



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Efecto inmunomodulador de los antígenos de
excreción - secreción de *Trichinella spiralis* sobre la
infección por virus del dengue**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

PAREDES SANDOVAL SANDRA MARÍA

ASESOR: Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana

COASESORA: M. en C. Karina Ruiz Tovar

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

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

Efecto inmunomodulador de los antígenos de excreción - secreción de *Trichinella spiralis* sobre la infección por virus del dengue.

Que presenta la pasante: Sandra María Paredes Sandoval
Con número de cuenta: 304176362 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Noviembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
VOCAL	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
SECRETARIO	Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
2do. SUPLENTE	M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles	

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

LMCF/cga*

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología Especial y en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Coordinación de Investigaciones Inmunológicas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” de la Secretaría de Salud bajo la asesoría de la M. en C. Karina Ruiz Tovar y el Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre Francisco y a mi madre María,

Por el esfuerzo que realizaron para hacer esto posible y brindarme el apoyo, por los consejos que me dieron desde muy pequeña. Por lo que hicieron para convertirme en la persona que soy, que esto sea una manera de ver reflejado una parte de ustedes. Espero papá donde estés, sea un gran logro para ti y para ti mamá sea una meta lograda. Y marque el inicio de nuevos logros, gracias.

A mi tío Jesús Paredes y familia,

Por la estimación y cuidarme de pequeña, por los consejos que me daba, por la motivación que siempre me dio para que me fijara un objetivo desde una edad muy temprana y el apoyo que brindo en los momentos necesarios, espero esto sea un logro para usted donde este, gracias.

A mi tío Isaías Sandoval y familia,

Por el apoyo que me proporciono desde muy pequeña y por continuar con este, el cual también dio pie a mis primeros pasos en mi trayecto y al inicio de mi carrera, por estar cada vez que lo necesitaba, por su estimación, gracias.

A la M. en C. Karina Ruiz Tovar,

Por permitirme trabajar en el Laboratorio de Inmunología Especial, por todos sus consejos y sugerencias que me dio siempre, la confianza, guiarme, enseñarme y dejarme aprender muchas cosas de usted que me hicieron y espero sigan haciéndome mejor profesionistas. Por dejarme la enseñanza de esforzarme, gracias.

Al Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana,

Por dejarme usar el Laboratorio de Inmunoparasitología y darme la oportunidad de aprender mucho a través de este, por la confianza y el apoyo que me dio, espero esto marque mi camino para más metas, gracias.

A la Bióloga Guadalupe Granados,

Por dejarme usar su laboratorio, por sus consejos, la amabilidad y el apoyo que tuve de usted, además de dejarme la enseñanza de humildad, para seguir creciendo como persona y como profesionista. Además por permitirme aprender muchas cosas para mi formación como profesionista, gracias.

A las M. en C. Yolanda Medina, QFB Olga Mata, M. en C. Edith Medina, Lolita, Sr. Mario,

Por permitirme usar parte de su laboratorio, por los consejos, la ayuda, la confianza la generosidad que tuve de ustedes, además de dejarme la enseñanza de perseverancia. Y darme la oportunidad de aprender cosas nuevas en mi trayecto como profesionalista, gracias.

Al Dr. Alejandro Escobar,

Por permitirme trabajar en la coordinación y aprender a través de los laboratorios nuevas cosas para mi formación, gracias.

A la Dra. Angélica Vargas,

Por sus consejos, opines y por enseñarme parte de las técnicas que use en este trabajo de Tesis para hacerlo mejor y darme lecciones para ser un buen profesionalista, gracias.

A las QFB Raquel Escobar, Guadalupe Rodríguez y al Técnico Guadalupe Torres,

Por el apoyo que me dieron para realizar mi proyecto de Tesis.

Al QFI Antonio Meza, M. en C. Ricardo, QFB Teresa Corona, Sra. Rosita,

Por brindarme consejos durante mi estancia.

A mi amiga Karen,

Por tus consejos, compañía, risas, amistad, apoyo, salidas y animarme a seguir en este camino hasta lograr mi meta cada momento fue especial, gracias.

A mis amigos del InDRE, Daniela, Daniel, David,

Por brindarme su compañía, apoyo y estar conmigo durante mi estancia en el Instituto esos momentos también formaron parte de mí, gracias.

A mis profesores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán,

Por enseñarme cada día una nueva lección, por compartir sus conocimientos y darme la oportunidad de aprender a través de ustedes diferentes cosas que marcaron el inicio para mi formación como profesionalista y dejarme la enseñanza que no hay límites cuando tienes una meta.

A mi jurado de Tesis,

Por sus consejos y sugerencias para hacer de mi trabajo de Tesis más enriquecedor. Fui estudiante de ustedes y aprendí varias lecciones las cuales me hicieron crecer y espero me sigan haciendo crecer en mi trayecto, gracias.

A mis amigos de la Facultad, Raquel, Claudia, Guadalupe, Sara, Paulina, Bladimir,

Por todos los momentos que pasamos, las risas que compartimos, el apoyo que me brindaron, los desvelos que compartimos, los consejos, la amistad, el conocerlos volvió cada momento inolvidable en la escuela y lo más importante eso formo parte para dar mis primeros pasos para el camino como profesionista, gracias.

A mi amiga Lupe,

Por cada momento que hemos pasado desde que nos conocemos, por la estimación y enseñarme algunas cosas durante la carrera.

A mi amigo Brayan,

Por estar en cada proyecto que inicio y brindándome tu apoyo incondicional siempre, por la estimación y por estar ahí dándome palabras para seguir en lo que más me gusta, cada momento contigo también se volvió parte para este camino, gracias.

A Adela e Imelda,

Gracias por el apoyo que me brindaron para iniciar mis primeros pasos durante la carrera, después para que esos pasos se convirtieran en mi camino y lograra cumplir una meta, por la confianza, por la amabilidad que tuve de ustedes y por enseñarme diferentes lecciones. Por hacerme ver otra faceta de mí y poder compartirla con ustedes.

A Luz María, Mariana, Damaris,

Por su compañía y cada momento que compartimos fue muy agradable, estos se convirtieron en otra etapa de mi vida.

A Dios,

Tú sabes los caminos que nos darás y por qué serán de esa manera, pero también sabes darnos los guías en estos.

Gracias a ti por dejarme terminar una etapa de mi vida y dejarme iniciar una nueva.

Dedicatoria.

A mis padres,

Por todo lo que me dieron, su cariño, que esto sea un logro para ustedes.

A mi hermano Eduardo,

Por su estimación y apoyo que me has dado.

A mi tío Jesús Paredes,

Por lo que me dio y sea un detalle para usted.

Y las personas que me alentaron a seguir en este trayecto.

Índice	Página
ABREVIATURAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Dengue	1
1.2 Virus dengue	4
1.3 Ciclo de replicación viral	5
1.4 La respuesta inmunológica durante la infección por el virus del dengue	6
1.5 Patogénesis de la enfermedad	9
1.6 Helmintos como inmunomoduladores	13
1.7 Triquinelosis	15
1.8 Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	15
1.9 Propiedades inmunomoduladoras de los antígenos de excreción-secreción de <i>T. spiralis</i> (ESTs)	20
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	
Objetivo general	23
Objetivo particular	23
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1 Mantenimiento y propagación de <i>Trichinella spiralis</i> (MSUS/ME/92/CM-92)	25

Índice	Página
6.2 Recuperación de larvas musculares por digestión enzimática	25
6.3 Cosecha y cuantificación de los antígenos ESTs	26
6.4 Identificación de productos ESTs	27
6.5 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP)	27
6.6 Cinética de estímulo con antígenos ESTs e infección con DENV-2	28
6.7 Cuantificación de TNF- α , IL-6 e IL-10 por ELISA	29
6.8. Detección de la proteína NS1 del DENV-2 por citometría de flujo	30
6.9 Análisis estadístico	30
7. RESULTADOS	
7.1 Obtención de antígenos ESTs	31
7. 2 Cuantificación de citocinas en CMNSP estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV	34
7.3 Citometría de flujo para la expresión de la proteína NS1 viral	38
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	44
10. PERSPECTIVAS	45
11. REFERENCIAS	46

ABREVIATURAS

CLR	del inglés <i>C-type lectin receptor</i>
CMNSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
DENV	Virus dengue
DNA	del inglés <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	del inglés <i>double-stranded RNA</i>
ESTs	antígenos de excreción–secreción de <i>Trichinella spiralis</i>
HLA	del inglés <i>Human Leucocyte Antigen</i>
hpi	horas post-infección
INF	Interferón
LGP2	del inglés <i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	Lipopolisacárido
MDA-5	del inglés <i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MHC	del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIF	del inglés <i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
NRL	del inglés <i>NOD-like receptor</i>
NS1	del inglés <i>Non-structural protein 1</i>
RIG-I	del inglés <i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RLR	del inglés <i>RIG-I-like receptor</i>
RNA	del inglés <i>Ribonucleic acid</i>
SDS-PAGE	del inglés <i>dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNC	Sistema nervioso central
ssRNA	del inglés <i>single-stranded RNA</i>
TGF- β	del inglés <i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	del inglés <i>Toll-like receptor</i>

Figura 1. Incidencia de casos identificados por dengue en México 2018	2
Figura 2. Virus del dengue	4
Figura 3. Ciclo de replicación del virus dengue	6
Figura 4. Reconocimiento del RNA viral a través de PRRs y las vías de señalización para la producción de citocinas inflamatorias e interferones	12
Figura 5. Mecanismos de inmunomodulación de los helmintos	14
Figura 6. Incidencia de casos notificados por triquinelosis en México 2018	18
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	19
Figura 8. Triquinoscopía en diafragma de rata infectada	32
Figura 9. Obtención de larvas musculares	32
Figura 10. Identificación de los antígenos ESTs	33
Figura 11. Cinética de cuantificación de IL-6 en sobrenadante de cultivo de CMNSP estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV	35
Figura 12. Cinética de cuantificación de TNF- α en sobrenadante de cultivo de CMNSP estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV	36
Figura 13. Cinética de cuantificación de IL-10 en sobrenadante de cultivo de CMNSP estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV	37
Figura 14. Expresión de la proteína NS1 viral en CMNSP infectadas con DENV	38

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Serotipos identificados por dengue en México 2018	3
Tabla 2. Número de casos notificados por entidad federativa por triquinelosis	17
Tabla 3. Concentración de antígeno ESTs	33

RESUMEN

El dengue es una enfermedad infecciosa aguda, causada por el virus del dengue (DENV), que se puede presentar con o sin signos de alerta y progresar a dengue grave. Las manifestaciones clínicas más comunes son fiebre, cefalea, mialgias, artralgias y manifestaciones hemorrágicas que son promovidas por una respuesta inmune exacerbada. Los factores implicados en la patogénesis de la infección por el DENV no se han determinado completamente, por lo que hasta el momento no se ha considerado la posible participación de eventos derivados de coinfecciones. En particular, la triquinelosis es una zoonosis ocasionada por el nematodo *Trichinella spiralis*, el cual desde el punto de vista epidemiológico comparte cierta endemicidad con el dengue y desde el punto de vista inmunológico, se sabe que sus antígenos de excreción-secreción (ESTs) son inmunomoduladores y es posible que estas propiedades puedan impactar en el curso clínico del dengue.

Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto de los antígenos ESTs durante la infección de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) humana con el DENV. Se estableció un modelo de coinfección *in vitro* a partir de cultivos primarios de CMNSP que se estimularon con los antígenos ESTs de la larva muscular de *T. spiralis* y posteriormente se infectaron con el DENV, realizando una cinética de infección a las 0, 24, 48, 72 horas. El perfil de las citocinas inflamatorias (IL-6 y TNF- α) y anti-inflamatoria (IL-10) en los sobrenadantes se cuantificó por ELISA. Se realizó una tinción intracelular con un anticuerpo anti-NS1 para corroborar la replicación del virus en las células por citometría de flujo. Los resultados mostraron el aumento de IL-6 y TNF- α en las células coinfectadas con los ESTs y DENV con respecto a las únicamente infectadas con DENV. Las células solo estimuladas con los antígenos ESTs no mostraron incremento de la citocina anti-inflamatoria (no hay efecto regulador) ni de las citocinas inflamatorias.

En conclusión, los antígenos ESTs promueven el incremento de TNF- α e IL-6, citocinas pro-inflamatorias presentes durante la infección por DENV, sugiriendo su participación en la patogenia de la enfermedad, por lo que se propone considerar a las coinfecciones con los helmintos en la inmunopatología del dengue.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Dengue.

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por alguno de los cuatro serotipos del virus dengue (DENV-1, -2, -3, -4), la transmisión ocurre por la picadura de mosquitos vectores (*Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* principalmente) y posee alta prevalencia en regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial (Westaway y col., 1985; Calisher y col., 1989; Guzmán y Kourí, 2002; Gubler, 2002).

Entre 7 y 14 días posteriores a haber contraído la infección aparecen los síntomas más comunes y que corresponden al dengue sin signos de alarma, principalmente fiebre elevada acompañada de mialgias, cefalea, artralgias, rash, dolor retroocular. Sin embargo, esta forma clínica puede progresar a dengue con signos de alarma, que presenta dolor abdominal, hepatomegalia, manifestaciones hemorrágicas graves, leucopenia, trombocitopenia y finalmente la enfermedad puede manifestarse como dengue grave en la que el aumento de la permeabilidad vascular y la afectación multiorgánica comprometen la vida del paciente (Henchal y Putnak, 1990; Tsai y col., 1991; Gubler, 2002; WHO, 2009; WHO, 2012^a).

Los casos por dengue al año se han incrementado en la población mundial, especialmente en las áreas con co-circulación de múltiples serotipos del virus. También se estima que el dengue es responsable de 20,000 muertes anuales (Gubler, 2012; WHO, 2012^b; Murray y col., 2013; Shepard y col., 2013). En México la incidencia de casos reportados por dengue se ha elevado (figura 1), siendo los estados más afectados Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nuevo León y San Luis Potosí, identificándose diferentes serotipos en el territorio nacional (tabla 1) (Panorama Epidemiológico de Dengue 2018-Semana Epidemiológica 52).

