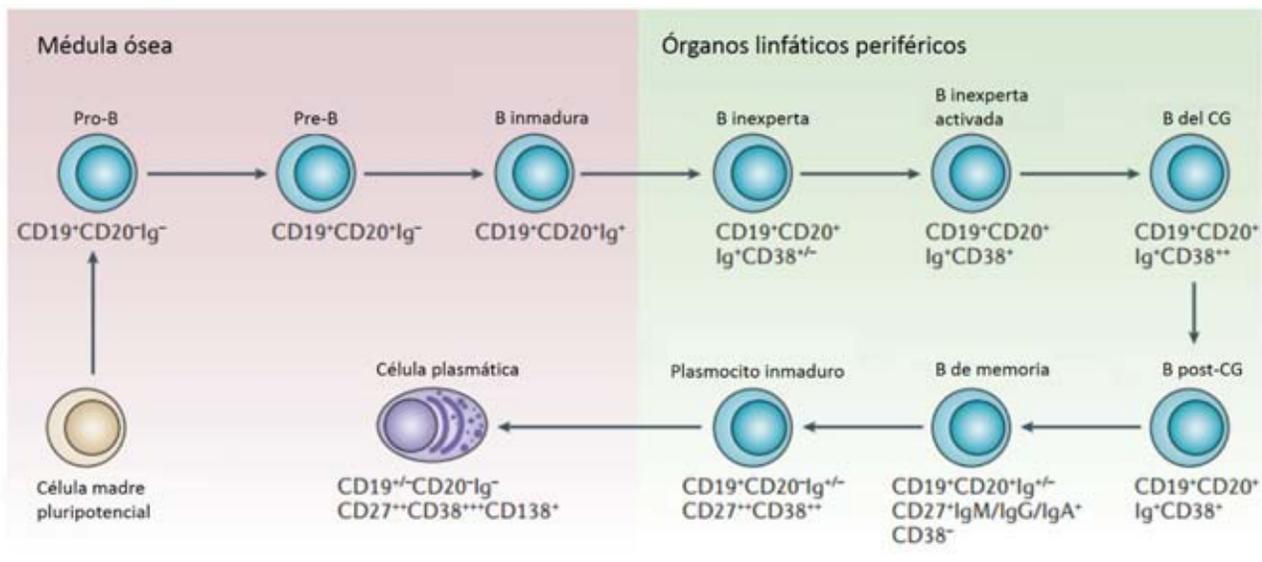


Figura 12. Marcadores celulares durante el desarrollo de los linfocitos B (Modificado de Edwards y Cambridge, 2006).

4. PARTICIPACIÓN DE LOS LINFOCITOS B EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE

Los linfocitos B desempeñan un papel importante durante la infección por DENV, no solo como responsables de la producción de anticuerpos neutralizantes y sub-neutralizantes potenciadores de la infección (Halstead, 2003), sino como blanco de la infección natural (Boonpucknavig y cols., 1976; King y cols., 1999; Baclig y cols., 2010; Srikiatkachorn y cols., 2012) y como productores de citocinas proinflamatorias responsables de algunas manifestaciones en los casos graves (Lin y cols., 2002).

4.1. Linfocitos B como blanco principal de la infección

Boonpucknavig y cols. (1976) realizaron ensayos de inmunofluorescencia en suspensiones celulares de linfocitos de sangre periférica de pacientes infectados naturalmente, encontrando que solo los linfocitos B presentaban al virus del dengue en la superficie celular, sugiriendo que el antígeno viral podría ser adsorbido mediante los siguientes mecanismos:

a) *Receptor de antígeno* (inmunoglobulina de superficie o BCR), debido a que los pacientes incluidos en el estudio presentaban complicaciones graves de dengue, se puede creer que la expansión clonal de linfocitos B con receptores específicos había tenido lugar posteriormente a la recolección de las muestras haciendo evidente que la memoria inmunológica juega un papel importante en la producción viral. En este estudio se menciona que los pacientes presentaban altos niveles de linfocitos B en circulación sanguínea, especialmente aquellos con SCD (Boonpucknavig y cols., 1976).

b) *Receptor del fragmento Fc* de anticuerpos que se unen al virus mediante la formación de complejos (virus-anticuerpo), facilitando la unión a la superficie, la entrada a la célula y la replicación viral (Boonpucknavig y cols., 1976).

c) *Receptor del complemento* en los linfocitos B, el reconocimiento de la célula a través de la formación y unión de complejos antígeno-anticuerpo-complemento (Boonpucknavig y cols., 1976).

Una cuarta opción sugerida fue un receptor desconocido en linfocitos B (Boonpucknavig y cols., 1976), lo cual podría ser posible, ya que se han descrito tres proteínas de membrana de 34, 45 y 72 kDa en la línea celular Raji, que se unen de manera específica a DENV-2 y DENV-3 (Bielefeldt-Ohmann y cols., 2001).

Desde 1976 no hay estudios que apoyen o refuten esta teoría, hasta que King y colaboradores (1999) realizaron un estudio con pacientes tailandeses, con el fin de identificar la población celular blanco de la infección.

Marcaron PBMC con anticuerpos anti CD3 (receptor de linfocitos T), CD14 (receptor de lipopolisacárido en monocitos), CD16 (receptor FcγRIIIa específico de células NK) y CD20 (fosfoproteína de linfocitos B) acoplados a ficoeritrina (PE) y las separaron mediante selección positiva y negativa.

Posteriormente se realizó la cuantificación viral de las células y del suero de los pacientes mediante la inoculación intratorácica en mosquitos *Toxorhynchites splendens*. Para ello, las células resuspendidas en medio de cultivo (RPMI 1640 + 10% SFB) se lisaron y se inyectó el sobrenadante en el tórax de los mosquitos, mientras tanto, los sueros se diluyeron a razón de 1:5 y se procedió de la manera ya descrita (King y cols., 1999).

El método utilizado para la cuantificación viral incluye aquellos ubicados en el espacio intracelular, como los unidos al BCR, al FcR u otro tipo de receptor.

Para poder identificar la localización del virus en los linfocitos B, las muestras se trataron con proteasa E para eliminar el virus de la superficie celular, y nuevamente se realizó la titulación del virus de acuerdo a la metodología ya mencionada. Los resultados mostraron que los virus asociados a linfocitos B se encuentran distribuidos de manera equitativa en la superficie y dentro de la célula (King y cols., 1999).

Aproximadamente, el 95% de los virus aislados se recuperaron de la población de células CD20⁺, sin importar si se trataba de una infección primaria o secundaria, el tropismo del virus hacia los linfocitos B fue independiente del serotipo infectante, así como de la cantidad de virus en suero. En contraste, la cantidad de virus aislados a partir de linfocitos T, células NK y monocitos, fue mucho menor. Indicando que los linfocitos B (de sangre periférica) son el principal blanco de la infección natural (King y cols., 1999).

Por el contrario, en un estudio realizado por Durbin y colaboradores (2008), en PBMC de pacientes pediátricos con FD y FHD, se identificó a las células CD86⁺CD32⁺CD14⁺CD11c⁺ (monocitos activados) como blanco de la infección, además de mostrar que la mayoría de las células positivas para prM eran células CD86⁺ (82%) y CD32⁺ (78%) (Durbin y cols., 2008).

A pesar de que los resultados de Durbin sugieren un papel de los monocitos activados en la FHD, los autores refieren que su estudio tenía varias limitaciones relacionadas a la poca cantidad de sangre que podían obtener de los pacientes pediátricos, y por esta razón no pudieron analizar otras poblaciones celulares (Durbin y cols., 2008).

De igual forma, mencionan que la infección y activación de linfocitos B con DENV no se pueden excluir debido a que estas células expresan tanto CD86 como CD32, además reportaron que aproximadamente un 20% de las células en las que se detectaba la proteína no estructural 3 (NS3) eran CD14⁻, sugiriendo que la replicación ocurre en otras poblaciones celulares diferentes a los monocitos, como células NK, células dendríticas o linfocitos B (Durbin y cols., 2008).

Otros estudios reportan resultados similares, Baclig y colaboradores (2010) realizaron un doble marcaje de PBMC de pacientes filipinos con dengue utilizando anticuerpos anti CD3, CD14, CD16 o CD19 acoplados a PE y anticuerpo anti flavivirus (anti-flavivirus 6B6C-1 Alexa Fluor® 488), mediante un análisis por citometría de flujo, encontraron que del 20 al 81% de las células infectadas con DENV eran CD19⁺ (linfocitos B) estos resultados no variaban entre serotipos (el

aislamiento viral determinó que los serotipos infectantes eran 1 y 3) o gravedad de la enfermedad, de igual forma, la historia de exposición del paciente al virus no interfería en los resultados (Baclig y cols., 2010) (Figura 13).