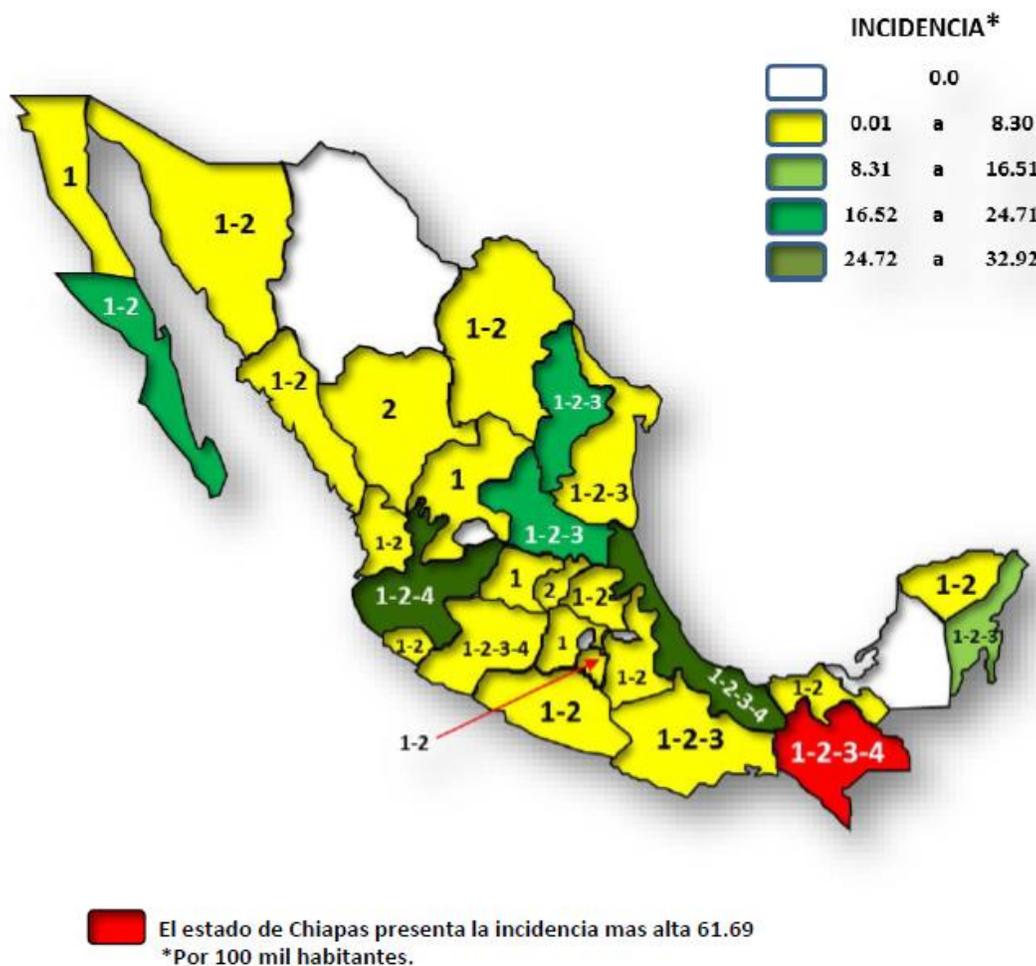


Figura 1. **Incidencia de casos identificados por dengue en México 2018.** El estado de Chiapas presenta la incidencia más alta por cada *100 mil habitantes. Modificado del Panorama Epidemiológico de Dengue 2018-Semana Epidemiológica 52.

ESTADO	SEROTIPOS CIRCULANTES				TOTAL
	1	2	3	4	
AGUASCALIENTES	0	0	0	0	0
BAJA CALIFORNIA	3	0	0	0	3
BAJA CALIFORNIA SUR	2	151	0	0	153
CAMPECHE	0	0	0	0	0
CHIAPAS	19	943	31	1	994
CHIHUAHUA	0	0	0	0	0
COAHUILA	8	9	0	0	17
COLIMA	20	18	0	0	38
DISTRITO FEDERAL	0	0	0	0	0
DURANGO	0	5	0	0	5
GUANAJUATO	39	0	0	0	39
GUERRERO	42	20	0	0	62
HIDALGO	2	15	0	0	17
JALISCO	1441	585	0	1	2027
MEXICO	89	0	0	0	89
MICHOACAN	308	2	3	1	314
MORELOS	7	43	0	0	50
NAYARIT	57	30	0	0	87
NUEVO LEON	54	878	1	0	933
OAXACA	171	112	2	0	285
PUEBLA	128	1	0	0	129
QUERETARO	0	2	0	0	2
QUINTANA ROO	36	141	3	0	180
SAN LUIS POTOSI	520	123	1	0	644
SINALOA	7	6	0	0	13
SONORA	21	5	0	0	26
TABASCO	16	8	0	0	24
TAMAULIPAS	28	93	7	0	128
TLAXCALA	0	0	0	0	0
VERACRUZ	726	179	22	2	929
YUCATAN	8	7	0	0	15
ZACATECAS	3	0	0	0	3
Total	3755	3376	70	5	7206

Tabla 1. **Serotipos identificados por dengue en México 2018.** Modificado del Panorama Epidemiológico de Dengue 2018-Semana Epidemiológica 52.

1.2 Virus dengue.

El DENV es una partícula de apariencia esférica y tiene un diámetro aproximado de 50 nm, posee una nucleocápside con forma icosaédrica rodeada por una membrana lipídica, su genoma es una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb, que presenta una estructura *cap* en su extremo 5' y carece de una secuencia de poliA en su extremo 3' (figura 2). La traducción del único marco de lectura abierto da origen a una poliproteína que da lugar a tres proteínas estructurales (C, prM, E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) que solo se expresan en la célula hospedera durante la replicación viral activa (Halstead, 1980; Rice y col., 1985; Chambers y col., 1990; Schrader y Westaway, 1990; Lindenbach y col., 2007).

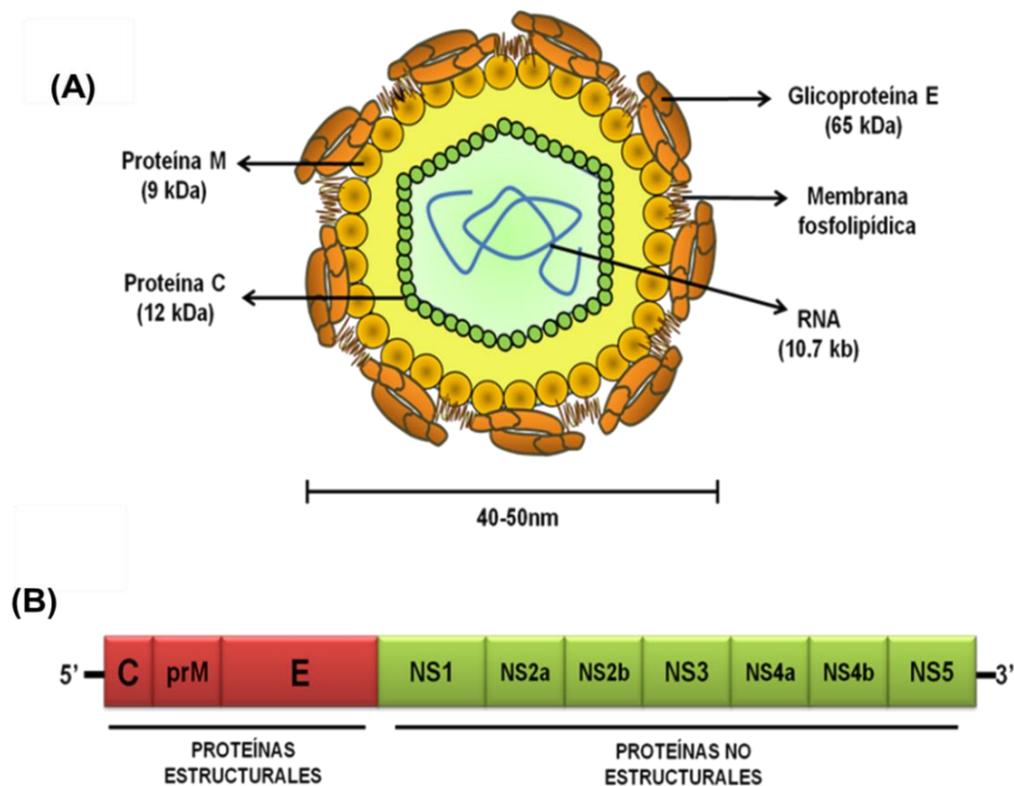


Figura 2. **Virus del dengue.** (A) Estructura de la partícula viral, (B) Genoma del virus. Cortesía de la M. en C. Karina Ruiz-Tovar.

1.3 Ciclo de replicación viral.

La partícula viral se une a su receptor en la célula blanco, el receptor mejor caracterizado es DC-SIGN (del inglés *dendritic-cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*) y es internalizada por un proceso de endocitosis mediado por el receptor. Durante esta fase, una disminución en el pH endosomal provoca cambios estructurales en la glicoproteína E viral promoviendo que los dímeros se disocien y formen trímeros que exponen el péptido de fusión, permitiendo la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal y la subsecuente liberación de la cápside y del RNA viral al citoplasma (Navarro-Sánchez y col., 2003; Modis y col., 2004; Mukhopadhyay y col., 2005; Fragnoud y col., 2012).

El RNA viral funciona como RNA mensajero, traduciéndose en una poliproteína que es procesada en el retículo endoplásmico por proteasas celulares y virales, para dar lugar a las proteínas estructurales y las proteínas no estructurales. Las proteínas no estructurales están principalmente relacionadas en los procesos de replicación del RNA viral como parte del complejo de replicación en el retículo endoplásmico (Chambers y col., 1990; Schrader y Westaway, 1990; Kapoor y col., 1995).

Durante la replicación se lleva a cabo la síntesis de una cadena de RNA viral de polaridad negativa (intermediario replicativo) que sirve como molde para producir nuevas cadenas de RNA viral de polaridad positiva (genoma viral). Durante este proceso se da la unión parcial de ambas cadenas generándose una forma replicativa. El genoma viral se une a la proteína de cápside formándose la nucleocápside, la cual se ensambla junto con las proteínas de prM y E, generando partículas virales inmaduras que son transportadas en vesículas hasta la red trans-Golgi, donde una enzima furina realiza un corte en la proteína prM generando una partícula viral madura que será liberada por exocitosis, según se aprecia en la figura 3 (Chambers y col., 1990; Rice, 1996; Stadler y col., 1997; Kuhn y col., 2002; Zhang y col., 2004; Yu y col., 2008; Zybert y col., 2008)

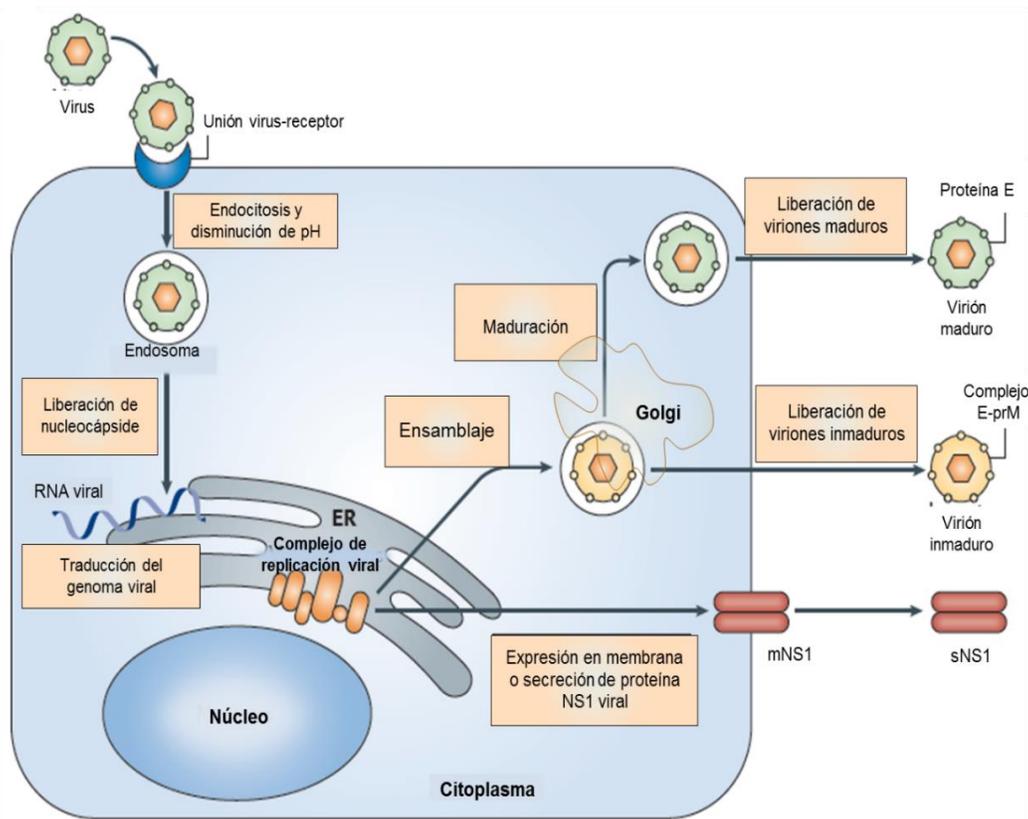


Figura 3. **Ciclo de replicación del virus dengue.** Modificado de Rothman, 2011.

1.4 La respuesta inmunológica durante la infección por el virus del dengue.

Los PRRs (del inglés *Pattern-recognition receptors*) son receptores codificados por línea germinal que reconocen PAMPs (del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*), entre sus funciones activan la expresión de proteínas del complejo MHC, activan moléculas coestimuladoras y mediadores inflamatorios en forma de citocinas y quimiocinas por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y otras células inmunes no profesionales (Akira y col., 2001; Janeway y Medzhitov, 2002; Pandey y col., 2015). Estos PRRs pertenecen a varias clases de familias según su estructura, estos receptores son TLR, RLR, NLR, CLR y los sensores citosólicos de DNA (Pandey y col., 2015).

En una infección viral se activa la respuesta inmune innata a través de los PRRs que reconocen componentes virales como el DNA genómico, el ssRNA, el dsRNA, RNA con 5´trifosfato y proteínas virales para generar una respuesta antiviral (Akira y col., 2006; Beutler y col., 2007; Medzhitov, 2007; Takeuchi y Akira, 2009).

En la infección con el DENV, particularmente los TLR-3, TLR-7, TLR- 8, los RLR, reconocen los diferentes tipos de RNA que se generan durante su ciclo de replicación.

El receptor TLR-3 actúa de manera notable en la inmunidad innata antiviral por su capacidad de producir citocinas inflamatorias, sin embargo tiene un papel clave en las vías de señalización para la producción de interferones, después de reconocer el dsRNA viral (Alexopoulou y col., 2001; Nasirudeen y col., 2011). Esto se ha observado en células HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) que producen IL-8 y secretan INF de tipo I (α/β) (Tsai y col., 2009). Los interferones secretados por las células infectadas activan vías de señalización intracelulares a través de sus receptores de interferones, que regulan la expresión genes inducibles de interferón. Estos genes inducen apoptosis en las células infectadas, aumentan la capacidad lítica en las células NK, inhiben la replicación viral y confirieren resistencia a la infección viral en las células no infectadas (Takeuchi y Akira, 2009; Kumar y col., 2011). Con respecto a los receptores TLR-7 y TLR-8 estos detectan el ssRNA durante la viremia liberando citocinas inflamatorias y también INF de tipo I (Tsai y col., 2009; Pandey y col., 2015).

Estos PRRs activan vías de señalización intracelulares para la molécula TRIF que induce vías para la activación del factor IRF (del inglés *Interferon Regulatory Factor*) para la producción de interferones tipo I o para la molécula MyD88 que activa vías para al factor NF- κ B para la producción de citocinas inflamatorias (figura 4). En el caso del factor NF- κ B, este se trasloca dentro del núcleo para la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12 además de generar pro-interleucina IL-1 e IL-18 las cuales culminan en las formas activas de IL-1 e IL-18 por acción del inflammasoma. Estas citocinas tienen un importante papel en la respuesta antiviral y en el reclutamiento de células inmunes en el sitio de la infección (Kawai y col., 1999; Alexopoulou y col.,

2001; Kaisho y col., 2001; Kawai y col., 2001; Medzhitov, 2001; Oshiumi y col., 2003; Akira y Takeda 2004; Edelmann y col., 2004; Honda y Taniguchi, 2006; Kawai y Akira, 2008; van de Veerdonk y Netea, 2013).

En la infección otra familia que participa son los receptores RLR que consta de tres miembros, RIG-I, MDA-5, LGP2, estos receptores reconocen el RNA viral en el citoplasma de las células infectadas (Kumar y col., 2009; Takeuchi y Akira, 2010; Wilkins y Gale, 2010). En particular en la infección por el DENV se ha observado que los receptores RIG-I y MDA-5 detecta al virus, previniendo al hospedador con la producción de citocinas inflamatorias e interferones de tipo I (Fredericksen y col., 2008; Loo y col., 2008; Nasirudeen y col., 2011).