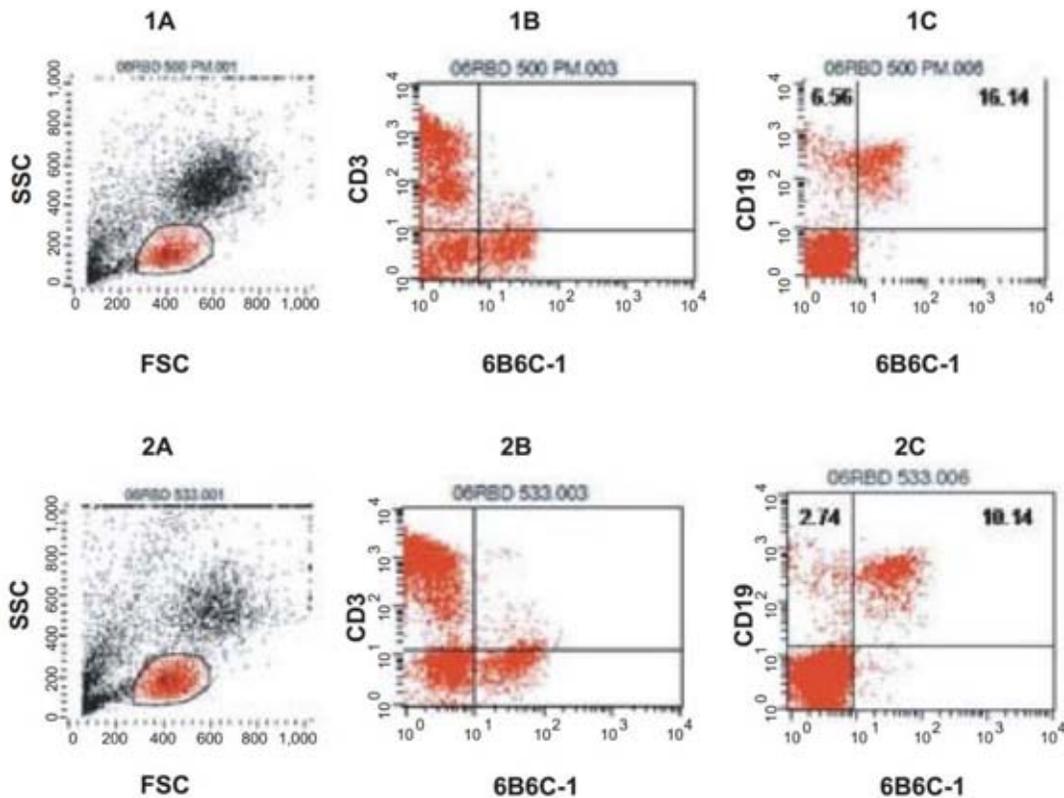


Figura 13. Citometría de flujo de PBMC infectadas con DENV. (1A, 2A) Gráfico de puntos de poblaciones leucocitarias de diferentes pacientes (1 y 2). (1B, 2B) PBMC teñidas con anticuerpo anti CD3 PE y anti-flavivirus 6B6C-1 Alexa Fluor® 488. (1C,2C) Análisis citométrico de células B. El cuadrante inferior izquierdo en 1C y en 2C muestra eventos negativos para CD19 PE y anti-flavivirus 6B6C-1 Alexa Fluor® 488. El cuadrante superior izquierdo en 1C y 2C contiene los eventos positivos para CD19 PE y negativos para anti-flavivirus 6B6C-1 Alexa Fluor® 488. El cuadrante inferior derecho en 1C y 2C contiene los eventos positivos para anti-flavivirus 6B6C-1 Alexa Fluor® 488. El cuadrante superior derecho en 1C y 2C contiene los eventos que fueron positivos tanto para CD19 PE y anti-flavivirus 6B6C-1 Alexa Fluor® 488 (Baclig y cols., 2010).

Un experimento más detallado concuerda con los resultados anteriores, Srikiatkachorn y su equipo de trabajo (2012), fraccionaron PBMC por medio de perlas paramagnéticas en poblaciones CD20⁺ (linfocitos B), CD2⁺ (linfocitos T) y

CD14⁺ (monocitos), dichas células fueron usadas para realizar ensayos de qRT-PCR para identificar RNA viral (de polaridad positiva).

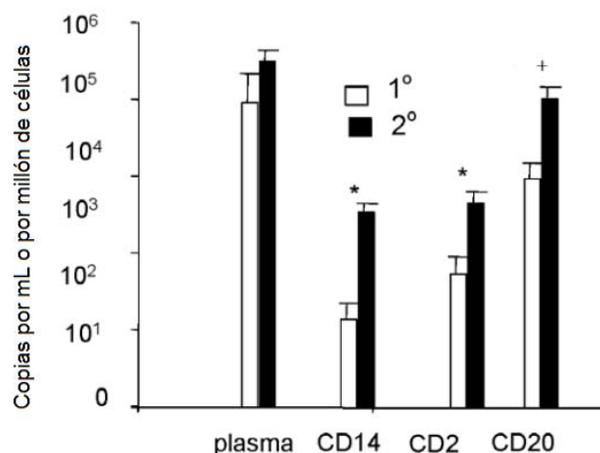


Figura 14. Comparativo de los niveles de RNA viral dos días antes de la disminución de la fiebre en plasma y en subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica en infecciones primarias (1°) y secundarias (2°). Análisis estadístico realizado con la prueba de Chi cuadrada, (*) diferencia estadísticamente significativa en los niveles de RNA entre primoinfección y reinfección ($p < 0.05$), (+) diferencia entre los niveles de RNA en células CD20⁺ comparadas con células CD14⁺ y CD2⁺ ($p < 0.05$) (Modificado de Srikiatkachorn y cols., 2012).

El estudio detectó RNA viral en todas las poblaciones celulares siendo las células CD20⁺ aquellas que mostraron albergar mayor número de copias de RNA viral (+) en comparación con las células CD2⁺ y CD14⁺. La distribución del RNA viral entre las poblaciones celulares era similar en los casos de FD y FHD (figura 16).

Los niveles plasmáticos del RNA de DENV disminuyeron significativamente antes del cese de la fiebre, dicho efecto no se observó en la cantidad de RNA viral en las poblaciones celulares (figura 15).

La cantidad de copias de RNA viral fue mayor en las infecciones secundarias que en las primarias (figura 14). Sin embargo, al buscar el intermediario de replicación (IR) mediante qRT-PCR se encontraron pocas copias de RNA (-) en PBMC, lo cual sugiere que no exista una replicación activa en PBMC y que las células sean

utilizadas por el virus como medio de transporte a través de la vasculatura sanguínea y linfoide por el organismo (Srikiatkachorn y cols., 2012) (Figura 19).

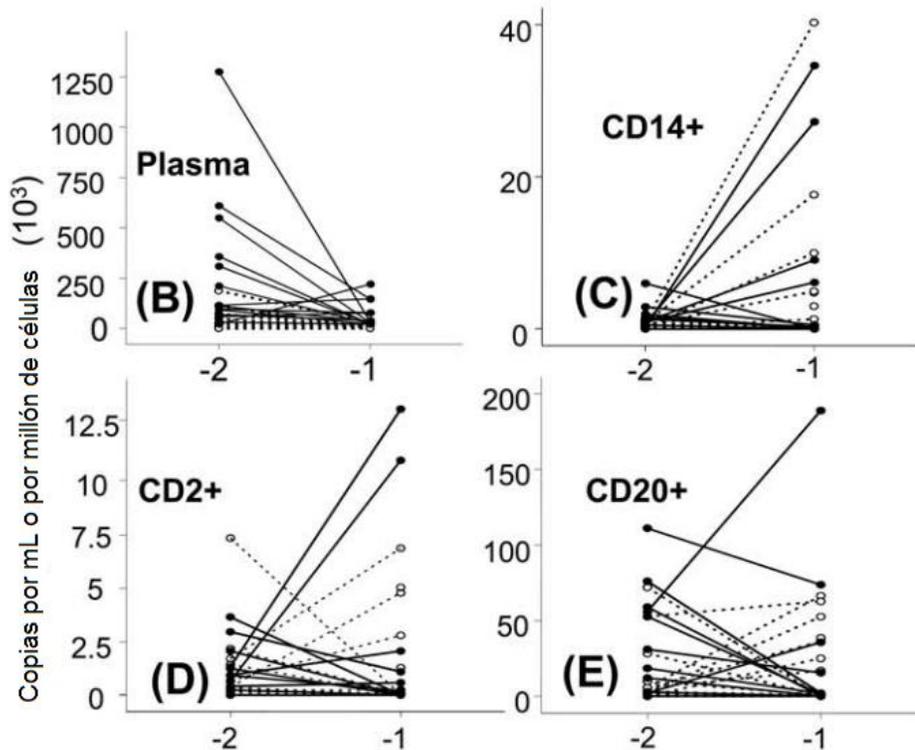


Figura 15. Niveles de RNA viral en plasma y células mononucleares de sangre periférica. Copias por mililitro de Plasma (B), o por millón de células CD14⁺ (C), CD2⁺ (D) y CD20⁺ (E); dos (-2) y un día (-1) antes del cese de la fiebre. Cada línea representa un caso; las líneas punteadas simbolizan los casos de fiebre por dengue, mientras que las líneas continuas representan los casos de fiebre hemorrágica por dengue (Modificado de Srikiatkachorn y cols., 2012).

Lo anterior es consistente con los experimentos de Jessie y colaboradores (2004), quienes utilizando tejidos de autopsias y biopsias detectaron antígenos virales en hígado, riñón, corazón, pulmón y linfocitos mediante inmunohistoquímica (IHC) (Jessie y cols., 2004).

En las mismas muestras, se realizó hibridación *in situ* (ISH) y fueron capaces de detectar RNA viral en el citoplasma de macrófagos y en células B reactivas en los centros germinales del bazo, incluyendo centroblastos e inmunoblastos de los

folículos linfoides, en los cuales, además, se detectaron antígenos virales. Estos resultados posicionan a los linfocitos B como potencial blanco de la infección (Jessie y cols., 2004).