Durante la infección viral para que las células T se activen, necesitan que le presenten péptidos en el contexto de las proteínas MHC a diferencia de las células B, las células T no reconocen viriones intactos. Estas células se diferencian a un perfil Th1 y entre sus funciones esta la proliferación, la lisis y la producción de una amplia gama de citocinas como $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-2, CCL-4, estableciendo un estado de protección (Mangada y Rothman, 2005; Bashyam y col., 2006; Dong y col., 2007; Rothman, 2011).

Los principales blancos de la respuesta inmune humoral en la infección con el DENV son la glicoproteína E, la prM, los anticuerpos producidos son específicos y tienen por función la neutralización durante la infección (Nybakken y col., 2005; Vogt y col., 2009; Rothman, 2011). La proteína NS1 viral puede encontrarse en la superficie de las células infectadas o puede liberarse como una molécula soluble y contra esta también se producen anticuerpos (Jacobs y col., 2000; Young y col., 2000; Libraty y col., 2002).

Por otra parte las proteínas del complemento se pueden unir a las partículas virales a través de anticuerpos específicos para la prM o la glicoproteína E, esto favorece la inhibición viral. En el caso de la proteína NS1 viral los anticuerpos se dirigen a la forma expresada en la membrana plasmática mediando la lisis a través de complemento, los anticuerpos específicos a la NS1 principiante contribuyen a la

ADCC (del inglés *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (Schlesinger y col., 1987; García y col., 2006; Mehlhop y col., 2007; Rothman y col., 2011).

1.5 Patogénesis de la enfermedad.

La patogénesis del dengue se ha considerado multifactorial, por lo que se han propuesto diferentes teorías al respecto:

- Inmunopatogénesis

El DENV es inoculado en la piel del hospedero a través de la probóscide de un mosquito infectado, de esta manera las células de Langerhans (células dendríticas inmaduras en la piel) reconocen e internalizan la partícula viral a través de su receptor DC-SIGN, estas células inmaduras migran del sitio de la infección hacia los ganglios linfáticos regionales para la presentación de antígenos virales a las células T, sin embargo el DENV es capaz de seguir replicando e infectar otras poblaciones celulares en ganglios, dando lugar a la diseminación de la infección por sistema sanguíneo y linfático afectando diferentes órganos y tejido (Wu y col., 2000; Jessie y col., 2004; Schneider y col., 2004).

La replicación del DENV en células dendríticas, monocitos, macrófagos y su tropismo por células endoteliales, células estromales de la médula ósea, células hepáticas, determinan una mayor carga viral en sangre (Martina y col., 2009). La gravedad de la enfermedad se correlaciona con una alta carga viral y la activación de un mayor número de células T, desencadena la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias (tormenta de citocinas) como son IL-1 β , IL-2, IL-6, IL8, IL-12, MIF y TNF- α , esta última se ha relacionado con el daño causado en el endotelio vascular y el aumento en la permeabilidad vascular lo que conduce a la fuga de plasma característico de las formas graves del dengue (Anderson y col., 1997; Pang y col., 2007; Martina y col., 2009).

- Infección facilitada por anticuerpos

Durante una primera infección por un serotipo determinado del DENV, en el hospedero se generan anticuerpos de memoria específicos contra este serotipo, sin embargo durante una infección secundaria con un serotipo viral-heterólogo, los anticuerpos de memoria adquiridos durante la primera infección, poseen una baja afinidad para neutralizar al nuevo serotipo infectante, formando complejos virus-anticuerpos que son reconocidos por diversas poblaciones celulares a través de receptores Fc γ R y al internalizar dichos complejos dentro de una vesícula endosomal, la disminución de pH favorece su disociación y liberación de la nucleocápside viral. De esta manera, tiene lugar la entrada de una mayor cantidad de partículas virales a las células y por lo tanto incrementa la carga viral, así como la respuesta inmune con una exacerbada producción de citocinas pro-inflamatorias que impactan principalmente a la integridad del endotelio vascular, dando origen a las formas hemorrágicas de la enfermedad (Guzmán y Kourí, 2003; Guzmán y col., 2010).

- Cepas más virulentas

Los serotipos del DENV se clasifican a su vez en diferentes genotipos, que se han asociado a diversos grados de virulencia. Por ejemplo, los genotipos de DENV-2 de origen asiático están más relacionados al desarrollo de formas graves del dengue que los genotipos americanos (Rico-Hesse, 1990; Sánchez y Ruiz 1996; Leitmeyer y col., 1999; Cologna y Rico-Hesse, 2003; Anderson y col., 2006; Ubol y col., 2008).

- Factores genéticos

Localizados en el brazo corto del cromosoma 6 humano se encuentra un grupo de aproximadamente 400 genes del MHC, en el que casi un tercio de los loci expresados están involucrados funcionalmente en las respuestas inmunes innatas y adquiridas a los microorganismos (Horton y col., 2004). El MHC codifica para

moléculas HLA de clase I (HLA-A, -B, -C) cuya función es presentar péptidos a las células CD8+ y también codifica para moléculas HLA de clase II (HLA-DR, -DQ, -DP) que presentan péptidos a las células CD4+, estas moléculas son las más polimórficas en el genoma humano (Parham, 2005; EBI/EMBL, 2008).

Los polimorfismo en las proteínas de clase I y II del MHC, TNF- α , LT- α , están relacionados con las formas graves del dengue observadas durante las infecciones secundarias. En distintas poblaciones y con diversa ubicación geográfica se encontró que algunos alelos en las proteínas MHC, están involucrados en el desarrollo de dengue grave. En pacientes tailandeses portadores de los alelos HLA-A*0203 y HLA-A*33 se ha observado un fenotipo protector, mientras que pacientes vietnamitas portadores de alelos HLA-A*0207 y HLA-A*24 estas variantes genéticas están implicadas para el desarrollo de formas graves (Chiewsilp y col., 1981; Loke y col., 2001; Stephens y col., 2002).

En individuos cubanos con infección de DENV se identificaron a los alelos HLA de clase I A*31 y B*15, tienen mayor susceptibilidad a desarrollar dengue grave comparados con alelos HLA de clase II DRB1*07 y DRB1*04 expresados por controles asintomáticos. Por otro lado en la población mexicana mestiza el alelo DRB1*04 es el más asociado a la resistencia a formas graves del dengue. Otros polimorfismos relacionados a las formas graves del dengue se han asociado al TGF- β , DC-SIGN, CTLA-4, receptores Fc γ R (La Fleur y col., 2002; Sierra y col., 2007; Bäck y Lundkvist, 2013; Martina y col., 2009).

1.6 Helmintos como inmunomoduladores.

Los helmintos han desarrollado diferentes estrategias para modular el sistema inmune del hospedador estos son la diferenciación de una respuesta tipo Th2, la generación de respuestas reguladoras con citocinas anti-inflamatorias como IL-10, TGF- β , la inducción de células T y B reguladoras y macrófagos alternamente activados (figura 5), estos mecanismos inmunomoduladores favorecen la supervivencia del parásito por largos periodos (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003; Hepworth y col., 2013).

Estos mecanismos reguladores se han propuesto como beneficiosos en el hospedador, ya que contribuyen en la disminución de algunas patologías relacionadas con respuestas de tipo Th1/Th17 (esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes tipo 1) o respuestas de tipo Th2 relacionadas con alergias que pueden estar presentes en el hospedador (figura 5) (Maizels y col., 2004; Harnett y col., 2013). En algunos estudios con helmintos como *Schistosoma mansoni*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichinella spiralis* la infección regula la respuesta Th2 exacerbada y se observa un menor daño patológico (Mangan y col., 2004; Wohlleben y col., 2004; Mangan y col., 2006; Pacífico y col., 2009; Park y col., 2011).

En un estudio Gruden-Movsesijan y col., 2010 observaron que en la coinfección con *T. spiralis* y la EAE (del inglés *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), trastorno inflamatorio desmielizante y neurogenerativo del SNC que asemeja a la esclerosis múltiple humana (Multiple Sclerosis, 2004), se observa que la infección con *T. spiralis* crea un entorno en el cual se inhibe la producción de IL-17, hay una menor producción de INF- γ y se activa una respuesta Th2 que produce citocinas como IL-4, IL-10 y TGF- β , favoreciendo un menor daño a nivel de SNC.

Durante la infección con el DENV se produce una cascada de citocinas inflamatorias las cuales tienen actividad sobre las células endoteliales vasculares las cuales son responsables del evento patológico que conduce a la fuga de líquidos (Pang y col., 2007). Los mecanismos que tienen los helmintos de regular la respuesta inmunológica del hospedador a través de una menor producción de citocinas pro-

inflamatorias y el incremento de citocinas anti-inflamatorias, podría tener efectos en la infección con el DENV que es un problema de salud pública.

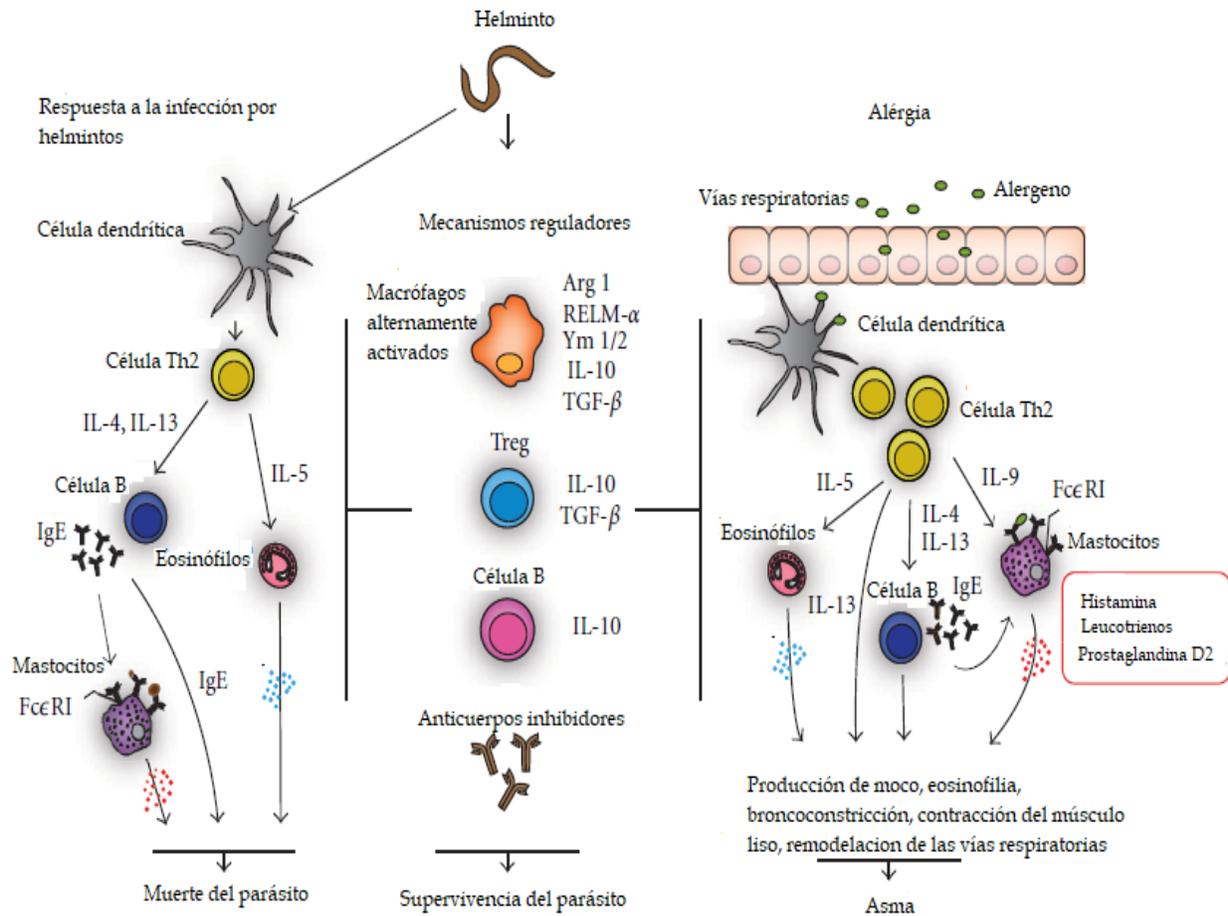


Figura 5. **Mecanismo de inmunomodulación de los helmintos.** Modificado de Danilowicz-Luebert y col., 2011.

1.7 Triquinelosis.

La triquinelosis es una zoonosis de origen alimenticio causada por el nematodo *Trichinella spiralis*, esta especie ha causado brotes importantes de la enfermedad en diferentes regiones del mundo incluyendo a México (tabla 2), que ha reportado casos de triquinelosis desde finales del siglo XIX en zonas de clima tropical y subtropical (figura 6) (Ortega-Pierres y col., 2000; Pozio y Murrell, 2006; Pozio, 2007; Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información 2018-Semana Epidemiológica 52).

En la infección con *T. spiralis* se presenta dos fases, una enteral en la cual el parásito altera la función intestinal con síntomas como diarrea, vomito, dolor abdominal, fiebre leve y una parenteral asociada a respuesta inflamatorias y alérgicas. Algunas características de la infección con el parásito incluyen, edema facial o periorbital, dolor muscular, mialgias, exantema maculopapular, fiebre elevada, anorexia, dolor de cabeza, conjuntivitis (Ferraccioli y col., 1988; Compton y col., 1993; Kociecka, 1993; Murrell y Bruschi, 1994; Capo y Despommier, 1996; Kociecka, 2000).

1.8 Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.

La totalidad del ciclo de vida de *T. spiralis* ocurre en un solo hospedador, quien se infecta al ingerir carne cruda o mal cocida y que contiene larvas musculares viables, las cuales son liberadas por acción de enzimas digestivas dentro del estómago (figura 7) y posteriormente migran e invaden el epitelio del intestino delgado, en donde se alojan hasta madurar y convertirse en gusanos adultos. Durante la etapa de reproducción, la hembra libera las larvas recién nacidas que se diseminan a través de sistema circulatorio (vasos sanguíneos y linfáticos) hasta llegar al músculo esquelético, alojándose en él y formando una estructura capsulada llamada “célula nodriza” compuesta por una pared de colágeno y una red capilar alrededor de la célula alterada donde se desarrollara a larva muscular. Esta célula nodriza forma un

complejo estable, permitiendo que la larva sobreviva en el hospedador durante largos periodos, sin embargo después de cierto tiempo llegan a calcificarse algunas células nodrizas. Esta etapa hipobiótica se mantiene hasta que la larva es ingerida por un nuevo hospedador (Despommier, 1983; Despommier, 1993; Jasmer, 1993; Pozio, 2007; Gottstein y col., 2009; Ilic y col., 2012).

Entidad federativa	No. de casos reportados por triquinelosis en 2018
Aguascalientes	-
Baja California	1
Baja California Sur	-
Campeche	-
Coahuila	-
Colima	-
Chiapas	2
Chihuahua	-
Ciudad de México	-
Durango	-
Guanajuato	-
Guerrero	2
Hidalgo	-
Jalisco	2
México	-
Michoacán	1
Morelos	-
Nayarit	-
Nuevo León	-
Oaxaca	3
Puebla	-
Querétaro	-
Quintana Roo	2
San Luis Potosí	-
Sinaloa	-
Sonora	1
Tabasco	-
Tamaulipas	-
Tlaxcala	-
Veracruz	-
Yucatán	-
Zacatecas	-

Tabla 2. **Número de casos notificados por entidad federativa por triquinelosis.** Modificado de Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información 2018-Semana Epidemiológica 52.

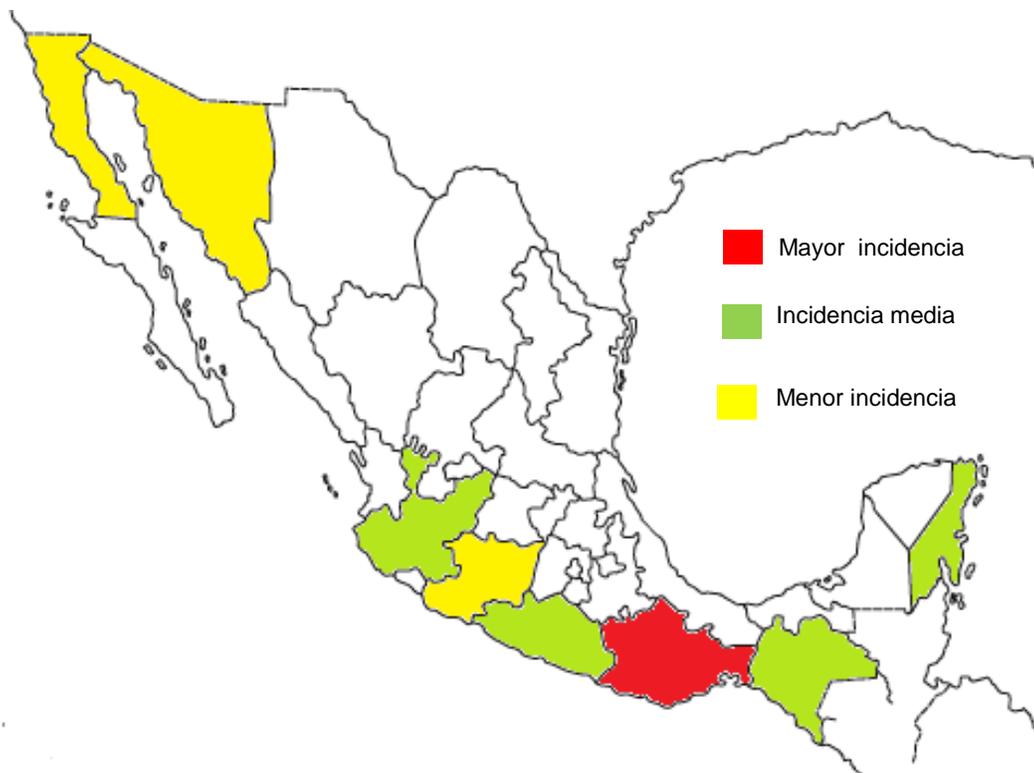


Figura 6. **Incidencia de casos notificados por triquinelosis en México 2018.** En rojo se señalan los estados que reportaron mayor incidencia; en verde se señalan los estados con incidencia media; en amarillo se señalan los estados con menor incidencia. Modificado de Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información 2018-Semana Epidemiológica 52.

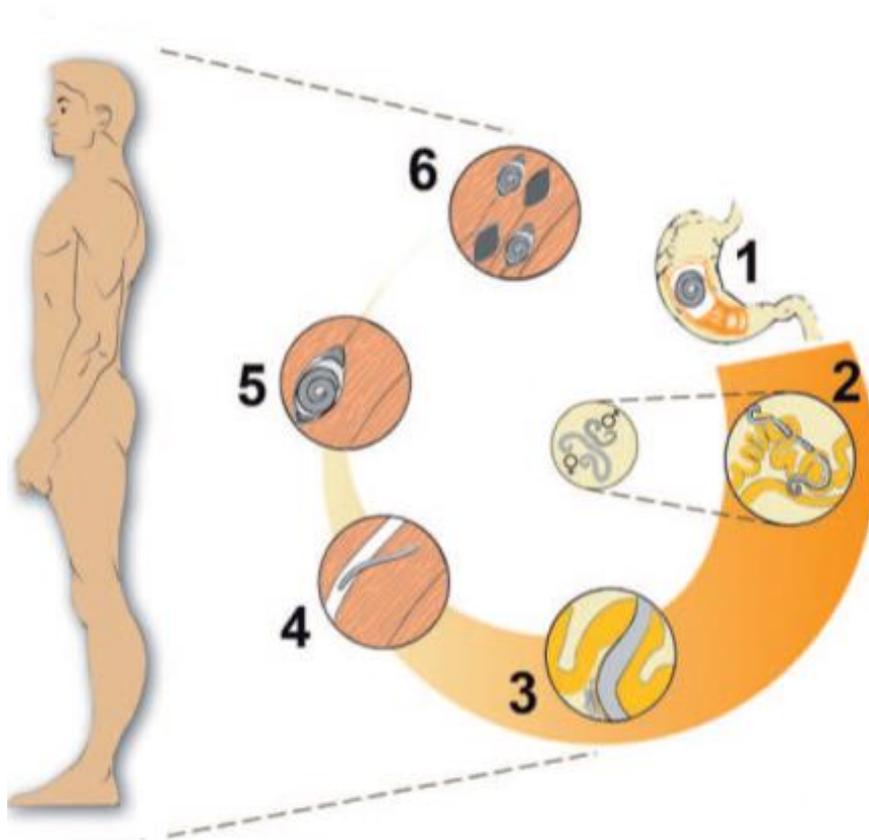


Figura 7. **Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.** (1) La larva muscular es liberada en el estómago del hospedador; (2) Invasión del epitelio intestinal y diferenciación sexual del parásito, maduración a gusanos adultos y copulación; (3) La hembra invade la lámina propia, donde tiene lugar el nacimiento de las larvas; (4) Las larvas recién nacidas se dispersan a través de la circulación y se alojan en músculo esquelético; (5) Formación de la célula nodriza; (6) Permanencia crónica de las células nodrizas y calcificación. Modificado de Gottstein y col., 2009.

1.9 Propiedades inmunomoduladoras de los antígenos de excreción-secreción de *T. spiralis* (ESTs).

La capacidad de *Trichinella spiralis* de regular el sistema inmune durante la fase muscular presenta un efecto benéfico en el hospedador, ya que activa mecanismos reguladores que pueden suprimir la respuesta inmune a auto-antígenos y alérgenos (Park y col., 2011; Ashour, 2013). Los antígenos ESTs se producen en el esticosoma de la larva muscular siendo los antígenos de mayor importancia y actividad biológica las proteínas de 43, 53 y 45 kDa, ya que se generan en mayores cantidades. Estas proteínas están glicosiladas con tivelosa (3,6-dideoxi-D-arabinohexosa) un fuerte epítipo inductor de la respuesta inmune (Despommier, 1983; Bolás-Fernández y Corral, 2006; Nagano y col., 2009).

Los antígenos de excreción-secreción son liberados en la circulación durante la fase crónica de la infección, dando origen a una comunicación entre el parásito y el hospedador, promoviendo la activación de una red reguladora a través de inducción de células T reguladoras y el incremento en la producción de citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β (Nagano y col., 2009; Gruden-Movsesijan y col., 2011; Bruschi y Chiumiento, 2012).

Los antígenos ESTs, influyen en la respuesta inmune a través de la interacción con células dendríticas. Estas células expuestas a los antígenos ESTs inducen células tolerogénicas que son responsables de desencadenar respuestas Th2 y anti-inflamatorias, acompañadas de la activación de células T reguladoras tanto *in vivo* como *in vitro* propiciando un ambiente inmunomodulador (Gruden-Movsesijan y col., 2011; Aranzamendi y col., 2012).

En el cultivo de macrófagos murinos estimulados con antígenos ESTs y estimulados con LPS, se suprimió significativamente la producción de citocinas inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12. También se ha observado que solo el estímulo con antígenos ESTs incrementa significativamente la producción de IL-10 y TGF- β . A partir de un análisis inmunocitoquímico se determinó que estos antígenos pueden inhibir que la molécula p65 se trasloque al núcleo y reducir las fosforilaciones de las vías ERK1/2 y p38, de esta manera la transducción de señales del factor NF- κ B y

MAPK están disminuidas y sustenta que haya una menor respuesta inflamatoria (Baeuerle y Baltimore, 1996; Bai y col., 2012).

Dada la distribución geográfica de los reportes de triquinosis en México, que coincide con la de la presencia de casos de dengue, no se puede descartar la probabilidad de que las infecciones por *T. spiralis* y DENV coexistan en un mismo hospedero y que los fenómenos patogénicos e inmunológicos desencadenados por cada una, pudieran interactuar a tal grado de impactar en la presentación clínica de alguna de las entidades clínicas resultantes.

2. JUSTIFICACIÓN

El dengue es una enfermedad febril que en sus formas graves compromete la vida del paciente, como consecuencia del aumento en la permeabilidad vascular que en algunos casos conduce a shock hipovolémico, siendo resultado de una respuesta inmune inflamatoria exacerbada. Existen diversas teorías al respecto: (a) el fenómeno de infección facilitada por anticuerpos; (b) cepas virales más virulentas y (c) la susceptibilidad genética del hospedero, en todos los casos promoviendo un incremento en la producción de moléculas pro-inflamatorias, sin embargo hasta el momento no se ha considerado la probable participación de factores derivados de coinfecciones en el desarrollo de formas graves del dengue.

Por otro lado se ha reportado que los antígenos ESTs son moléculas capaces de disminuir el perfil inflamatorio en diversos modelos experimentales, esto mediante el incremento de citocinas anti-inflamatorias, la diferenciación a un perfil Th2 y la inducción de células T reguladoras.

Considerando que el dengue y la triquinelosis comparten endemicidad en algunas regiones del país, en este trabajo se propone evaluar en un modelo *in vitro*, el efecto inmunomodulador de los antígenos ESTs sobre la infección de células mononucleares de sangre periférica humana con DENV y con esto sugerir si las coinfecciones favorecen el desarrollo de formas graves de la enfermedad o pueden prevenirlas.

3. HIPÓTESIS

Los antígenos ESTs disminuyen la producción de moléculas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α) durante la infección por DENV debido a sus propiedades anti-inflamatorias.

4. Objetivos

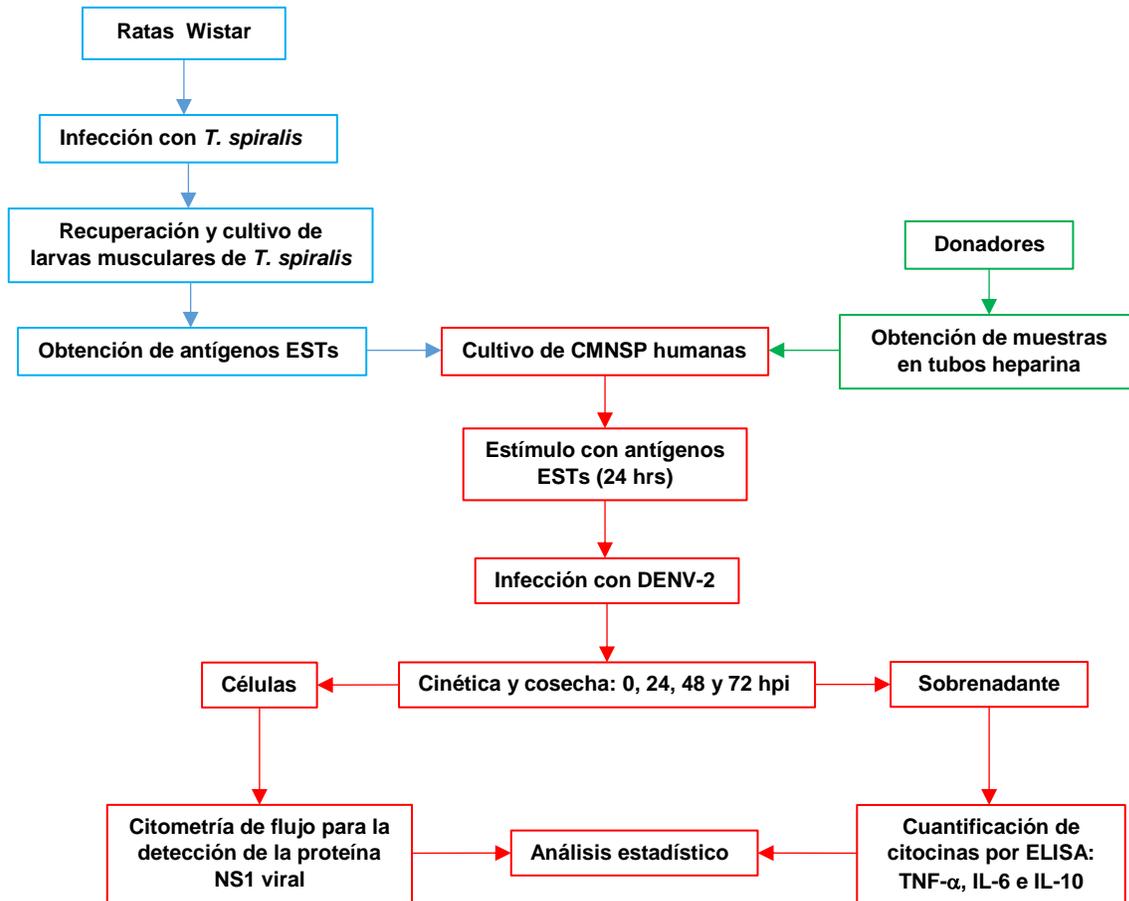
4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto modular de los antígenos ESTs sobre la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 durante la infección de células mononucleares de sangre periférica humana (CMNSP) con virus del dengue serotipo 2 (DENV-2) en un modelo *in vitro*.

4.2 Objetivos particulares

- I. Obtener antígenos ESTs mediante el cultivo *in vitro* de larvas musculares de *Trichinella spiralis*.
- II. Realizar una cinética de estímulo e infección con los antígenos ESTs y DENV-2, respectivamente en los cultivos primarios de CMNSP humanas.
- III. Cuantificar citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo.
- IV. Confirmar la infección por DENV-2 en las células cultivadas mediante la detección de la proteína NS1 viral por citometría de flujo.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Mantenimiento y propagación de *Trichinella spiralis* (MSUS/ME/92/CM-92).

Se infectaron trece ratas Wistar con una dosis de 25 larvas musculares de *Trichinella spiralis* (cepa MSUS/ME/92/CM-92) por gramo de peso mediante vía oral. Los animales se mantuvieron en el bioterio del InDRE, de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Transcurridos 45 días post-infección y para la recuperación de las larvas musculares de *T. spiralis* se realizó una eutanasia por sobredosis de anestésico (Zoletil® 50, Zapopan, Jalisco México) a las ratas.

6.2 Recuperación de larvas musculares por digestión enzimática.

Se obtuvo músculo esquelético, diafragma, lengua y maseteros y todos los tejidos fueron lavados con PBS 1x (solución amortiguadora de fosfatos 0.01M con NaCl 0.015M pH 7.2) para quitar el exceso de sangre en los tejidos, la grasa se retiró con tijeras de disección. Con el fin de confirmar la etapa de invasión muscular se practicó una triquinoscopía, se seccionó un fragmento de diafragma, el cual fue colocado entre dos portaobjetos y se observó con el objetivo de 40x en el microscopio óptico Olympus BX43 (programa Imagen-Pro Plus, cybernetics, versión 7.0). Una vez confirmada la presencia del parásito, el músculo esquelético se cortó en trozos de aproximadamente 0.5 cm³ y fueron colocados en una picadora plus (Moulinex), posteriormente el músculo triturado se pesó. Por cada gramo de músculo se colocaron en un matraz Erlenmeyer 10 mL de agua destilada, 0.1 mL de HCl concentrado y 0.1 g de pepsina de mucosa gástrica porcina (SIGMA, St. Louis, MO, USA) y se agregó poco a poco el músculo triturado. La mezcla se mantuvo en agitación constante a 37 °C durante 4 horas.