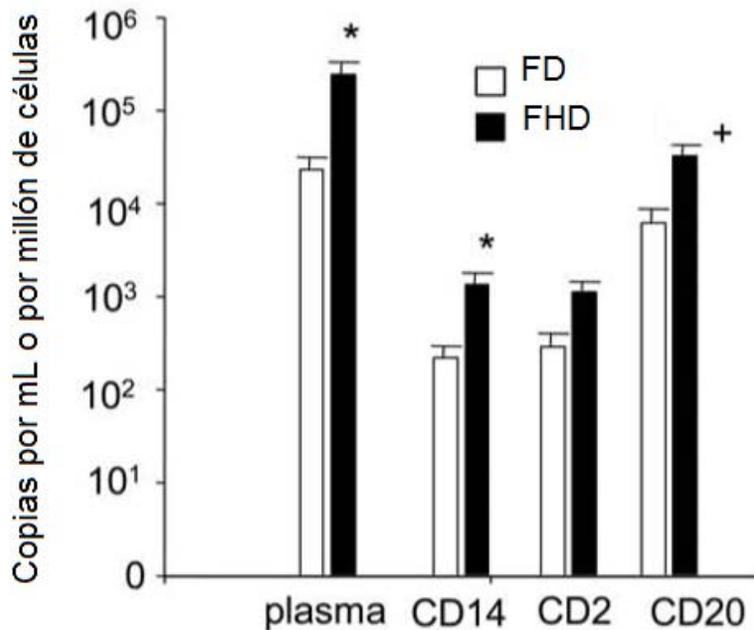


Figura 16. Niveles de RNA viral en plasma y subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica en fiebre por dengue (FD) y fiebre hemorrágica por dengue (FHD). Análisis estadístico realizado con la prueba de Chi cuadrada, (*) diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de RNA en fiebre por dengue (FD) y fiebre hemorrágica por dengue (FHD) ($p < 0.05$), (+) diferencia entre los niveles de RNA en células CD20⁺ comparadas con células CD14⁺ y CD2⁺ ($p < 0.05$) (Modificado de Srikiatkhachorn y cols., 2012).

Se debe tener presente que la sangre es un tejido complejo y las células que lo conforman tienen sus propios patrones de circulación vascular. Por ejemplo, los monocitos se producen en la médula ósea y entran a circulación sanguínea donde residen por un tiempo hasta migrar a los tejidos, donde maduran como macrófagos o células dendríticas (Shi y Pamer, 2011) y no regresan al torrente sanguíneo. Mientras que los linfocitos B tienen un patrón de circulación más complejo (Nagasawa, 2006).

Los linfocitos inmaduros se producen en la médula ósea, posteriormente residen en tejidos linfoides secundarios donde pueden circular entre la linfa y la sangre. De esta forma, los linfocitos representan células en constante circulación entre los tejidos, mientras que los monocitos solo son muestra de células que migran de la médula ósea a la circulación sanguínea (King y cols., 1999).

4.2. Participación de los linfocitos B en la patogenia de la enfermedad

Cabe mencionar que los pacientes con infección viral por DENV muestran defectos inmunes celulares y generalmente tienen una cantidad elevada de linfocitos B en sangre periférica. Se cree que los linfocitos B (CD 19⁺) juegan un papel significativo en la eliminación de complejos virus-anticuerpo y esa puede ser la razón del incremento de dicha población (Boonpucknavig y cols., 1976; Jampangern y cols., 2007).

No obstante, la participación de los linfocitos B podría estar relacionada con la patogenia de la enfermedad. Lin y colaboradores (2002) demostraron que DENV (DENV-1 y DENV-3) induce la secreción de IL-6 y TNF- α en cultivos primarios de linfocitos B; además, al infectar las células con complejos virus-anticuerpo heterólogo (anticuerpo específico para otro serotipo viral que el infectante) se incrementaba la infección y la secreción de citocinas en las células, de tal forma que los niveles de virus producido y citocinas excretadas eran similares a los niveles detectados en modelos de infección con monocitos (Lin y cols., 2002).

A pesar de ser un modelo *in vitro*, estas evidencias sugieren que los linfocitos B pueden ser un componente importante en la patogénesis del dengue.

Por otro lado, estudios realizados con una cepa mexicana del virus (CAM7786, aislado viral del serotipo 2), han demostrado la replicación viral activa en cultivos primarios de PBMC, linfocitos B y la línea celular Raji, mediante la detección de sNS1 por ELISA y la identificación del intermediario de replicación por qRT-PCR (Fonseca-Coronado, 2005; Vargas-Castillo, 2011).

Contrario a otros estudios que demuestran una nula replicación en cultivos primarios de células B y PBMC (Kou y cols., 2008), la razón por la que estos resultados son contradictorios, a pesar de ser modelos similares, podría residir, entre otros aspectos, en el virus utilizado, ya que se ha demostrado que la capacidad de infección *in vitro* es inherente a la cepa viral empleada (Diamond y cols., 2000).

La infección con CAM7786 en cultivos primarios de linfocitos B induce la producción y excreción de IL-6 (Fonseca-Coronado, 2005), citocina importante en la patogenia de la enfermedad (Rachman y Rinaldi, 2006).

También se observó la activación de caspasa-3 (enzima medular en la inducción de apoptosis ya que todas las vías dependientes de caspasas convergen en ella y a su vez activa a otras caspasas para que en conjunto se logre el correcto desmantelamiento de la célula) en la línea Raji y en linfocitos B de donadores sanos en estas células se observó el fenotipo apoptótico (descrito como disminución del tamaño celular, condensación del DNA y formación de vacuolas intracelulares) al cabo de 6 a 7 días de cultivo (Fonseca-Coronado, 2005).

Una repercusión muy importante de la apoptosis de células B es la formación de cuerpos apoptóticos que pueden llevar en su interior virus infectivo y constituirse como un mecanismo adicional de expansión viral (Fonseca-Coronado, 2005; Torrentes-Carvahlo, 2009) (Figura 17).

Esto ocurriría como resultado de la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos a cargo de los monocitos/macrófagos que a su vez son blanco de la infección. Este fenómeno se conoce bien para las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (Kornbluth, 1994), influenza (Albert, Sauter y Bhardwaj, 1998; Fujimoto y cols., 2000), y *Salmonella* (van der Velden y cols., 2000). Donde la ingestión de cuerpos apoptóticos por macrófagos y células dendríticas da lugar a su activación y a la expansión de la infección.

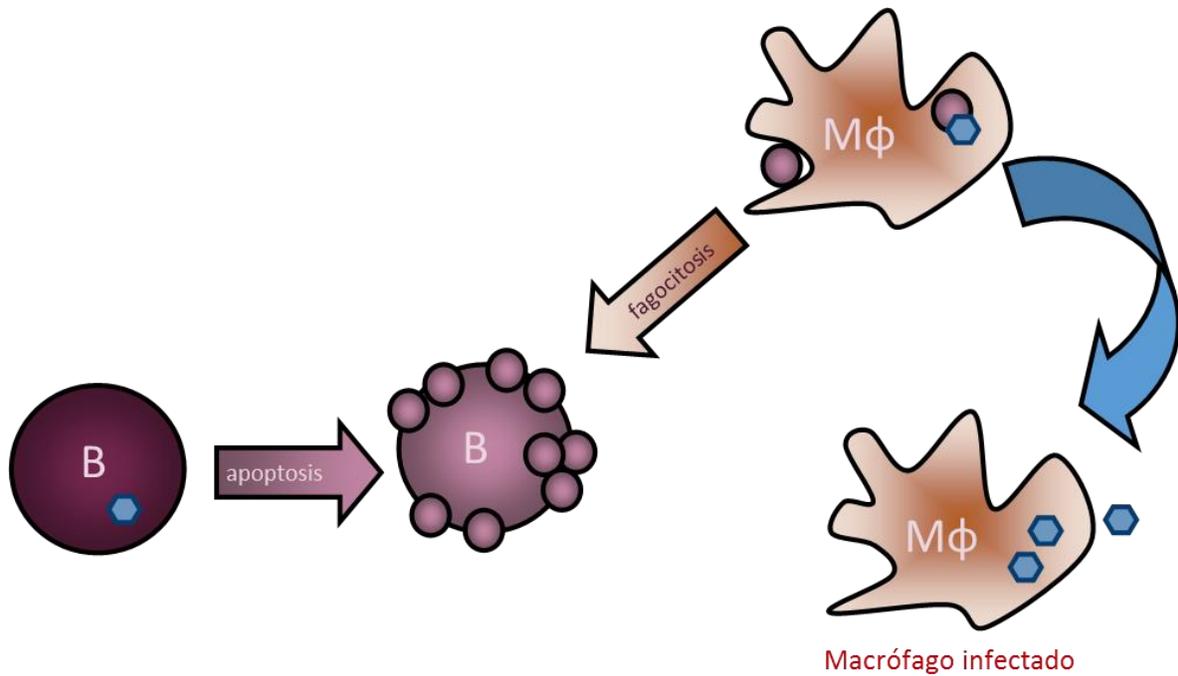


Figura 17. Mecanismo de expansión viral mediado por la fagocitosis de cuerpos apoptóticos con partículas infectivas (Fuente original).

Además se demostró que el inicio de la apoptosis no es inmediato al establecimiento de la infección y ocurre durante la replicación viral, es de esta forma que el DENV inicia procesos replicativos acompañados de un retraso de la apoptosis y solamente cuando se ha alcanzado un cierto nivel de producción de nuevos virus es cuando inician los mecanismos proapoptóticos (Fonseca-Coronado, 2005). El retraso de la apoptosis también se ha observado en células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) infectadas con DENV (Ho y cols., 2001).

5. POSIBLE MECANISMO DE INFECCIÓN

Como ya se mencionó, la picadura del mosquito vector inicia la infección al inyectar viriones en la piel. En la epidermis, las células de Langerhans son las representantes mayoritarias del sistema inmune (Johnston, Halliday y King, 2000) y son potencialmente susceptibles a la infección (Wu y cols., 2000).

De igual forma, las células dendríticas inmaduras (immDC) que residen en la dermis son susceptibles a la infección, en contraste, las células maduras parecen no infectarse (Limon-Flores y cols., 2005).