Posteriormente la mezcla se filtró a través de una gasa doble de pañalina y se depositó en embudos de separación y permaneció en reposo durante una hora para

que las larvas musculares sedimentaran en el fondo del embudo, para la recuperación de las larvas musculares se abrió la llave del embudo y éstas se recolectaron en tubos cónicos de 15 mL, nuevamente se dejaron sedimentar 5 min y se decantó la mayor cantidad posible del sobrenadante. Se realizaron cuatro lavados con PBS centrifugando a 2000 rpm durante 5 min. Para remover los restos de *detritus* de las larvas éstas se colocaron en un gradiente trifásico de dextrosa (Baker, Center Valley, PA, USA) en concentraciones de 80%, 40% y 20% y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Las larvas se recuperaron de la interfase de 40-20% y fueron depositadas en un tubo cónico de 15 mL con PBS, se realizaron dos lavados con PBS centrifugando a 2000 rpm durante 5 min. Las larvas musculares se colocaron en 10 mL en PBS y se realizó un conteo por triplicado, tomando alícuotas de 1 μ L que fueron colocadas en un portaobjetos, observando a un objetivo de 10x y se obtuvo un promedio del número de larvas recuperadas, las cuales se lavaron dos veces con 5 mL de PBS estéril con el 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (Gibco, Carisbad, CA, USA) centrifugando a 2000 rpm durante 5 min. Posteriormente se realizaron tres lavados con medio RPMI-1640 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) estéril adicionado con 1% de antibiótico y se resuspendieron en el mismo medio, en una botella de cultivo de 25 cm² y bajo el siguiente razonamiento: por cada 10,000 larvas musculares se agregaron 200 μ L de medio de cultivo.

6.3 Cosecha y cuantificación de los antígenos ESTs.

El sobrenadante fue cosechado cada 24 horas y fue sustituido por medio RPMI-1640 fresco entre cada cosecha esto durante cuatro días, al final de la última colecta se adicionó medio que se cosecho hasta las 72 horas para obtener un antígeno somático, los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Para tener un antígeno ESTs con una mayor concentración los sobrenadantes de los dos primeros días se mezclaron, llamando a este lote 1 al cual se le adicionó el inhibidor enzimático Complete mini (Roche, Indianápolis, In, USA). Los sobrenadantes del tercer y cuarto día, así como el antígeno somático se designaron

lote 2, lote 3 y somático respectivamente y se les adicionó el mismo inhibidor enzimático. La concentración de proteínas en cada lote obtenido se determinó por la técnica de Lowry descrita en el manual de Inmunología en Salud Pública (2014).

6.4 Identificación de productos ESTs.

Para identificar y evaluar la integridad de las proteínas contenidas en los antígenos ESTs, se tomó una muestra con 20 µg de antígeno de los diferentes lotes, lote 1, lote 2, lote 3, somático y se diluyó a una relación 1:1 v/v con una solución reguladora de muestra (SDS 10% 1mL; EDTA 7.4 mg; glicerina 1 mL; Tris HCl 2M pH 6.8, 0.250 mL; azul de bromofenol 10 mg y se aforó a un volumen final de 10 mL con agua destilada) y se adicionaron 100 µL de 2-beta-mercaptoetanol. Las muestras se calentaron a ebullición en baño maría durante 5 minutos.

Las muestras y el marcador de peso molecular (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) se corrieron en un gel preparativo de SDS-PAGE al 12%, por el método descrito por de-la-Rosa-Arana (2012) en una cámara Mini Protean (Bio-Rad) a 200 volts durante 1 hora. Posteriormente, el gel fue teñido con Azul de Coomassie al 0.06% durante 2 horas en agitación constante. Para eliminar el exceso de colorante del gel, se usó una solución decolorante de metanol absoluto-ácido acético glacial-agua destilada, hasta observar la presencia de bandas con pesos aproximados a los antígenos ESTs, tomando como referencia los pesos de las bandas del marcador de peso molecular.

6.5 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP).

Se obtuvieron aproximadamente 30 mL de sangre periférica de diferentes donadores sanos en tubos Vacutainer® con heparina de litio (BD, Franklin, NJ, USA). En condiciones de esterilidad, la sangre fue diluida 1:2 con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% de vitaminas, 1% de L-glutamina (Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibióticos penicilina-estreptomicina. Las

CMNSP se purificaron por un gradiente de densidad con Ficoll-Hipaque (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 min y el anillo de la interfase de las CMNSP fue transferido a un nuevo tubo y se realizaron dos lavados con 5 mL de medio RPMI-1640 suplementado, el botón de células se resuspendió en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado, se tomó una alícuota de 10 μ L y se diluyó con 90 μ L de azul tripán al 0.4% esta suspensión se homogenizó y se tomaron 10 μ L para cargar la cámara de Neubauer y realizar el conteo celular en el microscopio.

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{(número de células contadas)} (10000) \text{ (factor de dilución)}}{\text{número de cuadrantes}}$$

$$\text{Viabilidad celular\%} = \frac{\text{número de células vivas totales}}{\text{número de células totales (células vivas + células muertas)}}$$

6.6 Cinética de estímulo con antígenos ESTs e infección con DENV-2.

Se cultivaron 5×10^5 células/pozo en placas de cultivo de 48 pozos (Corning, New York, USA) estableciendo sistemas de células sin estímulo; células infectadas con DENV-2 (ATCC Nueva Guinea) a una MOI (del inglés *Multiplicity of infection*) de 1; células estimuladas con los antígenos ESTs (10 μ L); células estimuladas con antígenos ESTs (10 μ L) e infectadas a una MOI de 1 con DENV-2 en cada placa. Una vez colocados los antígenos ESTs, las células se incubaron a 37 °C con 95% de humedad y atmósfera parcial de CO₂ (5%) durante 24 horas, posteriormente y a los sistemas que aplicaba, los cultivos se inocularon con DENV-2 a una MOI de 1, se incubó durante 1 h a 37 °C a partir de ese momento se consideró como inicio de la cinética de infección (tiempo 0). Los sistemas se cosecharon a las 0, 24, 48 y 72

horas post-infección y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, los sobrenadantes se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

6.7 Cuantificación de TNF- α , IL-6 e IL-10 por ELISA.

Para determinar la concentración de TNF- α , IL6 e IL-10 en el sobrenadante de los cultivos se empleó el estuche comercial Duo Set® ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) y el procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se sensibilizaron microplacas de 96 pozos para ELISA (Corning, New York, USA) con 100 μ L/pozo de un anticuerpo de captura de anti-TNF- α , anti-IL-6 o anti-IL-10 a una concentración de 4.00 μ g/mL, 2.00 μ g/mL, 2.00 μ g/mL respectivamente y se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche. Se eliminó el contenido y las placas se lavaron tres veces con solución amortiguadora de lavado (Tween 20 al 0.05% en PBS) en un lavador de microplacas Wellwash (Thermo Scientific), posteriormente las placas se bloquearon con 300 μ L/pozo de albúmina sérica bovina al 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, se decantó el contenido y se realizaron tres lavados con solución amortiguadora de lavado. Para la generación de la curva estándar se realizaron diluciones dobles seriadas de los estándares de TNF- α (15.6 pg/mL a 1000 pg/mL), IL-6 (9.38 pg/mL a 600 pg/mL) e IL-10 (31.3 pg/mL a 2000 pg/mL) recombinantes y se adicionaron 100 μ L/pozo de cada estándar y de los sobrenadantes del cultivo, las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, se eliminó su contenido y se lavaron tres veces con solución amortiguadora de lavado. A continuación se añadieron 100 μ L/pozo del anticuerpo de detección anti-TNF- α , anti-IL-6 o anti-IL-10 conjugados a biotina, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y se eliminó el contenido para realizar tres veces lavados con solución amortiguadora de lavado. Después se adicionaron 100 μ L/pozo de estreptavidina-HRP y se incubaron las placas durante 20 min a temperatura ambiente protegidas de la luz, se eliminó el contenido y se lavaron tres veces con solución amortiguadora de lavado. Se añadieron 100 μ L/pozo de 3,3', 5,5' Tetrametilbenzidina (Sigma, St. Louis, MO, USA) y las placas se incubaron

durante 20 min a temperatura ambiente protegiéndolas de la luz y finalmente a cada pozo se le adicionaron 50 µL de H₂SO₄ 2N para detener la reacción. Las placas se leyeron dentro de los 15 min posteriores en un lector de microplacas EPOCH usando el programa Gen5 versión 2005 a una longitud de onda de 450 nm.

6.8 Detección de la proteína NS1 del DENV-2 por citometría de flujo.

Se cosecharon células correspondientes a 48 horas posteriores al estímulo e infección con antígenos ESTs y DENV, respectivamente y sin estímulo. Estas se lavaron y se permeabilizaron con 1 mL de solución FACS™ *permeabilizing solution* 2 (Biosciences, San José, CA, USA) de acuerdo a la indicaciones del fabricante, se lavaron con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, el botón celular se resuspendió en el sobrenadante remanente y se adicionaron 5 µL de anticuerpo anti-NS1 (Mouse mAb to Dengue Ns1 glycoprotein [DN3], ab 41616, abcam) y se realizó una incubación durante 20 min a 37 °C, se realizó un lavado con PBS a 1500 rpm durante 5 min. Posteriormente, al botón celular se le adicionó 1 µL de anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Percp y se incubó durante 20 min en oscuridad a 37 °C, nuevamente se realizó un lavado con PBS a 1500 rpm durante 5 min y el botón celular se resuspendió en 700 µL de solución fijadora de paraformaldehído al 1%. La lectura de las células se realizó en un citómetro de flujo Attune™N_xT (Thermo Fisher).

6.9 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se analizaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney con el programa estadístico GraphPad Prism® versión 5.00 (2007).

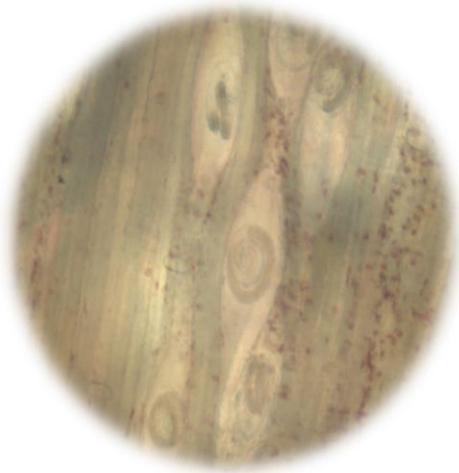
Los datos obtenidos de citometría se analizaron en el programa Kaluza Analysis versión 1.5a (2009-2016) Beckmann-Coulter, Inc.

7. Resultados

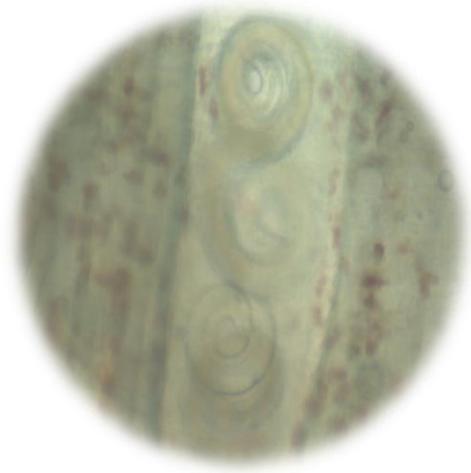
7.1 Obtención de antígenos ESTs.

La primera etapa para realizar este proyecto fue la infección de trece ratas Wistar con larvas musculares de *T. spiralis*, transcurridos 45 días post-infección se sacrificaron las ratas a partir de las cuales se obtuvieron músculo esquelético, diafragma, lengua y maseteros. Para observar la fase de invasión muscular se practicó una triquinoscopia, observándose la presencia de larvas musculares en su célula nodriza (figura 8). La liberación y obtención de larvas musculares a partir del tejido infectado se realizó mediante el método de digestión enzimática (figura 9) recuperando 1, 527,000 larvas para su posterior cultivo. Las larvas musculares fueron cultivadas y el sobrenadante que contenía los antígenos ESTs se recolectó cada 24 horas durante cuatro días consecutivos y por último se realizó un antígeno somático.

El sobrenadante de las dos primeras cosechas de mezcló para tener un antígeno ESTs con un mayor concentración denominado a este lote 1. Con la técnica de Lowry se determinó su concentración que fue 1.217 mg/mL (tabla 3). Para verificar la identidad e integridad de las moléculas correspondientes a los antígenos, el sobrenadante recolectado se analizó por SDS-PAGE buscando la presencia de las glicoproteínas de 43, 53 y 45 kDa que son las más representativas de los antígenos ESTs (Nagano y col., 2009). En el gel se observaron tres bandas con pesos aproximados a 41, 50 y 58 kDa lo cual indica que se obtuvieron antígenos ESTs (figura 10) (Radovic y col., 2012). El lote 1 se empleó para estimular las CMNSP al tener la mayor concentración de antígenos ESTs.



(A)

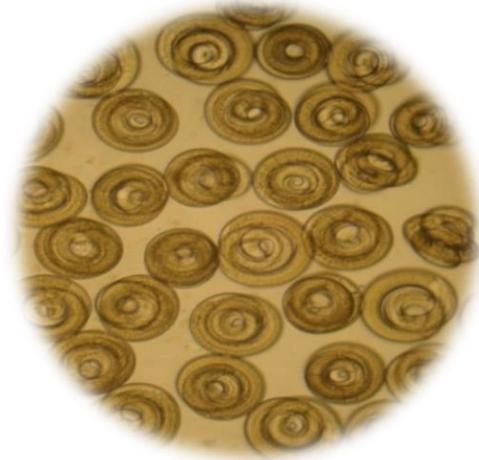


(B)

Figura 8. **Triquinoscopia en diafragma de rata infectada.** (A) Larvas musculares en célula nodriza individuales observadas a un aumento 40x, (B) Tres larvas musculares parasitando una sola célula nodriza observadas a un aumento 100x. Las fotografías son representativas de dos animales diferentes.



(C)



(D)

Figura 9. **Obtención de larvas musculares.** (C) Tras el proceso de digestión enzimática del tejido infectado, las larvas se separaron por sedimentación (botón rosa), (D) Cultivo de larvas musculares de *T. spiralis*.

Lote de antígeno ESTs	Concentración de antígeno (mg/mL)
1	1.217
2	1.070
3	0.90512
Somático	2.018

Tabla 3. **Concentración de antígeno ESTs.** Se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina al 0.02%, $r^2=0.9800$.

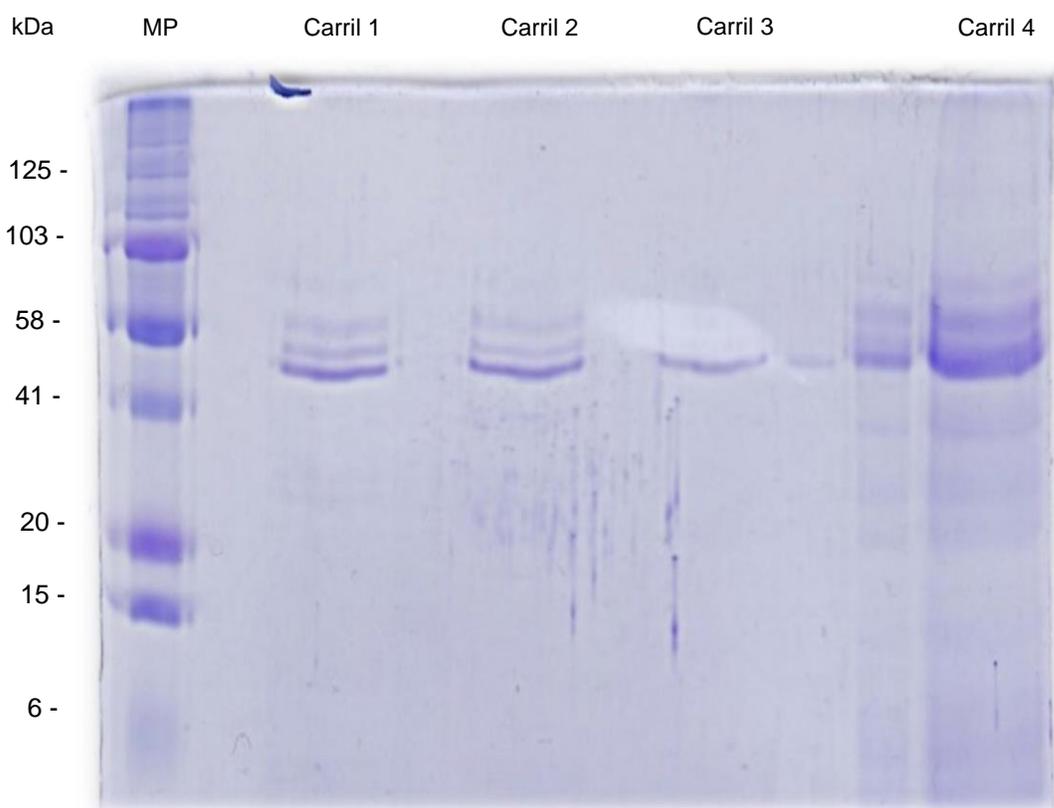


Figura 10. **Identificación de los antígenos ESTs.** Por SDS-PAGE se observa la presencia de tres bandas en los carriles 1, 2 y 3 con pesos aproximados de 41, 50, 58 kDa que corresponden a los antígenos ESTs. El carril 4 corresponde al antígeno somático, que evidencia las tres bandas de los antígenos ESTs y otras proteínas constitutivas con diferentes pesos moleculares. MP, Marcador de peso molecular; Carril 1, lote 1 antígeno ESTs; Carril 2, lote 2 antígeno ESTs; Carril 3, lote 3 antígeno ESTs; Carril 4, antígeno somático.

7.2 Cuantificación de citocinas en CMNSP estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV.

Se establecieron cultivos de CMNSP obtenidas a partir de sangre periférica de donadores sanos con una viabilidad mayor al 95%.

Tras el estímulo e infección con antígenos ESTs y DENV-2, respectivamente se cosechó el sobrenadante de las células en cultivo a las 0, 24, 48, 72 hpi, en el cual se cuantificaron los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-10 por ELISA.

Para el caso de la IL-6, a las 24 hpi se observa un aumento significativo en la concentración de esta citocina tanto en las células que fueron infectadas con DENV-2 como en las que fueron estimuladas con los antígenos ESTs e infectadas con DENV-2, con respecto a las que fueron solo estimuladas con ESTs ($p \leq 0.05$) y a las células sin estímulo ($p \leq 0.0001$) a ese mismo tiempo, así como también con respecto al inicio de la cinética ($p \leq 0.0001$) pero sin presentar diferencia entre ellos. Cabe señalar que este patrón se mantuvo durante las 48 y 72 hpi y no se observó ningún cambio significativo entre la concentración de IL-6 producida por las células estimuladas con ESTs y la producida por las células sin estímulo, ni con respecto a las 0 hpi (figura 11).

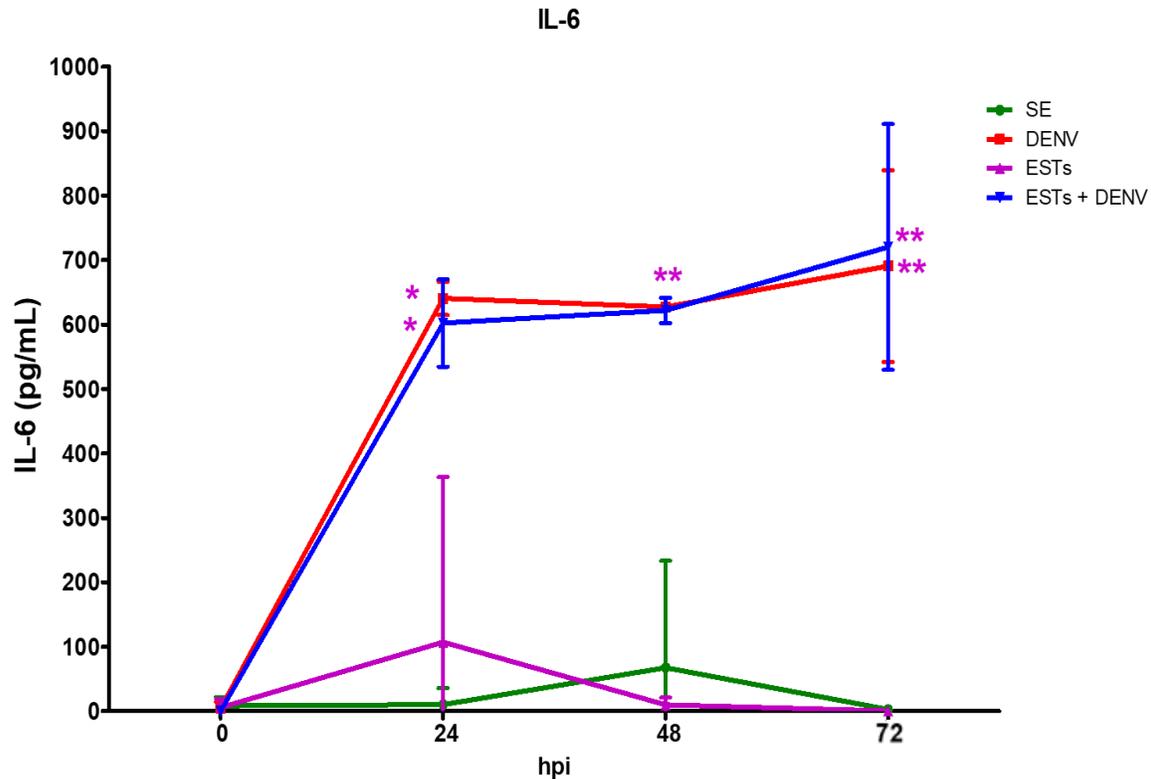


Figura 11. **Cinética de cuantificación de IL-6 en sobrenadante de cultivo de CMNSP estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV-2.** Se representa el promedio y la desviación estándar de seis experimentos independientes. Los sobrenadantes se cosecharon a las 0, 24, 48 y 72 hpi y la concentración de citocinas se determinó por ELISA. El análisis de datos se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.005$ *** $p \leq 0.001$. ■ SE, células sin estímulo; ■ DENV, células infectadas con virus dengue; ■ ESTs, células estimuladas con antígenos ESTs; ■ ESTs + DENV, células estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con virus dengue.

Así mismo, es evidente pero no estadísticamente significativo un incremento de la concentración de TNF- α en el sobrenadante de las células estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV-2, con respecto a las células solamente infectadas con DENV-2, pero si con respecto a las células estimuladas con antígenos ESTs y a las células sin estímulo ($p \leq 0.05$). Conforme transcurre la cinética se observa un incremento en la producción de TNF- α a las 48 hpi, que disminuye

considerablemente a las 72 hpi, aunque permaneciendo con una concentración mayor en las células estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV-2 que en las células solo infectadas con DENV-2. Igualmente, no se observó cambio en la concentración del TNF- α producido por las células estimuladas con ESTs y por las células sin estímulo, ni de estas con respecto a las 0 hpi (figura 12).

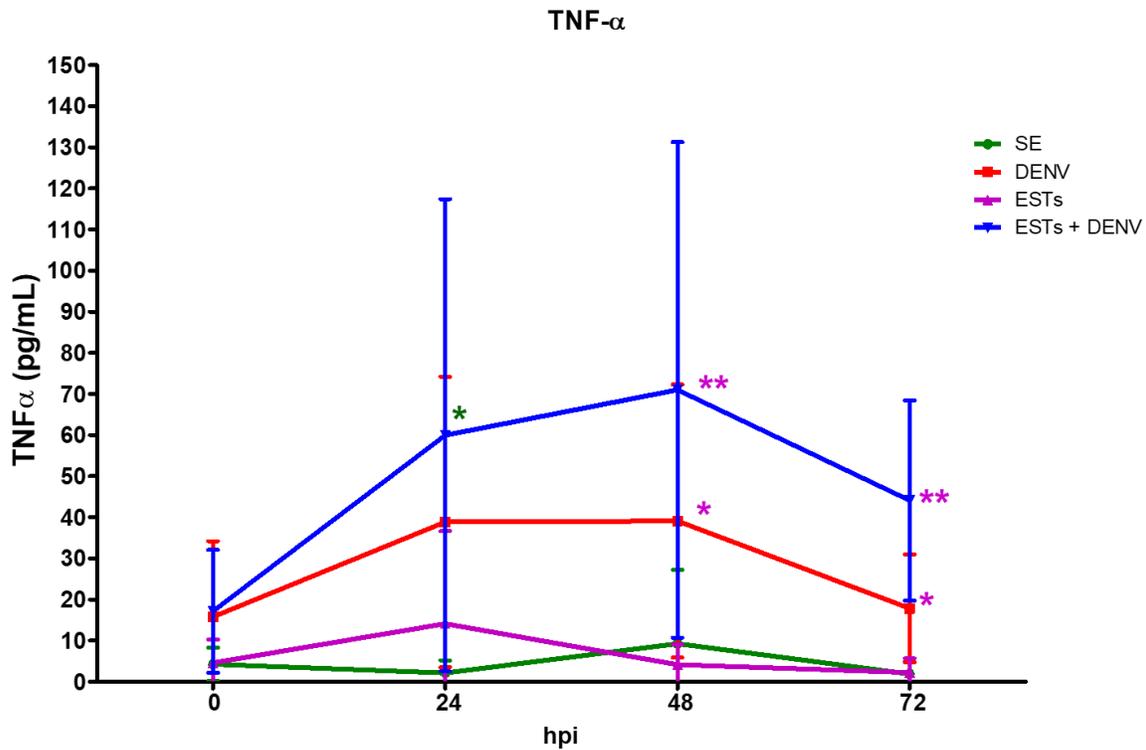


Figura 12. **Cinética de cuantificación de TNF- α en sobrenadante de cultivo de CMNSP estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV-2.** Se representa el promedio y la desviación estándar de seis experimentos independientes. Los sobrenadantes se cosecharon a las 0, 24, 48 y 72 hpi y la concentración de citocinas se determinó por ELISA. El análisis de datos se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.005$ *** $p \leq 0.001$. ■ SE, células sin estímulo; ■ DENV, células infectadas con virus dengue; ■ ESTs, células estimuladas con antígenos ESTs; ■ ESTs + DENV, células estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con virus dengue.

El patrón de producción de IL-10 es similar a lo que se observó para el caso de TNF- α . En los tiempos 24 y 48 hpi, en el sistema de coinfección (estimuladas con antígenos ESTs y DENV-2) se ve incrementada la producción de IL-10 con respecto a las células solo infectadas con el DENV-2, aunque la diferencia no es significativa. Sin embargo, en este caso pareciera que a las 72 hpi en el sistema de coinfección disminuye la producción de IL-10. Sin embargo, las células solo estimuladas con los antígenos ESTs pareciera que la concentración de IL-10 comienza a registrar un incremento a las 72 hpi, con respecto a las células no estimuladas (figura 13).

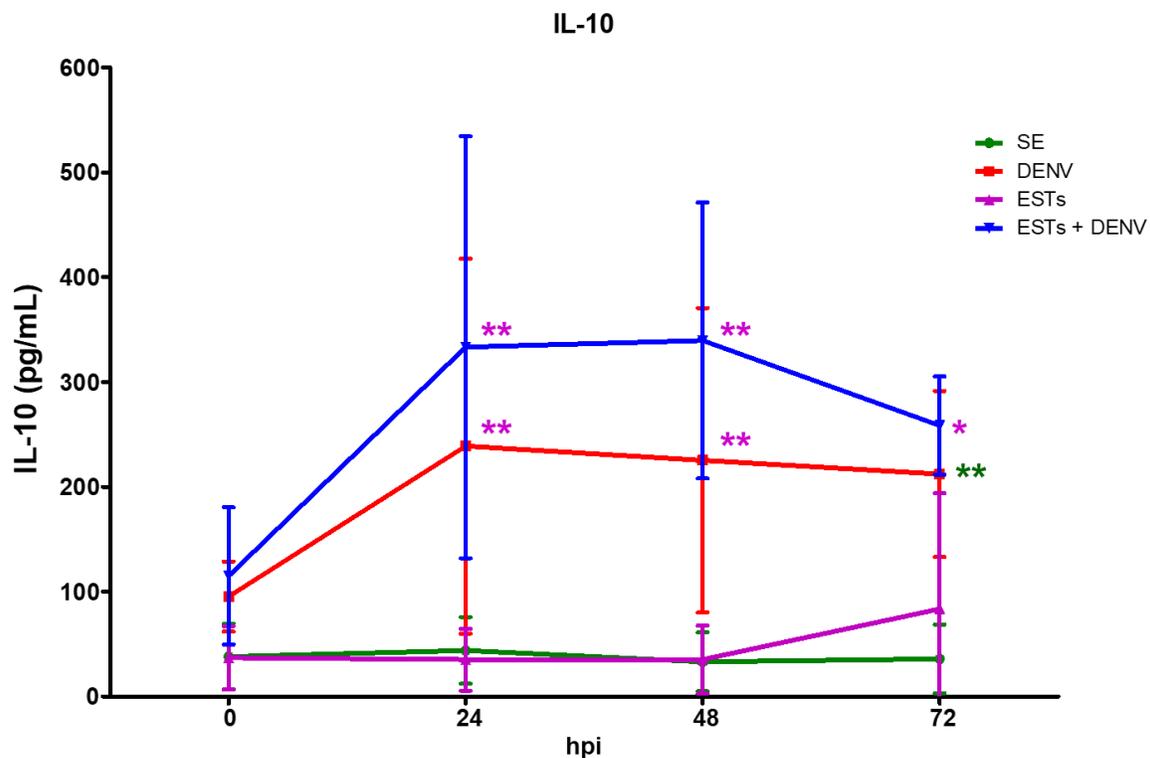


Figura 13. Cinética de cuantificación de IL-10 en sobrenadante de cultivo de CMNSP estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV-2. Se representa el promedio y la desviación estándar de seis experimentos independientes. Los sobrenadantes se cosecharon a las 0, 24, 48 y 72 hpi y la concentración de citocinas se determinó por ELISA. El análisis de datos se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.005$ *** $p \leq 0.001$. ■ SE, células sin estímulo; ■ DENV, células infectadas con virus dengue; ■ ESTs, células estimuladas con antígenos ESTs; ■ ESTs + DENV, células estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con virus dengue.

7.3 Citometría de flujo para la expresión de la proteína NS1 viral.

Se utilizaron CMNSP que se cosecharon a las 48 hpi, estas fueron marcadas con un anticuerpo anti-NS1 y posteriormente se acoplaron a un segundo anticuerpo anti-Percp. Nuestros resultados muestran la expresión de la proteína NS1 viral en las células infectadas con el DENV y en las células coinfectadas (estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con DENV) presentando un 13.39% y 11.83% respectivamente de replicación viral activa con respecto a las células sin estímulo. Las células positivas a la expresión de la proteína NS1 viral sólo se usaron para verificar la infección. Las células solo estimuladas con los antígenos ESTs son negativas a la expresión de la proteína NS1 viral con respecto a las células no estimuladas.