Lo anterior indica una posible participación de DC-SIGN; ya que contrario a la forma madura, hay una elevada expresión de CD209 en las células dendríticas inmaduras (Tassaneeritthep y cols., 2003) además, esta subpoblación expresa CD206 (Engering y cols., 2002), otra molécula descrita como receptor de DENV (Hidari y Suzuki, 2011).

El reconocimiento virión-célula de Langerhans o célula dendrítica, genera la internalización y procesamiento del antígeno y la posterior migración a los tejidos linfoides que drenan la piel (Cumberbatch y cols., 2000), de la misma manera que ocurre con otras infecciones arbovirales (Johnston, Halliday y King, 2000).

Además, los virus al ser antígenos pequeños, pueden pasar al trasudado plasmático e ingresar a la linfa a través de las uniones del endotelio de los capilares linfáticos, que a su vez se unirán a vasos colectores que posteriormente se convierten en los vasos linfáticos aferentes (Cyster, 2010) a través de los cuales ingresan las APC (von Andrian y Mempel, 2003), y por ende, las células de Langerhans y DC infectadas por DENV.

Respecto a los complejos antígeno-anticuerpo, estos son muy grandes como para ingresar libremente a la vasculatura linfática, por lo que requieren ser acarreados por DC u otras células mieloides (Cyster, 2010).

La confluencia de estas células y de los antígenos en los órganos linfoides secundarios, donde pueden interactuar con otras células, hace pensar que, es precisamente en estos sitios donde comienza la expansión viral (Diamond, 2003).

5.1. Arquitectura del ganglio linfático y migración de células B

Estos órganos son estructuras bien organizadas, compuestas de zonas de linfocitos B y T (Park y Choi, 2005), los linfocitos T se ubican en la paracorteza, mientras que en el área más superficial (corteza) están situadas las células B (von Andrian y Mempel, 2003) que se encuentran formando folículos primarios de linfocitos inexpertos, o folículos secundarios de células activadas, que junto con las células dendríticas foliculares (fDC) forman el centro germinal (CG) (Park y Choi, 2005) (Figura 18).

Las fDC son células del estroma y tienen, entre otras características, la capacidad para retener antígenos durante periodos largos de tiempo (Park y Choi, 2005). En contraste con las DC que presentan antígeno a células T, las fDC no internalizan, procesan ni presentan antígeno en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) (van Nierop y de Groot, 2002), pero presentan complejos antígeno-anticuerpo a través de la unión con sus receptores Fc (CD32 y CD23) (Park y Choi, 2005) y receptores de complemento como CD21 (CR2) y CD35 (CR1) (van Nierop y de Groot, 2002).

Una particularidad importante de la estructura de estos órganos, es la existencia de sistemas linfáticos y vasculares especializados, como las vénulas de endotelio alto (HEV) en la paracorteza y, los vasos y senos linfáticos en la paracorteza y médula (Girard, Moussion y Förster, 2012) (Figura 18).

Normalmente, los linfocitos inexpertos ingresan a los órganos linfoides secundarios a través de las vénulas de endotelio alto (HEV) y migran a su zona específica (Girard, Moussion y Förster, 2012) (Figura 18), de esta forma, los linfocitos pueden explorar el órgano en busca de su antígeno específico, en caso de no encontrarlo, regresan al torrente sanguíneo (en unas pocas horas o días) a través de los vasos linfáticos eferentes hacia el conducto torácico donde entran a circulación por la

unión con la vena subclavia (von Andrian y Mempel, 2003), los linfocitos B pasan alrededor de 24 horas explorando el ganglio, mientras que los T pasan de 8 a 12 horas (Girard, Moussion y Förster, 2012).

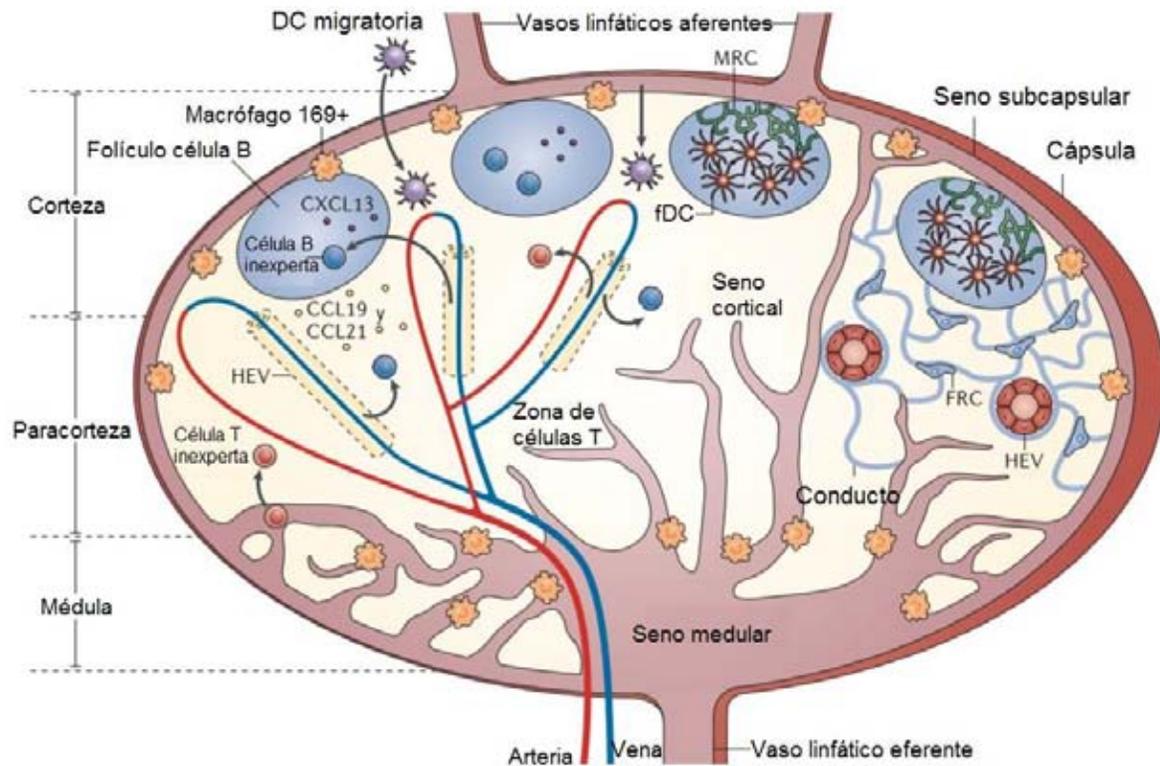


Figura 18. Arquitectura del ganglio linfático. fDC (células dendríticas foliculares), MRC (células reticulares marginales), FRC (células fibroblásticas reticulares), CCL21 (ligando de quimiocina 21, atrayente de células B y T), CCL19 (ligando de quimiocina 19, atrayente de células dendríticas y linfocitos T), CCL13 (ligando de quimiocina 13, atrayente de linfocitos B), HEV (Vénulas de endotelio alto) (Modificado de Girard, Moussion y Förster, 2012).

La migración y posicionamiento intranodal de los linfocitos T, B y DC están regulados por ligandos de quimiocina CCL21, CCL19 y CXCL13 que son producidos por las células fibroblásticas reticulares (FRCs) en las áreas de células T y por las fDC en los folículos (Girard, Moussion y Förster, 2012) (Figura 18).

Los linfocitos B entran a través del HEV y migran a los folículos mediante un gradiente de CXCL13 (quimiocina producida por las fDC y MRCs), que es reconocido por CXCR5 (en las células B) y genera señales que promueven la migración de los linfocitos B (Yuseff y cols., 2013).

Después de migrar a través de la red de las fDC, la célula viaja por la zona proximal de linfocitos T usando el receptor CXCR7 y su ligando CCL21 (secretado por FCR y HEVs) y de esta manera salir por el seno cortical (Cyster, 2010) (Figura 18) e vez ingresar a la médula cortical, egresando del órgano a través del vaso linfático eferente, permitiendo la migración a otro tejido linfoide.

5.2. Infección de linfocitos B por DENV en órganos linfoides secundarios y su participación como diseminadores del virus

Una vez que las células inicialmente infectadas (células de Langerhans y DC) llegan al ganglio, actuarán como APC a células T, iniciando la respuesta inmune (von Andrian y Mempel, 2003), en dado caso que el virus sea capaz de replicarse, la liberación de viriones expone a las células residentes del ganglio como los macrófagos, fDC y células B, a la infección por DENV (Diamond, 2003).

El hallazgo de antígenos virales en células mononucleares de sangre periférica, donde la población con mayor número de copias de RNA viral es la fracción de células B (Boonpucknavig y cols., 1976; King y cols., 1999; Baclig y cols., 2010; Srikiatkachorn y cols., 2012), sugiere una participación mayor de esta población celular durante la infección.

Sin embargo, las PBMC deben ser vistas como una población centinela que de manera indirecta nos informa de las actividades inmunológicas del organismo, ya que la mayoría de los tejidos humanos son inaccesibles y aquellos que lo son, no necesariamente están drenando el área de nuestro interés (Kaminski, 2012).

No obstante, al buscar el intermediario de replicación en PBMC (de casos de FD y FHD) se encontró un número muy bajo de copias de RNA de polaridad negativa, sin importar el serotipo infectante (Srikiatkachorn y cols., 2012) (Figura 19).

Por otro lado, mediante hibridación *in situ* de bazo y ganglios linfáticos de casos fatales de dengue, se encontró RNA viral en los centroblastos de los centros germinales y en inmunoblastos, indicando la presencia de linfocitos B infectados en los órganos linfoides secundarios (Jessie y cols., 2004).

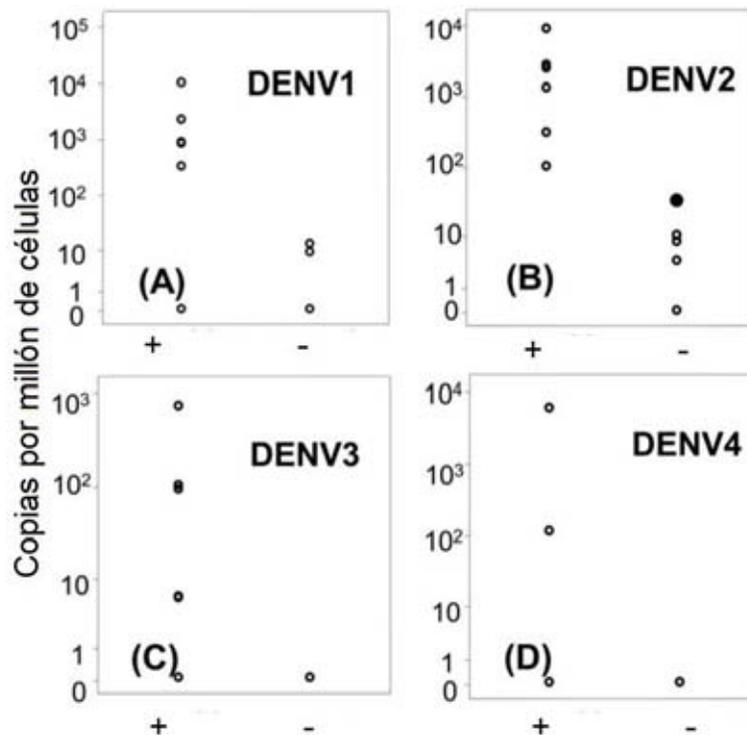


Figura 19. Copias de RNA de polaridad positiva (+) y polaridad negativa (-) de DENV en PBMC sin fraccionar. La PCR cuantitativa para RNA viral se realizó con RNA extraído de PBMC sin fraccionar en el día -2 de la enfermedad (dos días antes de que la fiebre baje) de sujetos infectados con DENV-1 (A), DENV-2 (B), DENV-3 (C) o DENV-4 (D) (Modificado de Srikiatkachorn y cols., 2012).

Si bien las PBMC y los linfocitos B son capaces de replicar al DENV *in vitro* (Lin y cols., 2002; Fonseca-Coronado, 2005; Vargas-Castillo, 2010), se debe considerar que durante el proceso patológico, las células infectadas coexisten con otras células capaces de responder a la infección y que pueden estar modificando el microambiente, impidiendo o favoreciendo la replicación viral en ciertas poblaciones.

Cabe mencionar que la replicación viral depende, entre otros aspectos, del virus infectante (Diamond y cols., 2000), esto se puede observar en la figura 19 y la diferencia del número de copias de polaridad positiva y negativa entre serotipos al día -2 de la infección.

Hasta la fecha, no se ha identificado la célula mononuclear de sangre periférica blanco de la infección en México ni en América, considerando que todos los virus

del dengue son distintos de cierto modo, sería interesante identificar si estas diferencias están jugando en contra o a favor de la infección.

Suponiendo que un linfocito B infectado por DENV ingrese a un órgano linfoide secundario, mediante los mecanismos que se describieron previamente, se cree que la interacción de estos con las fDCs y linfocitos T (Figura 20) podría ser uno de los mecanismos de diseminación viral.

Tomando en cuenta que la infección genera un proceso inflamatorio y que este provoca el remodelamiento del ganglio linfático, que incluye el aumento en el tamaño del órgano y el número de células, así como, la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio alto y la expansión de la red vascular (HEV), es evidente el reclutamiento de células T efectoras, monocitos, células NK, DC y por supuesto, linfocitos T y B inexpertos (Girard, Moussion y Förster, 2012).

El ingreso de linfocitos B inexpertos no infectados, supone la exposición de éstos a viriones infectivos durante un periodo aproximado de 24 horas, tiempo que pasan las células B en cada ganglio antes de que migren a otro órgano linfoide secundario (Girard, Moussion y Förster, 2012), lo que tendría como consecuencia la infección y diseminación viral gracias al tráfico celular de esta población.

La interacción de las fDC con los linfocitos B podría ser un punto importante en la infección por DENV, ya que estas células son capaces de secretar micropartículas llamadas exosomas, las cuales tienen una alta preferencia por unirse a las fDC (Denzer y cols., 2000).

Las micropartículas (MPs) son vehículos de la comunicación celular y usualmente contienen mRNA, miRNA o proteasas y pueden unirse a las membranas plasmáticas y liberar su contenido al citoplasma (Clark y cols., 2012).

Como DENV solo requiere de su genoma para iniciar una infección, este podría ser un mecanismo de infección, si los transcritos virales o el genoma tuvieran la capacidad de ser empaquetados en MPs, podrían distribuirse en el organismo (Clark y cols., 2012).

mediante la liberación de exosomas con partículas virales que son capaces de unirse al receptor DC-SIGN (Wu y KewalRamani, 2006) o entrar a las células a través de la fusión de membranas (Wiley y Gummuluru, 2006).

Los exosomas pueden ser un modo por el cual el virus intracelular llega a la sinapsis, sin embargo esta hipótesis sigue sin estar comprobada (Wu y KewalRamani, 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que los linfocitos B activados, derivados de sangre periférica y de tejidos, expresan DC-SIGN, y que estas células median la infección *trans* del HIV a linfocitos T CD4⁺, también se observó que las células B que expresan CD209 no replicaban a VIH y de esa forma sirven como portadoras para la transferencia y potenciación de la infección por VIH (Rappocciolo y cols., 2006).

Cabe mencionar que las células B de los donadores sanos de este estudio expresaban DC-SIGN de forma constitutiva, y que tras el estímulo con IL-4 y CD40L dicha expresión se triplicaba (a nivel mensajero y a nivel proteico), además el estímulo con estas citocinas indujo a CD23, CD22, CD58, CD80 y CD86, indicando que la activación celular podría estar involucrada en la expresión de DC-SIGN en células B (Rappocciolo y cols., 2006).

Esta evidencia permite suponer que uno de los receptores mejor descritos para DENV (CD209) podría estar involucrado en la infección de los linfocitos B, debe tomarse en consideración que los eventos que se han descrito hasta el momento ocurren al mismo tiempo que la activación de otras células efectoras y productoras de citocinas proinflamatorias.

De esta forma, la activación de linfocitos B, gracias al estímulo de linfocitos T cooperadores, podría tener como consecuencia la expresión de CD209 *in vivo*, explicando de cierta forma la presencia del virus en la célula y apoyando la idea de Boonpucknavig (1976) acerca de la presencia de un receptor desconocido en esta población celular, sin embargo se requieren más estudios al respecto para poder apoyar esta hipótesis.

Asimismo, se sabe que de 5 a 10 días después de la respuesta inmune primaria, los linfocitos B seleccionados migran de los folículos primarios al CG donde proliferan y se diferencian a células B de memoria o células plasmáticas gracias a la hipermutación somática y cambio de isotipo (Park y Choi, 2005).

La presencia de antígenos y RNA viral en centroblastos e inmunoblastos (Jessie y cols., 2004) sugiere que el virus es capaz de infectar estas células en transformación o que la proliferación celular continua a pesar de la infección, lo cual puede ser congruente con el retraso de la apoptosis observado en la infección *in vitro* de células B (Fonseca-Coronado, 2005) indicando algún tipo de mecanismo inducido por el virus que permite la sobrevivencia de estas células.

5.3. Los linfocitos B infectados con DENV pueden actuar como células efectoras de la respuesta inmune

Independientemente del modo de entrada del virus a la célula B, o del momento en que esto sucede, la expresión de citocinas proinflamatorias y otros eventos celulares asociados a la infección (Lin y cols., 2002; Fonseca-Coronado, 2005; Vargas-Castillo, 2011), podrían explicarse a través del reconocimiento del virus por parte de receptores tipo toll (TLRs).

Los TLRs que pueden reconocer a DENV son TLR-3 (dsRNA) y TLR-7, -8 (ssRNA) (González-Fernández, 2014), están situados intracelularmente en las membranas de endosomas y lisosomas; el dominio que reconoce al antígeno está proyectado hacia el interior de esos organelos, mientras que un dominio se encuentra proyectado hacia el citoplasma y es el encargado de señalizar hacia el núcleo (Christmas, 2010).

Los linfocitos B en reposo expresan niveles basales significativos de TLRs. Como se puede observar en la figura 21, los niveles de TLR-8, al igual que los de TLR-3, son bajos, en contraste con los niveles de TLR-7 que son más altos.

Suponiendo que DENV sea capaz de infectar células B, pero no replicarse, es lógico pensar que el reconocimiento de RNA de polaridad positiva por TLR-7 puede activar a la célula, de tal forma que se induzca la producción de citocinas proinflamatorias.

Esto es congruente con las observaciones de Hanten y cols. (2008), quienes estimularon células B con agonistas de TLR-7, lo que provocó un aumento en los niveles de IL-6, MIP-1 α (CCL13), MIP-1 β (CCL4, citocina quimiotáctica de células NK) a nivel de mensajero y proteína, de igual forma, el mensajero de TNF α aumentó (Hanten y cols., 2008).

La expresión de TNF α e IL-6 en linfocitos B es consistente con otros estudios (Lin y cols., 2002; Fonseca-Coronado, 2005; Vargas-Castillo, 2011), por lo que estas evidencias podrían sugerir la participación de TLR-7 en la señalización para la producción de esas citocinas.

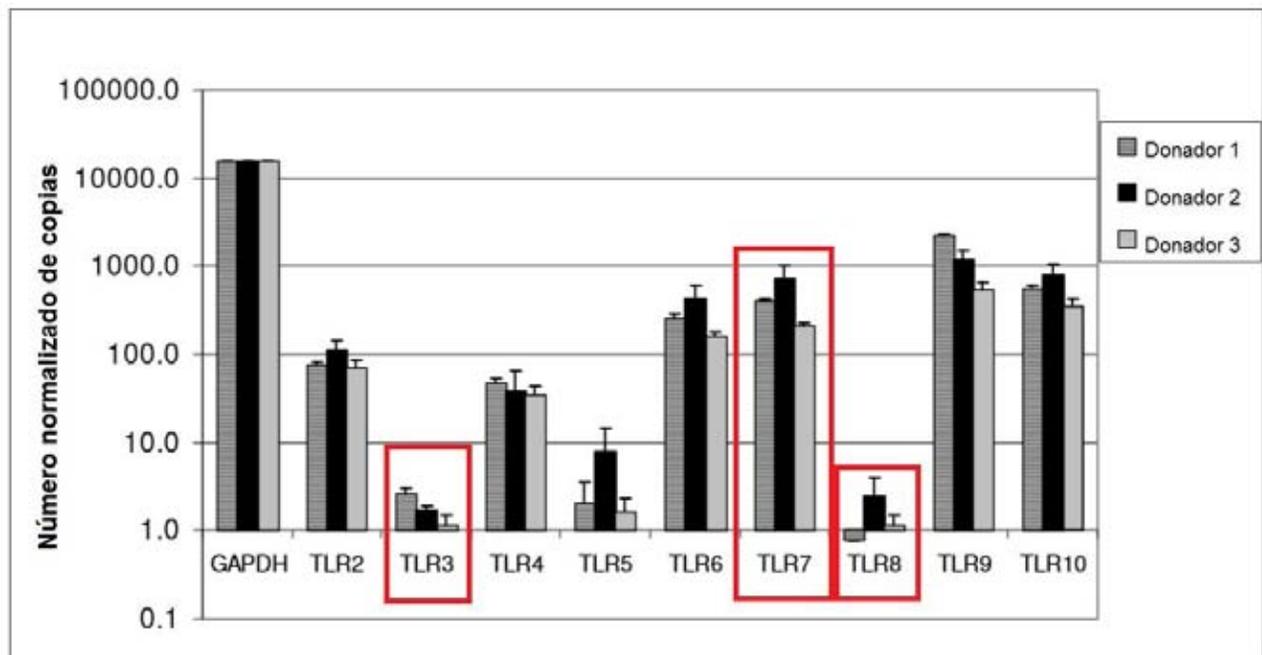


Figura 21. Expresión de mRNA del TLR-2 al TLR-10 en células B humanas de sangre periférica. En rojo se encuentran enmarcados los TLRs que reconocen a DENV (Modificado de Hanten y cols., 2008)

Otras poblaciones celulares son capaces de producir IL-6 tras la infección con DENV, como los fibroblastos (Kurane, Janus y Ennis, 1992), leucocitos de sangre periférica (Chaturvedi y cols., 1999), células endoteliales derivadas de cordón umbilical (HUVEC) (Huang y cols., 2000) y monocitos CD16⁺ (Wong y cols., 2012).

Asimismo, la infección facilitada por anticuerpos en la línea celular THP-1 induce una alta expresión de IL-6 (Chareansirisuthigul, Kalayanarog y Ubul, 2007), contrario a una línea celular de células cebadas/basófilos, que solo muestran un pequeño incremento en la producción de esta citocina (King y cols., 2000). Es evidente que la secreción de IL-6 no está limitada a una población celular.

Sin embargo la evidencia que posiciona a los linfocitos B como la PBMC blanco y la nula producción de IL-6 por parte de macrófagos diferenciados tras la infección con DENV *in vitro* (Chen y Wang, 2002) y de células dendríticas derivadas de monocitos (Ho y cols., 2001), aunado a los elevados niveles plasmáticos de IL-6 y MIF (Factor inhibidor de la migración de macrófagos, producido por macrófagos y linfocitos T estimulados con glucocorticoides) (Calandra y Bucala, 1997; Chen y cols., 2006), sugiere que los niveles de IL-6 plasmáticos podrían tener un origen en varias poblaciones celulares, incluyendo a los linfocitos B.

La producción de IL-6 durante la infección por DENV puede estar implicada en la patogenia de la enfermedad ya que está asociada a la generación de anticuerpos de reactividad cruzada con plaquetas, células endoteliales y plasminógeno tisular, causando defectos en la coagulación (Rachman y Rinaldi, 2006).

Además, IL-6 promueve acciones inflamatorias a través de la exposición y activación de células T, diferenciación de células B y la inducción de proteínas de fase aguda, también es capaz de regular negativamente la expresión de citocinas proinflamatorias, la síntesis del factor XII de la coagulación y la expresión del antagonista del receptor de IL-1 y el receptor de TNF- α (Rachman y Rinaldi, 2006).

Aunado a lo anterior, la expresión de CCL4 podría actuar como quimioatrayente de células NK, la expresión de esta citocina está asociada a la eliminación del virus y se propone como marcador de resolución de la enfermedad (Bozza y cols., 2008).

Otras moléculas moduladas positivamente por los agonistas de TLR-7 son CD80 y CD40 que actúan como coestimuladores, los receptores Fc como CD23, y los factores NF κ B1A y TCFL5 (Hanten y cols., 2008).

Es importante mencionar que, tras la activación de estas células se incrementa dramáticamente TLR-7, por otro lado, los niveles de expresión de este receptor son similares a los de monocitos y MDDC (Bourke y cols., 2003), caracterizados por la alta expresión de TLRs. Además, la activación de TLR-7 en células B resulta en la diferenciación celular y secreción de inmunoglobulinas, de manera interesante, este receptor se encuentra en todas las subpoblaciones de linfocitos B, y su expresión es dependiente de IFN-I (Bekeredjian-Ding y Jegou, 2013).

Por otra parte, se observó la regulación positiva de genes antiapoptóticos como BCL-xL (Hanten y cols., 2008). La activación de estos genes a través de TLR-7, podría explicar el retraso de la apoptosis en células B infectadas con DENV (Fonseca-Coronado, 2005).

No obstante, a pesar de verse aplazado, el proceso apoptótico en células B tiene lugar de 6 a 7 días después de la infección (Fonseca-Coronado, 2005), la apoptosis de células B es un evento común en los folículos y puede resultar en la unión de estos fragmentos a las fDC (Denzer y cols., 2000).

Si la apoptosis inducida por DENV tiene lugar en los folículos primarios, es posible que los cuerpos apoptóticos se unan a las fDC, predisponiendo a otros linfocitos B no infectados, que circulan a través del órgano linfóide secundario, a adquirir el virus y de esta forma continuar con la expansión viral.

Tomando en cuenta el periodo de incubación, y los tiempos de toma de muestra de los estudios reportados (dos días antes del fin de la viremia) se podría pensar que una fracción de las células positivas a antígenos y RNA viral, podrían ser linfocitos B que han adquirido estos cuerpos apoptóticos en los folículos.

Sin embargo, se requiere un estudio que analice la cinética de la infección natural desde el periodo de incubación hasta la resolución de la enfermedad para poder identificar como participan los linfocitos B durante las primeras etapas de la enfermedad. Sí es actúan como células donde se realiza la replicación viral y, de esta forma, ser, en parte, responsables de la diseminación del virus por el organismo y de la evolución a formas graves de dengue.

De igual forma, sería importante identificar el perfil de citocinas a partir de cultivos *ex vivo* (durante diferentes etapas de la infección) de estas células y observar los procesos apoptóticos y la replicación viral.

Cabe mencionar que hasta la fecha los estudios de la infección natural son limitados y nulos en población mexicana y, entre todos los aspectos necesarios para comprender de manera integral la patogenia de la enfermedad, la identificación del tropismo celular o tisular es punto clave para poder plantear soluciones a este problema de salud pública mundial.

vi) CONCLUSIONES

- Se describieron de manera general aspectos involucrados en la patogenia del dengue, con un enfoque hacia la participación de los linfocitos B de sangre periférica
- Además, se revisó y expuso la evidencia que posiciona a las células B de sangre periférica como blancos de la infección, productoras de citocinas proinflamatorias asociadas a los casos graves. Se analizaron las evidencias que apoyan esta teoría y se contrastó con aquellas que indican resultados contrarios.
- También se planteó un modelo hipotético del papel que desempeñan los linfocitos B como células transportadoras del virus a través de los órganos linfoides secundarios, basado en las evidencias antes mencionadas y los mecanismos de migración de esta población celular.
- Se propuso que el reconocimiento del virus del dengue por TLR-7 en linfocitos B, induce la expresión de citocinas proinflamatorias, entre otras moléculas, apoyando las evidencias que señalan a las células B como células efectoras.
- En función de la información disponible al momento, se puede establecer que las células B participan, de una forma no del todo clara, durante la patogenia del dengue. Con base a lo anterior es evidente la necesidad de realizar más investigaciones que permitan clarificar estas hipótesis.

vii) PERSPECTIVAS

El conocimiento de los mecanismos patológicos de cualquier es primordial para el tratamiento y prevención de la misma. En el caso del dengue, al ser un problema de salud pública nacional y mundial, este conocimiento puede tener un impacto mayor en la solución de este padecimiento.

Es por ello que se requieren más datos que apoyen o refuten la hipótesis que postula a los linfocitos B como blanco de la infección, así como el hallazgo de receptores en esta población y las consecuencias de la interacción del virus con estas células.

Además, la descripción de estos aspectos en población mexicana y con cepas virales nacionales, podrían ser de gran ayuda en el planteamiento de acciones que beneficien a la población de nuestro país.

Hasta el momento, no se tiene referencia alguna de un documento que compile la información disponible existente, que trate el tema de esta investigación, por lo que el presente es el primero en su tipo, y se espera que sirva como referencia y fuente de consulta en futuras investigaciones acerca de la infección por el virus del dengue e incluso para otras patologías.

viii) REFERENCIAS

- Acosta EG, Kumar A, and Bartenschlager R (2014). Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology. *Adv Virus Res* **88**:1-109.
- Albert ML, Sauter B and Bhardwaj N (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induces class I restricted CTLs. *Nature* **392**(6671):86-89.
- Alen MM, Dallmeier K, Balzarini J, Neyts J and Schols D (2012). Crucial role of the N-glycans on the viral E-envelope glycoprotein in DC-SIGN-mediated dengue virus infection. *Antiviral Res* **96**(3):270-280.
- Baclig MO, Gervacio LT, Suarez LA, Buerano CC, Matias RR, Kumatori A, Inoue S, Morita K, Natividad FF and Hasebe F (2010). Flow cytometric analysis of dengue virus-infected cells in peripheral blood. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **41**(6):1352-1358.
- Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, Beatty PR and Harris E (2009). Tropism of Dengue virus in mice and human defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg* **80**(3):416-424.
- Bartenschlager R and Miller S (2008). Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol* **3**(2):155-165.
- Basilio de Oliveira CA, Aguiar GR, Baldanza MS, Barth OM, Eyer-Silva WA and Paes MV (2005). Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis* **9**(4):341-347.
- Bekeredjian-Ding I and Jengo G (2009). Toll-like receptors- sentries in the B-cell response. *Immunology* **128**(3):311-323.
- Berger M (2012). Chapter 4: Complement. En "Immunology IV. Clinical Applications in Health and Disease", Bellanti JA, Escobar-Gutiérrez A y Tsokos GC Eds. I Care Press. Washington, DC, EEUU. Pp 117
- Bhoopat L, Bhamarapravati N, Attasiri C, Yoksarn S, Chaiwun B, Khunamornpong S and Sirisanthana V (1996). Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. *Asian Pac J Allergy Immunol* **14**(2):107-113.
- Bielefeldt-Ohmann H, Michelle Meyer M, Fitzpatrick DR and Mackenzie JS (2001). Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res* **73**(1):81-89.
- Blackley S, Kou Z, Chen H, Matthew Q, Rose RC, Schlesinger JJ, Coppage M and Jin X (2007). Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are

- the principal target cells for dengue virus infection in vitro. *J Virol* **81**(24):13325-13334.
- Boonpucknavig S, Bhamarapravati N, Nimmannitya S, Phalavadhtana A and Siripont J (1976). Immunofluorescent staining of the surfaces of lymphocytes in suspension from patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Pathol* **85**(1): 37-48.
- Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N and Mantovani A (2003). The Toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* **102**(3):956-963.
- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT and Kubelka CF (2008). Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* **25**(8):86.
- Briseño-García B, Gomez-Dantes H, Argott-Ramirez E, Montesano R, Vazquez-Martinez AL, Ibañez-Bernal S, Madrigal-Ayala G, Ruiz-Matus C, Flisser A and Tapia-Conyer R (1996). Potential risk for dengue hemorrhagic fever: The isolation of serotype dengue-3 in Mexico. *Emerg Infect Dis* **2**(2):133-135.
- Calandra T and Bucala R (1997). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev Immunol* **17**(1):77-88
- Cambier JC, Gauld SB, Merrel KT and Vilen BJ (2007). B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?. *Nat Rev Immunol* **7**(8):633-643.
- Carsetti R (2000). The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *J Exp Med* **191**(1):5-8.
- Chareansirisuthigul T, Kalayanarog J and Ubul S (2007) Dengue virus (DENV) antibody-dependent-enhancement of infection upregulates the production of antiinflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory production, in THP-1 cells. *J Gen Virol* **88**(Pt 2):365-375.
- Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agavual K, Raghupathy R, Nagar R, Tanden R, Pacsa AS, Younis OI and Azizieh F (1999). Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol* **59**(3):335-340.
- Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shieh SC, Chen SH, Liu HS, Lin YS, Wang ST, Shyu HW and Yeh TM (2006). Correlation of serum levels of macrophage

- migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* **74**(1):147-147.
- Chen YC and Wang SY (2002). Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: Productive infection, Hierarchical production of innate cytokines and chemokines and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol* **76**(19):9877-9887.
- Christmas P (2010). Toll-Like Receptors: Sensors that Detect Infection. *Nature Education* **3**(9):85.
- Clark KB, Hsiao HM, Noisakran S, Tsai JJ and Perng G (2012). Role of microparticles in dengue virus infection and its impact on medical intervention strategies. *Yale J Biol Med* **85**(1):3-18.
- Clyde K, Kyle JL and Harris E (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* **80**(23):11418-11431.
- Cumberbatch M, Dearman RJ, Griffiths CE and Kimber I (2000). Langerhans cell migration. *Clin Exp Dermatol* **25**(5):413-418.
- Cyster JG (2010). B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat Immunol* **11**(11):989-996.
- Denzer K, van Ewijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C and Geuze HJ (2000). Follicular dendritic cells carry MHC class II-Expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* **165**(3):1259-1265.
- Diamond MS (2003). Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunol Cell Biol* **81**(3):196-206.
- Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B and Harris E (2000). Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* **74**(17):7814-7823.
- Diao J, Winter E, Chen W, Cantin C and Catral M S (2004). Characterization of distinct conventional and plasmacytoid dendritic cell-committed precursors in murine bone marrow. *J. Immunol* **173**(3):1826–1833.
- Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, Balmaseda A and Harris E (2008). Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology* **376**(2):429-435.
- Dürig J, Naschar M, Schmücker U, Renzing-Köhler K, Hölter T, Hüttmann A and Dührsen U (2002) CD38 Expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* **16**(1):30-35

- Edwards JC and Cambridge G (2006). B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* **6**(5):394-403.
- Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijeyes M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Franson J, Figdor CG, Piguet V and van Kooyk Y (2002). The Dendritic cell-adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* **168**(5):2118-2126.
- Falgout B, Pethel M, Zhang YM and Lai CJ (1991). Both nonstructural protein NS2B and NS3B are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* **65**(5):2467-2475.
- Fonseca-Coronado S (2005). Efectos de la infección por el virus del dengue sobre linfocitos B: identificación de replicación viral activa, inducción de apoptosis y producción de citocinas. Tesis Doctoral. ENCB. IPN.
- Förster R, Braun A and Worbs T (2012) Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol* **33**(6): 271-280
- Fujimoto I, Pan J, Takizawa T and Nakanishi Y (2000). Virus clearance through apoptosis-dependent phagocytosis of influenza A virus-infected cells by macrophages. *J Virol* **74**(7):3399-33403.
- Girard JP, Moussion C and Förster R (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* **12**(11):762-773.
- González-Fernández RR (2014). Expresión de TLR-3, -7 y -8 en células fagocíticas mononucleares humanas infectadas con virus del dengue. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Licenciado en Bioquímica Diagnóstica. FES Cuautitlán. México.
- Gubler DJ (1998). Dengue and Dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* **11**(3):480-496.
- Guzman MG , Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ , Hunserger E, Kroeger A, Margolis HS, Martinez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S and Peeling RW (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* **8**(12 Suppl):S7-S16.
- Hadinegoro SR (2012). The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified?. *Pediatr Int Child Health* **32**(S1):33-38.
- Halstead SB (2003). Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* **60**:421-467.
- Halstead SB (2012). Controversies in dengue pathogenesis. *Pediatr Int Child Health* **32**(S1):5-9.
- Halstead SB and O'rourke E (1977). Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* **265**(5596):739-741.

- Hanten JA, Vasilakos JP, Riter CL, Neys L, Lipson KE, Alkan SS and Birmachu W (2008). Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. *BMC Immunol* **9**:(39).
- Hardy RR and Hayakawa K (2001). B cell development pathways. *Annu Rev of Immunol*, **19**:595-621.
- Hidari KIPJ and Suzuki T (2011). Dengue virus receptor. *Trop Med and Health* **39**(4 Suppl):37-43.
- Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, Kao CL, Chang DM, Han JW and Lai JH (2001). Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol* **166**(3):1499-1506.
- Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC and Yeh TM (2000). Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg* **63**(1-2):71-75.
- Imhof B and Aurrand-Lions M (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* **4**(6): 432-444
- Islas-Arenas J (2013). Relación entre la secuencia de gen NS1 viral y la detección de la proteína por ELISA en casos de dengue. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. FES Cuautitlán. México.
- Ivashkiv LB and Di Martino SJ (2012). Chapter 5: Inflammation. En "Immunology IV. Clinical Applications in Health and Disease", Bellanti JA, Escobar-Gutiérrez A y Tsokos GC Eds. I Care Press. Washington, DC, EEUU. Pp 135
- Jampangern W, Vongthoung K, Jittmittraphap A, Worapongpaiboon S, Limkittikul K, Chuansumrit A, Tarunotai U and Chongsa-nguan M (2007). Characterization of atypical lymphocytes and immunophenotypes of lymphocytes in patients with dengue virus infection. *Asian Pac J Allergy Immunol* **25**(1):27-36.
- Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK and Wong KT (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* **189**(8):1411-1418.
- Johnston LJ, Halliday GM and King NJ (2000). Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol* **114**(3):560-568.
- Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF and Sanz I (2012). Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol* **10**(3):302.
- Kikuchi K, Kasai H, Watanabe A, Lai AY and Kondo M (2008). IL-7 specifies B cell fate at the common lymphoid progenitor to pre-pro B transition stage by maintaining early B cell factor expression. *J Immunol* **181**(1):383-92.

- King AD, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S and Innis BL (1999). B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **30**(4):718-728
- King CA, Marshal JS, Alshurafa H and Anderson R (2000) Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J Virol* **74**(15):7146-7150.
- Köppler B, Cohen C, Schlöndorff D and Mack M (2006). Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur J Immunol* **36**(3): 648-660.
- Kornbluth RS (1994). Significance of T cell apoptosis for macrophages in HIV infection. *J Leukoc Biol* **56**(3):247-256.
- Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WW, Rose RC, Schlesinger JJ and Jin X (2008). Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* **80**(1): 134-146
- Kuno G, Gubler DJ, Vélez M and Oliver A (1985). Comparative sensitivity of three mosquito cell line for isolation of dengue viruses. *Bull World Health Organ* **63**(2):279-286.
- Kurane I (2007). Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **30**(5-6):329-340.
- Kurane I, Janus J and Ennis FA (1992) Dengue virus infection of human skin fibroblasts in vitro production of IFN-beta, IL-6 and GM-CSF. *Arch Virol* **124** (1-2):21-30.
- Kurane I, Kontny U, Janus J and Ennis F (1990). Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. *Arch Virol* **110**(1-2): 91-101.
- LeBien T and Tedder T (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**(5):1570-1580.
- Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH and Liu CC (2001). Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* **8**(5):377-388.
- Limon-Flores AY, Perez-Tapia M, Estrada-Garcia I, Vaughan G, Escobar-Gutierrez A, Calderon-Amador J, Herrera-Rodriguez SE, Brizuela-Garcia A, Heros-Chavarria M, Flores-Langarica A, Cedillo-Barron L and Flores-Romo L (2005). Dengue virus inoculation to human skin explants an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. *Int J Exp Path* **86**(5): 323-334.

- Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiao AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC and Lin YS (2005). Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol* **174**(1): 395-403.
- Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Liu CC and Chen SH (2002). Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol* **76**(23):12242-12249.
- Lindenbach BD, Heinz-Jürgen T and Rice CM (2007). Chapter 33. *Flaviviridae*: The viruses and their replication. En "Fields Virology", DM Knipe y PM Howley Eds. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, EEUU. Pp 1101-1112.
- Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F and Amara A (2005). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem* **280**(25): 23698–23708.
- Manning JS and Collins JK (1979). Effects of cell culture and laboratory conditions on type 2 dengue virus infectivity. *J Clin Microbiol* **10**(2): 235-239.
- Martin CH, Aifantis I, Scimone ML, von Andrian UH, Reizis B, von Boehmer H and Gounari F (2003). Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat Immunol* **4**(9):866-873.
- Martina BE, Koraka P and Osterhaus AD (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* **22**(4): 564-581.
- Martínez RA (2008). Tratamiento del dengue durante su etapa aguda: Revisión sistemática de la literatura. *Infectio* **12**(4): 277-286.
- Melchers F (2005). The Pre-B-cell receptor: Selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* **5**(7): 578-584.
- Mongkolsapaya J, Wanwisa D, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchida T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenchitsomanus PT, McMichel A, Malasit P and Screaton G (2003). Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* **9**(7): 921-928.
- Murray NE, Quam MB and Wilder-Smith A (2013). Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol* **20**(5): 299-309.
- Nagasawa T (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* **6**(2): 107-116.

- Narro-Robles J y Gómez-Dantés H (1995). El dengue en México: Un problema prioritario de Salud Pública. *Salud Pública de México* **37**: 12-20
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F and Després P (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Reports* **4**(7): 723–728.
- Nestle FO, Di Meglio P, Quin JZ and Nickoloff BJ (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**(10): 679-691.
- Nutt SL, Heavey B, Rolink AG and Busslinger M (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* **401**(6753):556–562.
- Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Daf M, Littman DR, Rollins BJ, Zweerink H, Rot A and von Andrian UH (2001). Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* **194**(9): 1361-1373
- Park CS and Choi YS (2005). How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre. *Immunology* **114**(1): 2-10.
- Pasparakis M, Haase I and Nestle FO (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* **14**(5): 289-301.
- Pelayo R, Hirose J, Huang J, Garrett KP, Delogu A, Busslinger M and Kincade PW (2005). Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood* **105**(11):4407–4415.
- Povoa T, Alves A, Oliveira C, Nuovo G, Chagas V and Paes M (2014). The pathology of Severe Dengue in multiple organs of human fatal cases: Histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS one* **9**(4): e83386.
- Rachman A and Rinaldi I (2006). Coagulopathy in Dengue Infection and the Role of Interleukin-6. *Acta Med Indones* **38**(2): 105-108.
- Rappocciolo G, Piazza P, Fuller CL, Reinhart TA, Watkins SC, Rowe DT, Jais M, Gupta P and Rinaldo CR (2006). DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes. *PLoS Pathog* **2**(7): e70
- Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F and Del Angel RM (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* **79**(8):4557–4567.
- Rickert R (2013). New insights into pre-BCR and BCR signaling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol* **13**(8): 578-591.

- Rigau-Perez J (1998). The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and Dengue in Spanish. *Am J Trop Med Hyg* **59**(2):272-274.
- Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J and Smit JM (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci* **67**(16):2773-2786.
- Rodríguez-Alba J (2008). Papel de CD38 en la diferenciación de los Linfocitos B inmaduros del bazo murino. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. UNAM.
- Rolink AG, Nutt SL, Melchers F and Busslinger M (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell. *Nature* **401**(6753):603–606.
- Rolink AG, ten Boekel E, Melcher F, Fearon DT, Krop I and Andersson J (1996). A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J. Exp. Med.* **183**(1):187–194.
- Rosen L, Drouet MT and Deubel V (1999). Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J trop Med Hyg* **61**(5): 720-724.
- Rothman AL (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* **11**(8): 532-543.
- Secretaría de Salud (2006). Programa Nacional de Vigilancia, prevención y control del dengue: Guía práctica para su diagnóstico, manejo y tratamiento. Secretaría de Salud. México.
- Secretaría de Salud (2008). Procedimiento para la aplicación del nuevo algoritmo para diagnóstico por laboratorio de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue. Secretaría de Salud, México. 5-9.
- Secretaría de Salud (2013) Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue. Información publicada en la semana epidemiológica 52 actualizada al 30 de diciembre 2013. Secretaría de Salud. México.
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2013/Pano_dengue_sem52_sem2013.pdf Consultado en enero de 2014
- Shah M, Wadood A, Rahman Z and Husnain T (2013). Interaction and Inhibition of Dengue Envelope Glycoprotein with Mammalian Receptor DC-SIGN, an In-Silico approach. *PLoS one* **8**(3): e59211.
- Shi C and Pamer EG (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **10**(11):762-774

- Srikiatkachorn A, Wichit S, Gibbons R, Green S, Libraty D, Endy T, Ennis F, Kalayanaroj S and Rothman A (2012). Dengue viral RNA levels in peripheral blood mononuclear cells are associated with disease severity and preexisting dengue immune status. *PLoS one* **7**(12): e51335.
- St. John AL, Abraham SN and Gubler DJ (2013). Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **11**(6):420 -426.
- Surova E and Jumaa H (2014). The role of BCR isotype in B-Cell Development and Activation. *Adv Immunol* **123**: 101-139.
- Tam DT, Ngoc TV, Tien NT, Kieu NT, Thuy TT, Thanh LT, Tam CT, Truong NT, Duing NT, Qui PT, Hien TT, Farrar JJ, Simmons CP, Wolbers M and Willis BA (2012). Effects of short-course oral corticosteroid therapy in early dengue infection in Vietnamese patients: a randomized, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* **55**(9): 1216-1224.
- Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S and Marovich MA (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* **197**(7): 823-839.
- Theofilopoulos AN, Brandt WE, Russell PK and Dixo FT (1976). Replication of dengue-2 virus in cultured human lymphoblastoid cells and subpopulations of human peripheral leukocytes. *J Immunol* **117**(3): 953-961.
- Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS and Kubelka CF (2009). Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(8): 1091-1099.
- van der Velden A, Lindgren S, Warley M and Heffron F (2000) Salmonella pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Infect Immun* **68**(10): 5702-5709.
- van Nierop K and de Groot C (2002). Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin Immunol* **14**(4): 251-257.
- Vargas-Castillo A (2011). Determinación de apoptosis en la línea celular Raji y en cultivos primarios de linfocitos B humanos infectados con virus del dengue serotipo 2. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. FES Cuautitlán. México.
- Velandía ML y Castellanos JE (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio* **15**(1): 33-43.
- von Andrian UH and Mempel TR (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* **3**(11): 867-878.

- Wahala WM and de Silva AM (2011). The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses* **3**(12): 2374-2395.
- WHO (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wiley RD and Gummuluru S (2006). Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(3):738-743.
- Wong KL, Chen W, Balakrishnan T, Toh YX, Fink K and Wong SC (2012) Susceptibility and response of human blood monocyte subsets to primary dengue virus infection. *PLoS one* **7**(5): e36435.
- Wu L and KewalRamani VN (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* **6**(11): 859-868.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Wellington S, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG and Frankel SS (2000). Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* **6**(7):816-820.
- Yauch LE and Shresta S (2014). Dengue Virus Vaccine Development. *Adv Virus Res*, **88**: 315-372.
- Yuseff MI, Pierbon P, Reversat A and Lennon-Duménil AM (2013). How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol* **13**(7):475-486.

ix) URLS

Panorama Epidemiológico de Fiebre por Dengue y Fiebre Hemorrágica por Dengue. Información publicada en la semana epidemiológica 52 actualizada al 30 de diciembre 2013. Recuperado de: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2013/Pano_dengue_sem52_sem2013.pdf, en enero de 2014.

Mapa Global de Consenso IDAMS. Recuperado de: <http://www.healthmap.org/dengue/es/> en octubre de 2014.