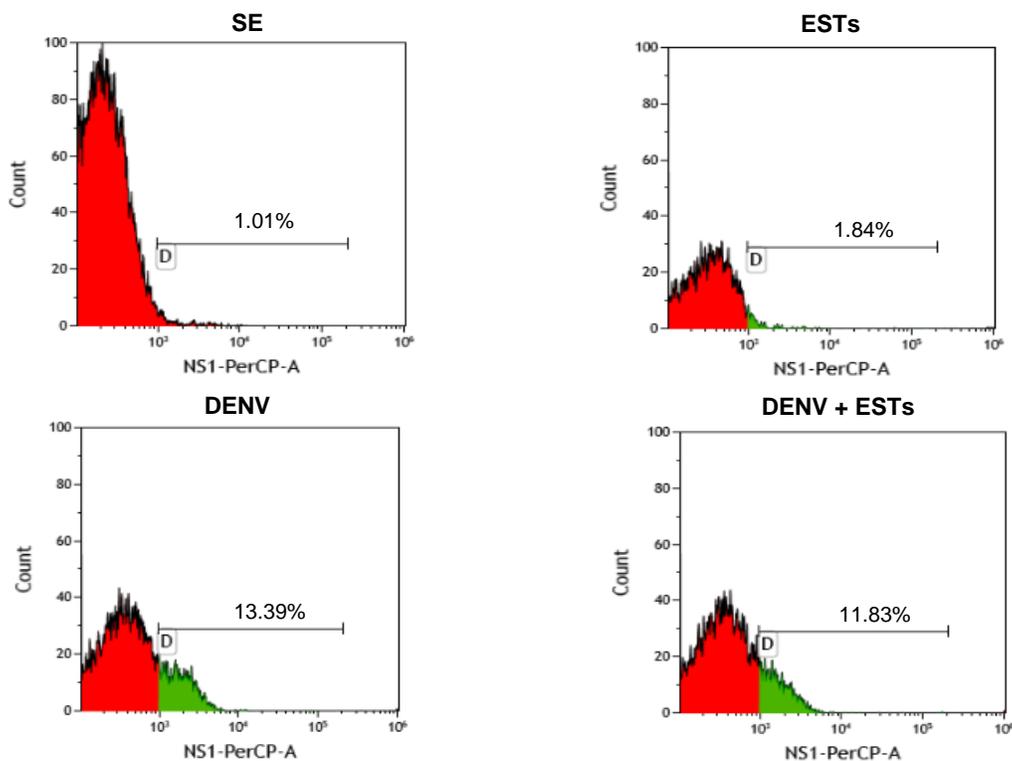


Figura 14. **Expresión de la proteína NS1 viral en CMNSP infectadas con DENV.** Los gráficos muestran la fluorescencia presente en CMNSP que se cosecharon a las 48 hpi. ■ Células NS1 negativas; ■ Células NS1 positivas (replicación viral activa). SE: células sin estímulo; DENV, células infectadas con virus dengue; ESTs, células estimuladas con antígenos ESTs; ESTs + DENV, células estimuladas con antígenos ESTs e infectadas con virus dengue.

8. DISCUSIÓN

El cuadro clínico más común del dengue (fiebre, mialgias, artralgias, cefaleas, rash) es el resultado de una respuesta inflamatoria exacerbada la cual promueve el desarrollo de las formas graves de la enfermedad (hemorragias y choque hipovolémico). Hasta el momento los factores implicados en la patogenia del dengue no se han dilucidado por completo por lo que se han propuesto diferentes teorías, cepas más virulentas, susceptibilidad genética del hospedador, infección facilitada por anticuerpos. Sin embargo no se han considerado la probable participación de factores derivados de coinfecciones en la progresión de la enfermedad.

En ciertos modelos experimentales se ha observado que el estímulo con antígenos ESTs favorece la capacidad de inducir respuestas de tipo Th2, T reguladoras con el aumento de factores anti-inflamatorios que ejercen su efecto al inhibir respuestas inflamatorias de tipo Th1 y Th17 (Park y col., 2011; Cho y col., 2012; Aranzamendi y col., 2012; Ilic y col., 2012; Yu y col., 2013; Du y col., 2014; Cvetkovic y col., 2016).

Debido a que el dengue y la triquinelosis comparten cierta endemidad y que los antígenos ESTs tienen la capacidad de regular la respuesta inmune, en este trabajo se planteó evaluar el efecto de los antígenos ESTs sobre la producción de las citocinas inflamatorias TNF- α y IL-6 y de la citocina anti-inflamatoria IL-10 durante la infección por el virus dengue en un modelo *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica humana.

La primera fase para realizar este proyecto fue la infección de ratas Wistar con larvas musculares de *Trichinella spiralis*, concluida la fase de invasión muscular del parásito se procedió al sacrificio de las ratas. Las larvas musculares se recuperaron por el método de digestión enzimática estas larvas fueron cultivadas y el sobrenadante se cosechó cada 24 horas, obteniendo 3 lotes de antígenos ESTs y un antígeno somático. El lote 1 tuvo la mayor concentración 1.217 mg/mL de antígeno ESTs al ser la mezcla de las dos primeras cosechas. Los antígenos ESTs son proteínas con pesos de 43, 53 y 45 kDa (Wu y col., 1999; Dea-Ayuela y Bolás-Fernández, 2000; Nagano y col., 2009) para identificar y ver la integridad de estas proteínas se preparó un gel SDS-PAGE observando la presencia de tres bandas

con pesos aproximados de 41, 50, 58 kDa, nuestros resultados concuerdan a los obtenidos por Radovic y col., 2012 y por Bien y col., 2013 de sus inmunotransferencias con sueros de animales y humanos infectados con *T. spiralis* que reaccionaron evidenciando bandas con pesos aproximados de 40, 41, 43, 45, 49, 53, 59 kDa descritas como antígenos ESTs.

La segunda fase del proyecto fue la obtención de monocitos y linfocitos de sangre periférica de diferentes donadores sanos como las células blancas del virus (Halstead, 1988). Los sistemas de trabajo que se establecieron fueron los siguientes: células sin estímulo; células infectadas con el serotipo DENV-2; células estimuladas con los antígenos ESTs; células coinfectadas, posteriormente se realizó la cinética de estímulo con los antígenos ESTs e infección con el DENV.

Nuestros resultados muestran que la IL-6 está aumentada en las células coinfectadas como en las células infectadas con el DENV a las 24 hpi, este incremento es significativo con respecto a las células solo estimuladas con los antígenos ESTs, este efecto se mantiene constante en los tiempos 48 y 72 hpi. Esta citocina induce la síntesis de prostaglandinas E2 en el hipotálamo produciendo fiebre, una característica del dengue es su repentino y abrupto inicio de cuadros febriles también se ha asociado esta citocina con el incremento en la permeabilidad vascular (Kishimoto y col., 1992; Maruo y col., 1992; Butthep y col., 2012).

Con respecto a nuestro resultado de TNF- α se observa que está aumentado en las células coinfectadas a las 48 hpi con respecto a las células solo infectadas con el DENV, aunque no es estadísticamente significativo. Sin embargo a las 72 hpi inicio una disminución de la citocina en ambos sistemas. Una característica de las formas graves del dengue es la pérdida de plasma originado por la actividad de TNF- α sobre las células del endotelio que contribuyen al aumento de la permeabilidad vascular que lleva a hemorragias, choque hipovolémico y dengue grave (Kurane y Ennis, 1994; Anderson y col., 1997; Azeredo y col., 2001).

Durante la infección con el DENV se activan dos vías la vía del factor NF- κ B y la vía MAPK para la producción de citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12p40),

cuando hay una mayor producción de estas lleva a una tormenta de citocinas que contribuyen a un daño patológico (Kawai y col., 1999; Kaisho y col., 2001; Kawai y col., 2001; Akira y col., 2004; Pang y col., 2007; Martina y col., 2009; Levy y col., 2010).

Radovic y col., 2015 describió el efecto inmunomodulador de los antígenos ESTs a través de respuestas de tipo Th2 y T reguladoras que regulan respuestas de tipo Th1/Th17 en un modelo de EAE (del inglés *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), la disminución en la producción de citocinas inflamatorias es debido a la producción de IL-10 y a su efecto sobre la respuesta inflamatoria, Gruden-Movsesijan y col., 2010 soporta esta idea que los antígenos ESTs son fuertes inductores de IL-10. En otro estudio Bai y col., 2011 observó que el estímulo con antígenos ESTs en macrófagos murinos, incrementa la producción de IL-10 y TGF- β y disminuye la respuesta a TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 en respuesta a LPS.

El efecto anti-inflamatorio derivado de las moléculas de los helmintos que contrarresta la respuesta Th1 es a partir de la subversión de la vía MAPK y el factor NF- κ B que resulta en células presentadoras de antígeno de un fenotipo inmaduro, que producen bajos niveles de citocinas inflamatorias (Harnett y Harnett, 2010). Por ejemplo los antígenos de excreción-secreción de *Schistosoma* la molécula LNFPIII y por otra parte la molécula ES-62 de *Acanthocheilonema viteae* estimulan la activación sostenida de la vía Erk pero poca o ninguna señalización de las vías p38 y JNK. Además ES-62 induce la activación transitoria del factor NF- κ B y en el caso LNFPIII no hay degradación del inhibidor de NF- κ B. La señalización sostenida de Erk y la activación transitoria de factor NF- κ B, induce células presentadoras de antígeno anti-inflamatorias promotoras de respuestas Th2 (Thomas y col., 2003; Goodridge y col., 2005; Goodridge y col., 2005^a; Thomas y col., 2005; Goodridge y col., 2007; van Riet y col., 2007; Carvalho y col., 2009; Al-Riyami y Harnett, 2012).

Se ha observado también que una fuerte respuesta inmune de tipo Th2 y reguladora inducida por los helmintos suprime activamente las respuestas protectoras producidas contra patógenos, especialmente contra aquellos que provocan

respuestas de tipo Th1 lo que podría generar cierta susceptibilidad a infecciones por bacterias, virus o incluso otros parásitos (Finlay y col., 2014).

En un estudio se observó los efectos perjudiciales en pacientes infectados con esquistosomiasis y el HCV (del inglés *Hepatitis C virus*) o HIV (del inglés *Human immunodeficiency virus*) que tiene una mayor exacerbación de los síntomas clínicos de la infección viral y la progresión acelerada de la enfermedad. Es probable que el mecanismo implique la supresión de células T productoras de INF- γ , asociado a la infección por helmintos resultado de una respuesta Th2 o reguladora (Kamal y col., 2001; Walson y col., 2008).

En nuestros resultados las células solo estimuladas con los antígenos ESTs producen poca IL-10 al inicio de la cinética y hasta las 72 hpi se observa un ligero incremento en la producción de esta citocina, sugiriendo un posible efecto regulador pero solo hasta ese tiempo. Por otra parte solo en las células coinfectadas se incrementa la producción de IL-10 siendo más notorio a las 24 y 48 hpi, sugiriendo que el aumento de IL-10 es debido al efecto simultáneo de la coinfección.

Con base a nuestros resultados se sugiere que los antígenos ESTs favorecen la producción de las citocinas inflamatorias IL-6 y TNF- α durante una coinfección en lugar de contribuir a la disminución del perfil inflamatorio y de incrementar la producción de IL-10 como Radovic y col., 2015 describen de los efectos inmunomoduladores de los antígenos ESTs. Con base en el estudio de Kamal y col., 2001 es posible que de alguna manera los antígenos ESTs activen algún mecanismo que contribuya a la gravedad de la enfermedad.

Se propone que el aumento de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 en las CMNSP debido al estímulo con los antígenos ESTs favorece el desarrollo de formas graves de dengue.

Para corroborar la infección de las células se realizó una citometría de flujo, los resultados mostraron la expresión positiva a la proteína NS1 viral en las células coinfectadas (estimuladas con los antígenos ESTs e infectadas con DENV) e

infectadas con DENV cosechadas a las 48 hpi, este resultado concuerda con Kao y col., 2001 con respecto a la expresión de la proteína NS1 viral durante el inicio de la infección.

9. CONCLUSIONES

- El incremento en la producción de TNF- α e IL-6 debido al efecto simultáneo de la infección viral y de los antígenos ESTs, sugiere una mayor probabilidad de desarrollo de formas hemorrágicas de dengue en pacientes coinfectados con DENV y *T. spiralis*.

10. PERSPECTIVAS

Aumentar el número de citocinas a evaluar esto con la finalidad de monitorear el perfil de la respuesta durante la cinética de infección.

Trabajar con otros serotipos del DENV y evaluar su respuesta inflamatoria durante la coinfección.

Realizar un estudio epidemiológico en los estados donde se comparte endemicidad para establecer si existe una correlación entre la presencia de dengue y triquinelosis con la incidencia de formas hemorrágicas y graves de dengue.

11. REFERENCIAS

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

Akira S, Takeda K, Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2: 675-680.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124: 783-801.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413: 732-738.

Al-Riyami L y Harnett W. 2012. Immunomodulatory properties of ES-62, a phosphorylcholine-containing glycoprotein secreted by *Acanthocheilonema viteae*. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 12: 45-52.

Anderson JR y Rico-Hesse R. 2006. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*, 75: 886-892.

Anderson R, Wang S, Osioy C, Issekutz AC. 1997. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol*, 71: 4226-4232.

Aranzamendi C, Fransen F, Langelaar M, Franseen F, *et al.* 2012. *Trichinella spiralis*-secreted products modulate DC functionality and expand regulatory T cells in vitro. *Parasite Immunol*, 34: 210-223.

Ashour DS. 2013. *Trichinella spiralis* immunomodulation: an interactive multifactorial process. *Expert Rev Clin Immunol*, 9: 669-675.

Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, *et al.* 2001. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiol*, 204: 494-507.

Bäck AT y Lundkvist A. 2013. Dengue viruses-an overview. *Infect Ecol Epidemiol*, 3: 1-21.

Baeuerle PA y Baltimore D. 1996. NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 87: 13-20.

Bai X, Wu X, Wang X, Guan Z, *et al.* 2012. Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* in vitro. *Mol Cell Biochem*, 360: 79-88.

- Bashyam HS**, Green S, Rothman AL. 2006. Dengue virus-reactive CD8⁺ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *J Immunol*, 176: 2817-2824.
- Beutler B**, Eidenschenk C, Crozat K, Imler JL, *et al.* 2007. Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat Rev Immunol*, 7: 753-676.
- Bien J**, Cabaj W, Moskwa B. 2013. Recognition of antigens of three different stages of the *Trichinella spiralis* by antibodies from pigs infected with *T. spiralis*. *Exp Parasitol*, 134: 129-137.
- Bolás-Fernández F** y Corral Bezara LD. 2006. TSL-1 antigens of *Trichinella*: an overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Res Vet Sci*, 81: 297-303.
- Bruschi F** y Chiumiento L. 2012. Immunomodulation in trichinellosis: does *Trichinella* really escape the host immune system? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 12: 4-15.
- Butthep P**, Chunhakan S, Yoksan S, Tangnararatchakit K, Chuansumrit A. 2012. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J*, 31: e232-e238.
- Calisher CH**, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, *et al.* 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*, 70: 37-43.
- Capo V** y Despommier DD. 1996. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clin Microbiol Rev*, 9: 47-54.
- Carpio-Pedroza JC**, Cázares-López F, Escobar-Rojano R, *et al.* 2014. Inmunología en Salud Pública. Manual. IN-DRE. Secretaría de Salud, México.
- Carvalho L**, Sun J, Kane C, Marshall F. *et al.* 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function. *Immunology*, 126: 28-34.
- Chambers TJ**, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol*, 44: 649-688.
- Chiewsilp P**, Scott RM, Bhamarapavati N. 1981. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 30: 1100-1105.
- Cho MK**, Park MK, Kang SA, Choi SH, *et al.* 2012. *Trichinella spiralis* infection suppressed gut inflammation with CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cell recruitment. *Korean J Parasitol*, 50: 385-390.

Cologna R y Rico-Hesse R. 2003. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol*, 77: 3929-3938.

Compton SJ, Celum CL, Lee C, Thompson D, *et al.* 1993. Trichinosis with ventilatory failure and persistent myocarditis. *Clin Infect Dis*, 16: 500-504.

Cvetkovic J, Sofronic-Milosavljevic L, Ilic N, Gnjatovic M, *et al.* 2016. Immunomodulatory potential of particular *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory components. *Int J Parasitol*, 46: 833-842.

Danilowicz-Luebert E, O'Regan NL, Steinfelder S, Hartmann S. 2011. Modulation of Specific and Allergy-Related Immune Responses by Helminths. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, ID 821578.

Dea-Ayuela MA y Bolás-Fernández F. 2000. Dynamics of the IgG3 responses following immunisation of BALB/c mice with somatic and excretory/secretory antigens from various *Trichinella* species. *Folia Parasitol*, 47: 172-180.

de-la-Rosa-Arana JL. 2012. Inducción de inmunidad protectora tipo Th1 en la triquinelosis experimental murina. Tesis doctoral. Escuela Superior de Medicina-IPN, México.

Despommier DD. 1983. Biology, In W. C. Campbell, ed., *Trichinella and trichinosis*. Plenum Press, London, United Kingdom. pp. 75-151.

Despommier DD. 1993. *Trichinella spiralis* and the concept of niche. *J Parasitol*, 79: 472-482.

Dong T, Moran E, Chau NV, Simmons C, *et al.* 2007. High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. *PLOS ONE*, 2: e1192.

Du L, Wei H, Li L, *et al.* 2014. Regulation of recombinant *Trichinella spiralis* 53-kDa protein (rTsP53) on alternatively activated macrophages via STAT6 but not IL-4R α in vitro. *Cellular Immunology*, 288: 1-7.

EBI/EMBL. 2008. IMGT/HLA Database, release 2.20.0. European Bioinformatics Institute/European Molecular Biology Laboratory. Available at www.ebi.ac.uk/imgt/hla.

Edelmann KH, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, Tyle KL, *et al.* 2004. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology*, 322: 231-238.

Ferraccioli GF, Mercadanti M, Salaffi F, Bruschi F, *et al.* 1988. Prospective rheumatological study of muscle and joint symptoms during *Trichinella nelsoni* infection. *Q J Med*, 69: 973-984.

Finlay CM, Walsh KP, Mills KH. 2014. Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunol Rev*, 259: 206-230.

Fragnaud R, Yugueros-Marcos J, Pachot A, Bedin F. 2012. Isotope Coded Protein Labeling analysis of plasma specimens from acute severe dengue fever patients. *Proteome Sci*, 10: 60.

Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale MJr. 2008. Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MAD-5 signaling through IPS-1. *J Virol*, 82: 609-616.

García G, Arango M, Pérez AB, Fonte L. *et al.* 2006. Antibodies from patients with dengue viral infection mediate cellular cytotoxicity. *J Clin Virol*; 37: 53-57.

Goodridge HS, Deehan MR, Harnett W, Harnett MM. 2005. Subversion of immunological signalling by filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product. *Cell Signal*, 17: 11-16.

Goodridge HS, McGuinness S, Houston KM, Egan CA, *et al.* 2007. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol*, 29: 127-137.

Goodridge HS, Stepek G, Harnett W, Harnett MM. 2005^a. Signalling mechanisms underlying subversion of the immune response by the filarial nematode secreted product ES-62. *Immunology*, 115: 296-304.

Gottstein B, Pozio E, Nöckler N. 2009. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin Microbiol Rev*, 22: 127-145.

Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Colic M, Majstorovic I, *et al.* 2011. The impact of *Trichinella spiralis* excretory- secretory products on dendritic cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 34: 429-439.

Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, *et al.* 2010. Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. *Parasite Immunol*, 32: 450-459.

Gubler DJ. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*, 10: 100-103.

Gubler DJ. 2012. The economic burden of dengue. *Am J Trop Med Hyg*, 86: 743-744.

Guzmán MG y Kourí G. 2002. Dengue: An update. *Lancet Infect Dis*, 2: 33 – 42.

Guzmán MG y Kourí G. 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lesson and challenges. *J Clin Virol*, 27: 1-13.

Guzmán MG, Sierra B, Kourí G, Farrar J, Simmons C. 2010. Host and virus determinants of susceptibility and dengue disease severity. In: Hanley KA, Weaver SC, eds. *Frontiers in dengue virus research*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. pp. 79-102.

Halstead SB. 1980. Dengue haemorrhagic fever – a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ*, 58: 1-21.

Halstead SB. 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, 239: 476-481.

Harnett W y Harnett MM. 2010. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nat Rev Immunol*, 10: 278-284.

Harnett W, Al-Riyami L, Rzepecka J, Harnett MM. 2013. Modulation of autoimmune and allergic responses by defined nematode molecules in parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology. Oxfordshire, UK: CABI. pp. 144-155.

Henchal EA y Putnak JR. 1990. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*, 3: 376-396.

Hepworth MR, Grencis RK, Artis D. 2013. Regulation of immunity and inflammation following intestinal helminth infection in parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology. Oxfordshire, UK: CABI. pp. 106-129.

Honda K y Taniguchi T. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*; 6: 644-658.

Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, *et al.* 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*, 5: 889-899.

Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic L. 2012. *Trichinella spiralis*: shaping the immune response. *Immunologic Research*, 52: 111-119.

Jacobs MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR. 2000. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J*, 14: 1603-1610.

Janeway CA Jr y Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol*, 20: 197-216.

Jasmer DP. 1993. *Trichinella spiralis* infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *The Journal of Cell Biology*, 121: 785-793.

- Jessie K**, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *J Infect Dis*, 189: 1411-1418.
- Kaisho T**, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol*, 166: 5688-5694.
- Kamal SM**, Rasenack JW, Bianchi L, Al Tawil A, *et al.* 2001. Acute hepatitis C without and with schistosomiasis: correlation with hepatitis C-specific CD4⁺T-cell and cytokine response. *Gastroenterology*, 121: 646-656.
- Kao CL**, Wu MC, Chiu YH, Lin JL, *et al.* 2001. Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture. *J Clin Microbiol*, 39: 3672-3677.
- Kapoor M**, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, *et al.* 1995. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem*, 270: 19100-19106.
- Kawai T** y Akira S, 2008. Toll-like receptor and RIG-I like receptor signaling. *Ann NY Acad Sci*, 1143: 1-20.
- Kawai T**, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11: 115-122.
- Kawai T**, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, *et al.* 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of INF-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*, 167: 5887-5894.
- Kishimoto T**, Akira S, Taga T. 1992. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*, 258: 593-597.
- Kociecka W**. 1993. Early clinical syndromes of severe trichinellosis., In *Trichinellosis. Proceedings of the 8th International Conference on Trichinosis.*, W.S. Campbell, E. Pozio, and F. Bruschi, eds. (Rome: Istituto Superiore di Sanità Press). pp. 475-480.
- Kociecka W**. 2000. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol*, 93: 365-383.
- Kuhn RJ**, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, *et al.* 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108: 717-725.
- Kumar H**, Kawai T, Akira S. 2009. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J*, 420: 1-16.

Kumar H, Kawai T, Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30: 16-34.

Kurane I y Ennis FA. 1994. Cytokines in dengue virus infections: role of cytokines in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Seminars in Virology*, 5: 443-448.

La Fleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruíz-Morales J, *et al.* 2002. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol*, 63: 1039-1044.

Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, *et al.* 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*, 73: 4738-4747.

Levy A, Valero N, Espina LM, Añez G, *et al.* 2010. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 104: 16-23.

Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, *et al.* 2002. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, 186: 1165-1168.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. 2007. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: D.M Knipe and P.M Howley, *Fields Virology*, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: pp. 1101-1152.

Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, *et al.* 2001. Strong HLA class I - restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis*, 184: 1369-1373.

Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, *et al.* 2008. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol*, 82: 335-345.

Maizels RM y Yazdanbakhsh M. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol*, 3: 733-744.

Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, *et al.* 2004 Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol Rev*, 201: 89-116.

Mangada MM y Rothman AL. 2005. Altered cytokine responses of dengue-specific CD-4 T cells to heterologous serotypes. *J Immunol*, 175: 2676-2683.

Mangan NE, Fallon RE, Smith P, *et al.* 2004. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol*, 173: 6346-6356.

- Mangan NE**, Van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. 2006. Helminth-modified pulmonary immune response protects mice from allergen-induced airway hyperresponsiveness. *J Immunol*, 176: 138-147.
- Martina BE**, Koraka P, Osterhaus AD. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev*, 22: 564-581.
- Maruo N**, Morita I, Shirao M, *et al.* 1992. IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology*, 131: 710-714.
- Medzhitov R.** 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1: 135-145.
- Medzhitov R.** 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449: 819-826.
- Mehlhop E**, Ansarah-Sobrinho C, Johnson S, Engle M, *et al.* 2007. Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner. *Cell Host Microbe*, 2: 417-426.
- Modis Y**, Ogata S, Clements D, Harrison SC. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427: 313-319.
- Mogensen TH.** 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, 22: 240-273.
- Mukhopadhyay S**, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, 3: 13-22.
- Multiple Sclerosis.** 2004. National Clinical Guideline for Diagnosis and Management in Primary and Secondary Care. (London).
- Murray NEA**, Quam MB, Wilder-Smith A. 2013. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*, 5: 299-309.
- Murrel KD** y Bruschi F. 1994. Clinical trichinellosis. *Prog Clin Parasitol*, 4: 117-150.
- Nagano I**, Wu Z, Takahashi Y. 2009. Functional genes and proteins of *Trichinella* spp. *Parasitol Res*, 104: 197-207.
- Nasirudeen AM**, Wong HH, Thien P, Xu S, *et al.* 2011. RIG-I, MDA 5 and TLR-3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 5: e926.
- Navarro-Sánchez E**, Altmeyer R, Amara A, *et al.* 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*, 4: 723-728.

Nybakken GE, Oliphant T, Johnson S, Burke S, *et al.* 2005. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature*, 437: 764-769.

Ortega-Pierres MG, Arriaga C, Yépez-Mulia L. 2000. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Vet Parasitol*, 93: 201-225.

Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, *et al.* 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem*, 278: 49751-49762.

Pacífico LG, Marinho FA, Fonseca CT, Barsante MM, *et al.* 2009. Schistosoma mansoni antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells independent of interleukin-10. *Infect Immun*, 77: 98-107.

Pandey S, Kawai T, Akira S. 2015. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7:a016246.

Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. 2007. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*, 85: 43-45.

Parham P. 2005. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, 5: 201-214.

Park HK, Cho MK, Choi SH, Kim YS, Yu HS. 2011. Trichinella spiralis: Infection reduces airway allergic inflammation in mice. *Exp Parasitol*, 127: 539-544.

Pozio E y Murrel KD. 2006. Systematics and epidemiology of Trichinella. *Adv Parasitol*, 63: 367-439.

Pozio E. 2007. Taxonomy, biology and epidemiology of Trichinella parasites, In J. Dupouy-Camet and K. D. Murrell. ed., FAO/WHO/ OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. World Organisation for Animal Health Press, Paris, France. pp. 1-35.

Radovic I, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Cvetkovic J, *et al.* 2015. Immunomodulatory effects of Trichinella spiralis-derived excretory secretory antigens. *Immunol Res*, 61: 312-325.

Radovic I, Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Mostarica-Stojkovic M, Sofronic-Milosavljevic L. 2012. Trichinella spiralis shares epitopes with human autoantigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107: 503-509.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, *et al.* 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, 229: 726-733.

Rice CM. 1996. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley et al (eds) Fields Virology. Vol. I. Third. Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: 931-958.

Rico-Hesse R. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174: 479-493.

Rothman AL. 2011. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*, 11: 532-543.

Sánchez IJ y Ruiz BH. 1996. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol*, 77:2541-2545.

Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. 1987. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol*, 68: 853-857.

Schneider BS, Soong L, Zeidner NS, Higgs S. 2004. *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine response to Sindbis virus infection. *Viral Immunol*, 17: 565-573.

Schrader AP y Westaway EG. 1990. Successful competition in translation by the flavivirus Kunjin with poliovirus during co-infections in Vero cells. *Arch Virol*, 114: 75-89.

Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA. 2013. Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. *PloS Negl Trop Dis*, 7: e2055.

Sierra B, Alegre R, Pérez AB, García G, *et al.* 2007. HLA-A,-B,-C and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol*, 68: 531-540.

Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol*, 71: 8475-8481.

Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, *et al.* 2002. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens*, 60: 309-318.

Takeuchi O y Akira S. 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev*, 227: 75-86.

Takeuchi O y Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140: 805-820.

Thomas PG, Carter MR, Atochina O, Da´Dara AA, *et al.* 2003. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol*, 171: 5837-5841.

Thomas PG, Carter MR, Da´dara AA, DeSimone TM, Harn DA. 2005. A helminth glycan induce APC maturation via alternative NF- κ B activation independent of I κ B α degradation. *J Immunol*, 175: 2082-2090.

Tsai CJ, Kuo CH, Chen PC, Changcheng CS. 1991. Upper gastrointestinal bleeding in dengue fever. *Am J Gastroenterol*, 86: 33-35.

Tsai YT, Chang SY, Lee CN, Kao CL. 2009. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell Microbiol*, 11: 604-615.

Ubol S, Chareonsirithigul T, Kasisith J, Klungthong C. 2008. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. *Virology*, 376: 290-296.

van de Veerdonk FL y Netea MG. 2013. New Insights in the Immunobiology of IL-1 Family Members. *Front Immunol*, 4: 1-11.

van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. 2007. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiology*, 212: 475-490.

Vogt MR, Moesker B, Goudsmit J, Jongeneelen M, *et al.* 2009. Human monoclonal antibodies against West Nile virus induced by natural infection neutralize at a post attachment step. *J Virol*, 83: 6494-6507.

Walson JL, Otieno PA, Mbuchi M, Richardson BA, *et al.* 2008. Albendazole treatment of HIV-1 and helminth co-infection: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *AIDS*, 22: 1601-1609.

Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, *et al.* 1985. Flaviviridae. *Intervirology*, 24: 183-192.

WHO. 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control- New ed. Geneva. World Health Organization.

WHO.2012^a. Handbook for clinical management of dengue. ed. Geneva. World Health Organization.

WHO.2012^b. Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012-2020. ed. Geneva. Switzerland. World Health Organization.

Wilkins C y Gale JrM. 2010. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr Opin Immunol*, 22: 41- 47.

Wohlleben G, Trujillo C, Müller J, Ritze Y, *et al.* 2004. Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol*, 16: 585-596.

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, *et al.* 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Med*, 6: 816-820.

Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. 1999. A panel of antigens of muscle larvae of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* as revealed by two-dimensional western blot and immunoelectron microscopy. *Parasitology*, 118, 615-622.

Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*, 38: 1053-1057.

Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, *et al.* 2008. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, 319: 1834-1837.

Yu YR, Deng M, Lu WW, Jia MZ, *et al.* 2013. Systemic cytokine profiles and splenic toll-like receptor expression during *Trichinella spiralis* infection. *Experimental Parasitology*, 134: 92-101.

Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, *et al.* 2004. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*, 12: 1607-1618.

Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. 2008. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J Gen Virol*, 89: 3047-3051.

URL's

www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2018-semana-epidemiologica-52

www.gob.mx/salud/documentos/_-boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion