



---

---

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“PAPEL DEL RECEPTOR CD209 EN LA ACTIVACIÓN  
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DURANTE LA INFECCIÓN  
POR VIRUS DENGUE SEROTIPO 2”**

**TESIS**

**PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**EN EL ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. VERÓNICA JIMÉNEZ CLARO**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. IRMA HERRERA CAMACHO (CQ-ICUAP)**

**ASESORA DE TESIS:**

**DRA. LILIAN FLORES MENDOZA (CIBIOR-IMSS)**

**JUNIO-2016**

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIOR-IMSS) en colaboración con el Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma del Estado de Puebla.

**Este trabajo fue parte de un proyecto de investigación, el cual fue apoyado financieramente por:**

- Instituto Mexicano del Seguro Social (No. R-2011-2013-029), con financiamiento del Fondo de Investigación en Salud: FIS/IMSS/PROT/G11/980.
- Redes Temáticas PROMEP-SEP-BUAP. CA: Bioquímica y Biología Molecular.  
Proyecto: 2014-2015 y 2015-2016.

**Para la realización de este trabajo agradezco el apoyo en becas de:**

- Beca CONACYT (núm.: 589702) 2014-2015.
- Beca complementaria de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS de Marzo de 2015 a febrero de 2016 con número de matrícula 98227563
- Beca de término de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, BUAP. Febrero-Abril 2106



**BUAP**

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, Dr. Julio Roberto Reyes Leyva, Dra. Juidith González Christen y Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Papel del receptor cd209 en la activación de células dendríticas durante la infección por virus dengue serotipo 2”**, que presenta la alumna **Verónica Jiménez Claro** con número de matrícula 214470190 para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los trece días del mes de junio del año dos mil dieciséis.

ATENTAMENTE

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dr. Julio Roberto Reyes Leyva

Dra. Judith González Christen

Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta



## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de los siguientes investigadores:

- **Dra. Lilian Karen Flores Mendoza del Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIOR-IMSS)**, quien tuvo la dirección de la tesis, gracias por el apoyo para el presente trabajo: tanto en el diseño como en el desarrollo experimental, en la interpretación de resultados, etc., muchas gracias Doctora por su paciencia y motivación.
- **Dra. Irma Pilar Herrera Camacho del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma del Estado de Puebla (CQ-ICUAP)**, quien dirigió la tesis, gracias por las recomendaciones, la disposición en tiempo, paciencia y su gran apoyo.
- **Al comité revisor de tesis:** Dra. Lourdes Millán Pérez Peña (CQ-ICUAP), Dr. Julio Roberto Reyes Leyva (CIBIOR-IMSS), Dra. Judith González Chisten (UAEM), Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta (CQ-ICUAP), por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo y por sus recomendaciones para el mismo.

## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar agradezco a la Dra. Lillian ya que sin su apoyo no hubiese sido posible realizar este proyecto, aprendí mucho, gracias por sus conocimientos y amistad.*

*A mis Padres: gracias por su amor, paciencia, por apoyarme en todo momento, sobre todo por enseñarme que con trabajo, dedicación y esfuerzo lograré lo que me proponga. A mi mamá Celestina Claro Flores por enseñarme a luchar por mis sueños y sobre todo por creer en mí; a mi papá Ángel Jiménez Chávez por ser un ejemplo a seguir, por todo el apoyo en este arduo camino.*

*A mis hermanos: Ángel, Bety, Aní, Ale, Arelly y Edu, por la felicidad, el amor y por estar conmigo en todo momento como decimos: siempre en las buenas y en las malas, Edu gracias por ser mi estrella.*

*A mis amigos: Sandy, Erika, Caro, Javier, Espe, Antonio, Lucy, José Luis, Citlalli, Franco, Anaí, Marilyn, Daní, Berna, Miguel, David, Jess, Ane, Erika, Luz, Eddy, Nelly, María, William, Eduardo, Luis, Kaleb; gracias por escucharme, darme palabras de aliento y acompañarme en esta travesía.*

*A mis compañeros de clase y laboratorio, definitivamente hemos compartido grandes momentos, ¡qué experiencia! Gracias a los Químicos Tony, Luis y Martín por su amistad y consejos.*

*A todos mis familiares gracias por su apoyo.*

## Resumen

El virus dengue infecta células dendríticas que tienen la capacidad de dirigir la respuesta inmune. Las células dendríticas poseen varios receptores antigénicos como CD209 capaz de interactuar con la proteína E del virus dengue e iniciar una señalización para activarlas. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de un tratamiento previo con anti CD209 en la expresión de moléculas de activación y receptores durante la infección con virus dengue serotipo 2 (DENV-2). Para cumplir el objetivo se diferenciaron células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica de donadores sanos; se dividieron en 4 condiciones (sin infección, infección con DENV-2, anti-CD209 y anti-CD209 + infección DENV-2). La infección fue con DENV-2 durante 72 horas y la estimulación con anti-CD209 por 1 hora. Se evaluó la expresión de las moléculas de co-estimulación (CD80 y CD86), presentación de antígeno (HLA-DR y CTLA-4) y receptores (CD14, CD32, CD205, CD206) mediante citometría de flujo. Además se determinaron citocinas por ELISA y se evaluó el título viral mediante ensayos de placas líticas.

El virus dengue induce la activación de células dendríticas, aumenta el número de células que expresan CD80, se observa un aumento de la expresión de la molécula CTLA-4 que favorece el estado de anergia en linfocitos y un microambiente regulador con la producción de IL-10; sin embargo, también induce la expresión de receptores como CD14, y CD205, como un mecanismo viral para incrementar la infección. Con tratamiento previo de anti-CD209 las células dendríticas maduran pero no se modifica la expresión de estos receptores, lo cual se refleja en un menor título viral, además de que se inhibe la expresión de CTLA-4, con lo que el estado de anergia de linfocitos se reduciría y el microambiente regulador se ve modificado por un aumento de TNF- $\alpha$  y una disminución de IL-10.

# ÍNDICE

## CAPITULO I

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Dengue.....	2
1.2	Virus dengue.....	4
1.2.1	Proteínas virales.....	5
1.2.1.1	Proteínas estructurales.....	5
1.2.2	Proteínas no estructurales.....	7
1.3	Células que interaccionan con el virus dengue.....	7
1.3.1	Ciclo replicativo del virus dengue.....	8
1.4	El sistema inmune y sus componentes celulares.....	10
1.4.1	Monocitos-Macrófagos.....	11
1.4.2	Células dendríticas.....	12
1.4.3	Citocinas y su papel regulador en la respuesta inmune.....	14
1.4.3.1	IL-10.....	15
1.4.3.2	INF- $\gamma$ .....	15
1.4.3.3	TNF- $\alpha$ .....	15
1.4.4	Moléculas de superficie en células dendríticas.....	16
1.4.4.1	Moléculas de caracterización.....	16
1.4.4.1.1	CD1a.....	16
1.4.4.1.2	CD14.....	16
1.4.4.1.3	CD83.....	16
1.4.4.2	Moléculas de co-estimulación CD80 y CD86.....	17
1.4.4.3	Moléculas de presentación de antígeno.....	18
1.4.4.3.1	HLA-DR.....	18
1.4.4.3.2	CTLA-4.....	19
1.5	Receptores en células dendríticas.....	19
1.5.1	Receptor CD32.....	19
1.5.2	Receptores tipo lectina.....	20
1.5.3	Receptor CD205.....	20
1.5.4	Receptor CD206.....	20

1.5.5	Receptor CD209 .....	21
1.5.5.1	Función y señalización.....	22
1.6	Respuesta inmune e inmunopatología de la enfermedad.....	23
1.7	Participación de células dendríticas en la infección por dengue.....	27
1.8	Papel del receptor CD209 en la infección de virus dengue en células dendríticas.....	27
1.9	JUSTIFICACIÓN .....	29
1.10	HIPÓTESIS .....	30
1.11	OBJETIVOS .....	30
1.11.1	Objetivo general.....	30
1.11.2	Objetivos particulares.....	30

## **CAPITULO II**

2	METODOLOGÍA.....	31
2.1	Diagrama general de trabajo .....	31
2.2	Muestras de sangre periférica .....	32
2.3	Separación de células mononucleares de sangre periférica .....	32
2.4	Estandarización de la obtención de células dendríticas .....	32
2.5	Diferenciación de monocitos a células dendríticas.....	33
2.5.1	Concentración de células mononucleares y tiempo de adherencia .....	33
2.5.2	Concentración de citocinas (IL-4 y GM-CSF) y tiempo de diferenciación.....	33
2.6	Estimulación de células dendríticas con anti-CD209 .....	34
2.7	Determinación de título viral por ensayo de placas líticas .....	34
2.8	Inmunofluorescencia.....	34
2.9	Infección de células dendríticas.....	35
2.10	Fenotipo de células dendríticas inmaduras, moléculas de activación y receptores por citometría de flujo. ....	35
2.11	Determinación de citocinas por ELISA. ....	36

## **CAPITULO III**

3	RESULTADOS .....	37
---	------------------	----

### 3.1 Objetivo 1

Estandarización del proceso de diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica.....	37
3.1.1 Concentración de células mononucleares.....	38
3.1.2 Concentración de citocinas (IL-4 y GM-CSF) .....	40
3.1.3 Fenotipo de células dendríticas inmaduras (iDC's) .....	44

### 3.2 Objetivo 2

Evaluar el efecto de la infección con virus dengue serotipo 2 en la expresión de receptores, marcadores de activación y presentación y el título viral. ....	47
3.2.1 Expresión de moléculas de co-estimulación, presentación de antígeno, receptores y citocinas en células dendríticas infectadas con DENV-2.....	50
3.2.1.1 Moléculas de caracterización para células dendríticas .....	50
3.2.1.2 Expresión de receptores en células dendríticas infectadas con DENV-2. ....	51
3.2.1.3 Expresión de moléculas de co-estimulación y presentación de antígeno en células dendríticas durante la infección con DENV-2.....	53
3.2.1.4 Secreción de citocinas de células dendríticas infectadas con DENV-2 .....	54
3.2.1.5 Título viral .....	56

### 3.3 Objetivo 3

Determinar cambios en los marcadores de activación, receptores y título viral al estimular con anti-CD209 e infectar células dendríticas con virus dengue serotipo 2. ....	57
3.3.1 Estimulación de células dendríticas con anti-CD209 .....	57
3.3.2 Expresión de moléculas de caracterización para células dendríticas estimuladas con el anticuerpo anti CD209.....	60
3.3.3 Expresión de receptores de células dendríticas estimuladas con anti CD209 .....	61
3.3.4 Expresión de moléculas de co-estimulación y presentación de antígeno en células dendríticas estimuladas con anti- CD209.....	62
3.3.5 Secreción de citocinas de células dendríticas con el estímulo de anti-CD209....	64

3.4 Cambios en moléculas de co-estimulación, receptores, citocinas y título viral al estimular las DC's con anti-CD209 e infectar con virus dengue serotipo 2.....	65
3.4.1 Expresión de moléculas de caracterización en células dendríticas infectadas con DENV-2 y estimuladas con anti CD209 e infectadas con DENV-2.....	65
3.4.2 Expresión de receptores en células dendríticas infectadas con DENV-2 y estimuladas con anti CD209 e infectadas con DENV-2.....	66

3.4.3	Expresión de moléculas de co-estimulación y presentación en células dendríticas infectadas con DENV-2 y estimuladas con anti CD209 e infectadas con DENV-2.....	67
3.4.4	Secreción de citocinas en células dendríticas infectadas con DENV-2 y estimuladas con anti-CD209. ....	69
3.4.5	Título viral en células dendríticas infectadas e infectadas y estimuladas previamente con anti-CD209. ....	70
3.5	Discusión de resultados .....	73

#### **CAPITULO IV**

4	CONCLUSIONES.....	80
5	BIBLIOGRAFÍA .....	80
6	APÉNDICE .....	89

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Panorama epidemiológico de dengue en México, 2008-2015 .....	1
<b>Figura 2.</b> Serotipos aislados de casos de dengue en México, 2008-2015. ....	2
<b>Figura 3.</b> A, Estructura del virus dengue y B, organización del genoma del virus. ....	5
<b>Figura 4.</b> Proteína E del virus dengue. ....	7
<b>Figura 5.</b> Ciclo viral intracelular del virus del dengue. ....	10
<b>Figura 6.</b> Señales de co-estimulación para células T.....	17
<b>Figura 7.</b> Presentación de antígenos a linfocitos T.....	19
<b>Figura 8.</b> Estructura del receptor CD209.....	21
<b>Figura 9.</b> Formación del complejo DENV-CRD. ....	28
<b>Figura 10.</b> Determinación del número de células mononucleares (CMN)/cm <sup>2</sup> para la obtención de células dendríticas.....	39
<b>Figura 11.</b> Evaluación de concentraciones de citocinas para optimizar la diferenciación. ....	41
<b>Figura 12.</b> Proceso de diferenciación de DC's. ....	42
<b>Figura 13.</b> Secuencia de análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo. ....	44
<b>Figura 14.</b> Expresión de marcadores de superficie para células dendríticas inmaduras y maduras. ....	46
<b>Figura 15.F</b> Expresión de moléculas de caracterización: CD1a y CD83 en DC's infectadas con DENV-2.....	50
<b>Figura 16.</b> Expresión de receptores: CD14, CD32, CD205, CD206 y CD209 en DC's infectadas con DENV-2. ....	52
<b>Figura 17.</b> Expresión de moléculas de co-estimulación (CD80 yCD86) y moléculas de presentación de antígeno (CTLA-4 y HLA-DR) en DC's infectadas con DENV-2. ....	54
<b>Figura 18.</b> Niveles de citocinas (IL-10, INF- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ ) en pg/ml en DC's infectadas con DENV-2 y título viral en UFP/ml de sobrenadantes de DC's infectadas con DENV-2. ...	56

<b>Figura 19.</b> Título viral de sobrenadantes de DC's estimuladas a diferentes concentraciones de anti-CD209 e infectadas con DENV-2.....	<b>58</b>
<b>Figura 20.</b> Ensayo de placas líticas.....	<b>58</b>
<b>Figura 21.</b> Ensayos de inmunofluorescencia en DC's.....	<b>59</b>
<b>Figura 22.</b> Expresión de moléculas de caracterización CD1a y CD83 en DC's estimuladas con anti-CD209.....	<b>61</b>
<b>Figura 23.</b> Expresión de receptores: CD14, CD32, CD205, CD206 y CD209 en DC's estimuladas con anti-CD209. ....	<b>62</b>
<b>Figura 24.</b> Expresión de moléculas de co-estimulación (CD80 yCD86) y moléculas de presentación de antígeno (CTLA-4 y HLA-DR) en DC's con anti-CD209.....	<b>63</b>
<b>Figura 25.</b> Niveles de citocinas IL-10, INF- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ en DC's con anti-CD209.....	<b>64</b>
<b>Figura 26.</b> Expresión de moléculas de caracterización: CD1a y CD83 en DC's infectadas con DENV-2 y DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2.....	<b>66</b>
<b>Figura 27.</b> Expresión de receptores: CD14, CD32, CD205, CD206 y CD209 en DC's infectadas con DENV-2 y DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2. ....	<b>67</b>
<b>Figura 28.</b> Expresión de moléculas de co-estimulación (CD80 yCD86) y moléculas de presentación de antígeno (CTLA-4 y HLA-DR) en DC's infectadas con DENV-2 y DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2.....	<b>68</b>
<b>Figura 29.</b> Niveles de citocinas IL-10, INF- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ en DC's infectadas con DENV-2 y DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2. ....	<b>69</b>
<b>Figura 30.</b> Ensayo de placas líticas.....	<b>70</b>
<b>Figura 31.</b> Titulo viral de sobrenadantes en DC's durante la infección con DENV-2 y DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2.....	<b>71</b>

## LISTA DE TABLAS

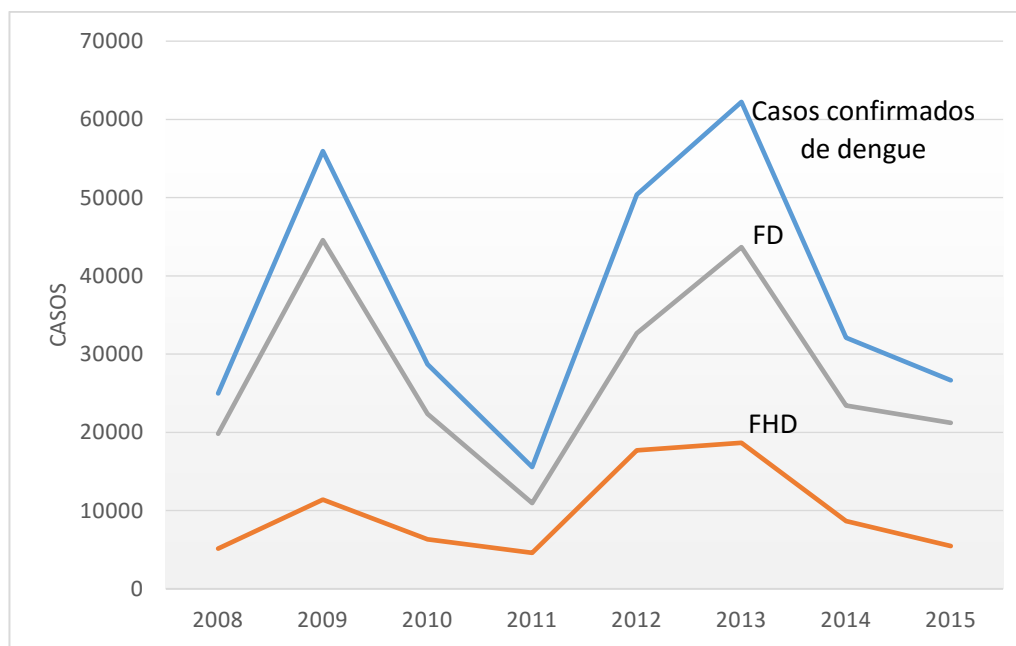
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de dengue. OMS 1997 .....	<b>4</b>
<b>Tabla 2.</b> Expresión de moléculas de caracterización en DC's: CD1a, CD14 y CD83 a 24, 48 y 72 horas post infección con DENV-2.....	<b>48</b>
<b>Tabla 3.</b> Expresión de moléculas de co-estimulación (CD80, CD86) y presentación de antígeno (HLA-DR, CTLA-4) en DC's a 24, 48 y 72 horas post infección con DENV-2. ....	<b>48</b>
<b>Tabla 4.</b> Expresión de receptores tipo lectina: CD205, CD206 y CD209 en DC's infectadas con DENV-2 durante 72 horas. ....	<b>49</b>
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de células positivas a anti-CD209 en DC's.....	<b>60</b>
<b>Tabla 6.</b> Fenotipo de DC's con las diferentes con condiciones. ....	<b>72</b>

## CAPITULO I

### 1 INTRODUCCIÓN

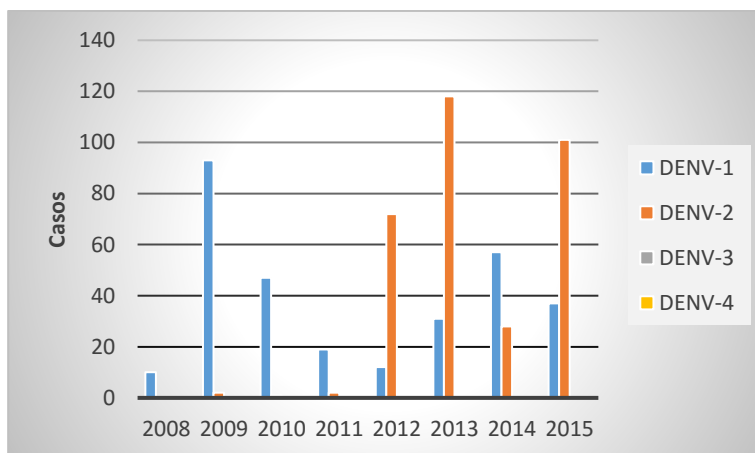
En la actualidad el dengue es un problema importante de salud pública en México y el mundo, ya que es la enfermedad más importante transmitida por artrópodos. En México, la enfermedad se encuentra distribuida en todo el país, en el presente año se han confirmado 3,023 nuevos casos de dengue de los cuales 2,229 casos corresponden a fiebre por dengue (FD) y 794 a fiebre hemorrágica por dengue (FHD), el 58% de los casos confirmados corresponden a los estados de Guerrero, Chiapas, Veracruz, Tabasco y Nuevo León [1-3].

El comportamiento epidemiológico del dengue en México ha mostrado un perfil irregular, con incrementos y disminuciones de las tasas anuales de morbilidad. En la figura 1 puede observarse el número de casos en México de los últimos 8 años, se registraron dos picos en el aumento del número de casos: en 2009 y 2013.



**Figura 1. Panorama epidemiológico de dengue en México, 2008-2015.** FD: Fiebre por dengue, FHD: Fiebre hemorrágica por dengue. Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue.

El patrón de diseminación de dengue en el país ha sido de sur a norte, a lo largo de los estados del sureste y el golfo hacia la mayoría de las entidades de la república, sobre todo aquellas que por sus características geográficas, demográficas y sociales propician la presencia del vector y, por tanto, de la enfermedad. Actualmente encontramos los cuatro serotipos de dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) en todo el país y en algunas entidades hay evidencia de la circulación simultánea de dos o más serotipos. Estos fenómenos han estado relacionados con la permanencia de la epidemia y el incremento de casos de FHD. En Puebla los serotipos de dengue circulantes en los últimos 8 años son DENV-1 y DENV-2, sin embargo en los años 2012 y 2013 se observa que el serotipo de mayor prevalencia es el DENV-2 (figura 2).



**Figura 2. Serotipos aislados de casos de dengue en México, 2008-2015.** Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue. \*Aislamientos reportados por InDRE hasta la semana 52.

## 1.1 Dengue

El dengue es una enfermedad infecciosa aguda, transmitida por mosquitos del género *Aedes* (principalmente *Aedes aegypti*) cuyo agente causal es el virus dengue (DENV) [4]. Tiene diversas formas clínicas desde cuadros indiferenciados, asintomáticos hasta formas graves que llevan a choque y falla en órganos vitales, pero debe ser enfocada como una sola enfermedad. La enfermedad se ha clasificado de acuerdo a la severidad de manifestaciones clínicas (tabla 1) como: fiebre por dengue (FD) y fiebre hemorrágica por dengue (FHD) cuyas manifestaciones son más severas y puede llevar a un Síndrome de Choque por Dengue (SCD) [5].

En la infección con el virus dengue después de un periodo de incubación de 2 a 7 días en general un paciente con FD suele experimentar fiebre de comienzo brusco, cefalea, dolor retro orbitario, dolores de espalda, además de mialgias intensas. Durante el primer día de aparición de los síntomas suele haber un exantema maculopapuloso, así como adenopatías, vesículas en el paladar e inyección conjuntival. La enfermedad puede durar una semana y habitualmente existen otros síntomas como anorexia, náuseas o vómitos e intensa hipersensibilidad cutánea [6].

La FHD es una enfermedad grave, la cual se caracteriza por hemoconcentración (con incremento de hasta 20% del valor normal de hematocrito) y fuga del plasma al espacio extravascular como consecuencia del aumento transitorio en la permeabilidad de los vasos sanguíneos con manifestaciones hemorrágicas. Se distingue por fiebre y datos de fuga capilar como ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico, edema periorbitario o de miembros inferiores e hipoalbuminemia. Se acompaña de trombocitopenia  $< 100\ 000$  plaquetas/mm<sup>3</sup> y puede haber hemorragia cutánea, gingivorragia, epistaxis, sangrado del tubo digestivo, hematuria, sangrado pulmonar, así como sangrado oculto (hemorragia intracraneal, torácica o abdominal) lo que determina la gravedad del cuadro clínico. El síndrome de choque por dengue (SCD), es la manifestación más severa de la infección, así como daño hepático. El SCD es mucho más grave y es el resultado del aumento de la permeabilidad vascular que provoca el choque; se define por fiebre y datos de fuga capilar como ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico y edema periorbitario o de miembros. Se adicionan signos de falla circulatoria como el acortamiento de la presión arterial diferencial a menos de 20 mm Hg, tensión arterial sistólica  $< 60$  mm Hg o caída  $> 30\ %$  de la basal, asimismo, aparecen signos de choque: alteración del estado de conciencia, palidez, piloerección, diaforesis, piel fría, taquicardia, pulso débil, cianosis y oliguria. Estas manifestaciones son precedidas por dolor abdominal intenso, datos de irritación peritoneal, vómito persistente y descenso brusco de la temperatura [7-9].

La OMS clasificó, de acuerdo con su severidad, la FHD en cuatro grados:

- Grado I: Solamente existe la presencia de manifestaciones hemorrágicas con prueba de torniquete positiva.
- Grado II: Presencia de sangrado espontáneo, usualmente en la piel, a través de la nariz o en órganos internos.

- Grado III: Presencia de hipotensión, caída de la presión del pulso en 20 mm Hg o menor, así como presencia de pulso débil y rápido.
- Grado IV: Choque profundo y ausencia de presión sanguínea y pulso no detectable.

De acuerdo con lo anterior, los grados III y IV son los más severos, ya que corresponden al SCD [10].

El tratamiento clínico de las infecciones por DENV es sintomático y de soporte, no existe una terapia antiviral específica para prevenir o contrarrestar la infección.

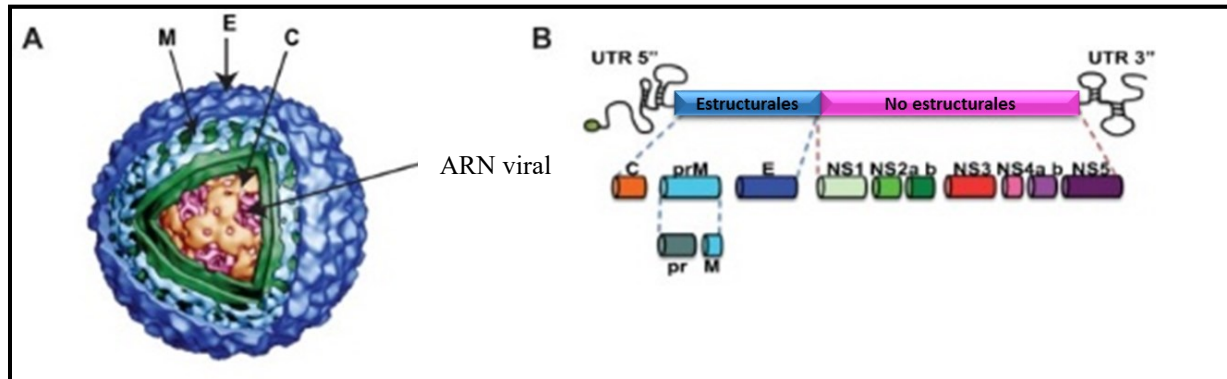
**Tabla 1.** Clasificación de dengue. OMS 1997

Esquemas de clasificación de dengue de la Organización Mundial de la Salud del año 1997	
Fiebre por Dengue	Fiebre Hemorrágica por Dengue *
Presencia de 2 o más de los siguientes síntomas:	Todos los siguientes:
Fiebre	1 Fiebre.
Dolor de cabeza Dolor retro-orbital Mialgia	2 Hemorragia: torniquete positivo, petequia, equimosis, púrpura, sangrado de mucosas, tracto gastrointestinal, etc). Al menos uno.
Artralgia Erupción	3 Trombocitopenia (conteo de plaquetas < 100,000 células/mL.
Manifestaciones hemorrágicas	4 Evidencia de fuga plasmática: hemoconcentración, efusión pleural, ascitis y/o hipo-proteinemia. Al menos uno.
* La Fiebre Hemorrágica por Dengue se categoriza en cuatro grupos: I-IV.	

## 1.2 Virus dengue

El virus dengue (DENV) pertenece al género Flavivirus y a la familia Flaviviridae, se conocen cuatro serotipos del virus: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4; está constituido por ARN genómico de sentido positivo, cadena sencilla rodeado por una nucleocápside de simetría icosaédrica, de 30 nm de diámetro, la cual está constituida por la proteína C (cápside). Esta estructura se encuentra rodeada por una bicapa lipídica de 10 nm de grosor; en la que se encuentran insertadas las proteínas estructurales E que conforma la envoltura y M que forma la

membrana del virus, dando lugar a proyecciones que sobresalen de la superficie de los viriones. El virión completo mide alrededor de 50 nm de diámetro, y tiene forma esférica. El ARN de las partículas virales maduras codifica para una poliproteína, que es posteriormente procesada por enzimas virales y huésped, dando lugar a tres proteínas estructurales (prM/M, E y C) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) figura 3 [11-15].



**Figura 3.** A, Estructura del virus dengue y B, organización del genoma del virus.

## 1.2.1 Proteínas virales

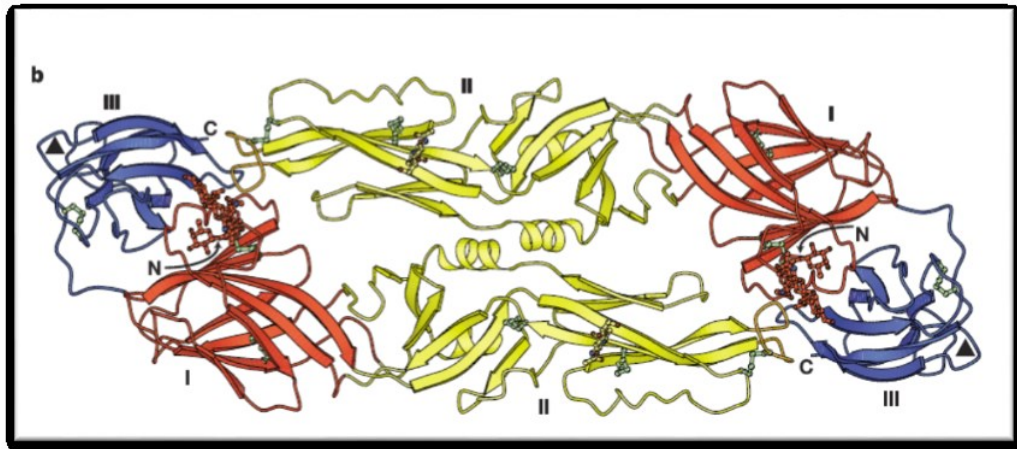
### 1.2.1.1 Proteínas estructurales

**Proteína C.** La proteína de la cápside, también conocida como proteína core o de cubierta, tiene un peso molecular de 11 kDa, aproximadamente. Su estructura secundaria consiste en cuatro alfa hélices que cumplen diferentes funciones: las hélices 3 y 4 son hidrofóbicas y anclan la proteína a la membrana del retículo endoplásmico [14, 15]. La hélice 1, ubicada en el extremo N-terminal de la proteína y orientada hacia el citoplasma, posee aminoácidos de carácter básico que se asocian y unen fuertemente al ARN genómico recién sintetizado; de esta manera, se forma el complejo riboproteico o nucleocápside que protege al ARN viral de la degradación y promueve la organización del ARN en el interior de la partícula viral en formación.

La nucleocápside se estabiliza por la interacción de varios homodímeros antiparalelos de la proteína C, que rodean con gran afinidad y especificidad a la hebra de ARN viral. La hélice 2 posee una naturaleza hidrofóbica que interviene durante el ensamblaje de la ribonucleoproteína y de la partícula viral. En el primer caso, actúa como una bisagra que favorece el acercamiento del ARN viral al resto de la proteína C anclada en la membrana del retículo endoplásmico. Por otro lado, la hélice 2 recluta pequeñas gotas lipídicas (lipid droplets), presentes en el citoplasma, que promueven la formación de la partícula viral. Además, la proteína de la cápside anclada en el retículo endoplásmico interactúa con las proteínas precursoras de membrana (prM) y de envoltura, para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales [16].

**Proteína precursora de membrana (prM) y proteína de membrana (M).** La proteína precursora de membrana (prM) tiene un peso molecular de 26 kDa, está presente en los viriones inmaduros, participa fundamentalmente en el proceso de maduración de la partícula viral. La proteína precursora de membrana es procesada después de la traducción por la proteasa celular furina, que genera, el péptido pr y la proteína M, de 8 kDa. La proteína tiene dos dominios transmembrana y un ectodominio de 40 aminoácidos, aproximadamente [14, 15].

**Proteína de envoltura E.** La proteína de envoltura tiene un peso molecular de 50 kDa, posee tres dominios denominados I, II y III (figura 4), y se distribuye sobre la superficie del virus formando complejos homodiméricos de tipo cabeza-cola. Los dominios II y III de cada uno de las proteínas del homodímero son determinantes para las interacciones entre el virus y los receptores de las células vulnerables. Por otra parte, la glicoproteína E es el principal inmunógeno del virus, por lo tanto estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos neutralizantes. La proteína E es la única proteína viral que interactúa con receptores de la membrana plasmática de las células blanco que favorecen la endocitosis del virus [16].



**Figura 4. Proteína E del virus dengue.** Dominios de la proteína: dominio I en rojo, dominio II en amarillo y dominio III en azul.

### 1.2.2 Proteínas no estructurales

**Proteínas no estructurales.** NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Proteínas no estructurales (NS, non structural proteins) del DENV intervienen en el proceso de replicación del virus que se describe a continuación [14-22].

### 1.3 Células que interactúan con el virus dengue

Ensayos *in vitro* utilizando cultivos celulares primarios humanos indican que varios tipos celulares como hepatocitos, linfocitos B y T, células endoteliales, fibroblastos, células cebadas, células epiteliales y células musculares son blancos potenciales de la infección y la replicación viral, pero poco se sabe de la participación de estas células en la infección y la replicación *in vivo*. Sin embargo, en muy pocos tipos celulares humanos se ha demostrado la infección *in vivo*, entre ellos encontramos a las células mieloides (monocitos, macrófagos y células dendríticas), las cuales son consideradas el principal blanco celular para la replicación del DENV durante la infección [24, 25].

### 1.3.1 Ciclo replicativo del virus dengue

**Entrada y fusión del DENV.** Se ha demostrado que, para favorecer la entrada del virus a las células, participan los glucosaminoglucanos o proteoglucanos presentes en la matriz extracelular o que están asociados a las proteínas de superficie de las células. Los proteoglucanos como el heparán sulfato, por su alta carga negativa, pueden actuar como un receptor primario para favorecer el acercamiento de las partículas virales a la superficie celular y, una vez establecido este acercamiento, facilitarían la interacción del dominio III de la proteína E con proteínas de la superficie para favorecer la endocitosis del virus [13, 14].

En general la interacción del DENV con la célula blanco, ocurre por endocitosis mediada por receptores, en las cuales participan múltiples proteínas transmembranales de la célula del huésped, las cuales tienen alta afinidad por el dominio III de la proteína E del virus. Entre los receptores que se han asociado a la infección se encuentran, CD14, receptores de gamaglobulinas (Fc $\gamma$ R), receptor de manosa (CD206) y principalmente, DC-SIGN (CD209). Estos receptores son expresados en varias poblaciones celulares como células dendríticas, macrófagos y monocitos, entre otros. Cabe destacar que las células dendríticas en su estado inmaduro son las que presentan altos niveles de estos receptores facilitando la unión viral inicial y la entrada del virus a la célula [25].

Una vez que se lleva a cabo la interacción virus-receptor se forma la vesícula endocítica que se transforma en un endosoma temprano y posteriormente en un endosoma tardío, el cual se fusiona con un lisosoma que acidifica el pH de la vesícula [13].

**Replicación de DENV.** Cuando la nucleocápside se halla libre en el citoplasma, se inician los procesos de traducción y replicación del ARN [14].

La replicación del ARN viral es un proceso que no está totalmente entendido; sin embargo, *in vitro* se han detectado tres especies de ARN, denominadas ARN de 20S, 20/28S y 40S, según el valor del coeficiente de sedimentación. Los ARN de 20S conocidos como formas de replicación, no son degradados por las ARNasas y están constituidos por dos cadenas de ARN cada una con polaridad contraria (negativa y positiva). La existencia de las formas de replicación sugiere que estas formas incluyen los intermediarios negativos que actúan como plantilla para la generación de los ARN de sentido positivo. Mientras que los ARN

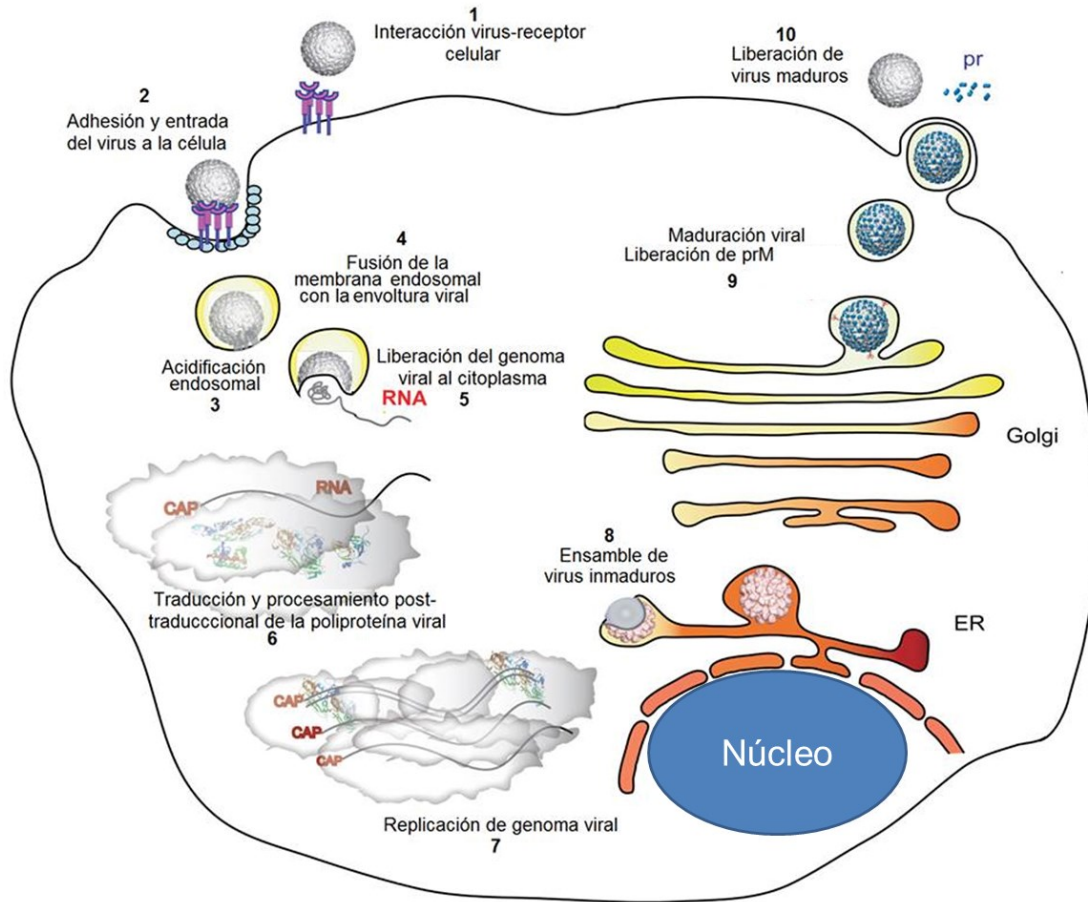
heterogéneos de 20 a 28S, son denominados intermediarios de replicación y corresponden a hebras de ARN de sentido positivo en proceso de elongación [14, 20]. Por último, los ARN de 40S pueden ser degradados por ARNasas y, al parecer, es el ARN genómico encontrado en los virus ensamblados; por lo tanto, estos ARN pueden ser utilizados para la traducción proteica o para conformar, junto con proteína C la ribonucleoproteína, los nuevos viriones.

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

**Ensamblaje, maduración y liberación del DENV.** Los mecanismos que promueven, regulan y coordinan el ensamblaje del virus, no son conocidos completamente. Sin embargo, por microscopía electrónica y criomicroscopía, se ha sugerido que el proceso de ensamblaje de las partículas del DENV sucede en distensiones del retículo endoplásmico denominadas membranas “convolutas”, donde ocurre de forma simultánea la traducción de la proteína y el ensamblaje del virus. El proceso de ensamblaje comienza con la formación de la nucleocápside gracias a la interacción del ARN genómico y la proteína C; sobre esta primera estructura luego se asocian las proteínas prM/M y E, que deben estar inmersas en la membrana del retículo endoplásmico. Posteriormente, suceden dos etapas de maduración de la partícula viral. Primero se organizan de forma heterodimérica las proteínas prM/M y E, en donde la primera recubre a la segunda; este recubrimiento le confiere un aspecto rugoso a la superficie del virus cuando se observa por microscopía electrónica. En el segundo paso, esta partícula inmadura transita desde el retículo endoplásmico hasta las regiones cis y trans del aparato de Golgi, donde se inicia la segunda etapa de maduración. En esta última etapa, los cambios de conformación y de rotación de la proteína E generan homotrímeros antiparalelos de la misma, lo que le da una apariencia lisa a la superficie del virus. Por último, un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína prM/M por la proteasa furina, independiza el péptido pr y la proteína M. Esta nueva modificación estabiliza los homotrímeros de E y mantiene unido al péptido pr [20].

Finalmente, cuando el virus es liberado, el pH neutro del espacio extra-citoplásmico induce el desprendimiento del péptido pr y la proteína E adquiere la conformación final que

puede ser reconocida por las moléculas receptoras de la célula sensible e iniciar un nuevo ciclo de infección en otra célula (figura 5).



**Figura 5. Ciclo viral intracelular del virus del dengue.** El DENV ingresa a la célula mediante endocitosis mediada por receptor, la traducción y replicación ocurre en estructuras membranosas relacionadas con RE, después, las partículas recién ensambladas son transportadas a Golgi, donde termina su maduración y son expulsadas al medio extracelular por exocitosis.

#### 1.4 El sistema inmune y sus componentes celulares

La función esencial del sistema inmune es proteger al organismo de agentes infecciosos y microorganismos presentes en el ambiente. Para ser eficaz, el sistema inmune debe detectar una gran variedad de patógenos, y distinguirlos de las células y tejidos del propio

organismo. En vertebrados, en este sistema de defensa colaboran el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo [26].

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa que limita la infección tras la exposición a microorganismos, y proporciona una respuesta inmediata e inespecífica, pues reconoce y responde a los patógenos de forma genérica y sin conferir inmunidad duradera contra ellos [27]. Este sistema de defensa incluye componentes celulares (células epiteliales, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células NK), moléculas del sistema del complemento y citoquinas. Sus células están equipadas con receptores de reconocimiento de patrones (PRR) comunes entre diversos patógenos, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y señales endógenas asociadas a daño tisular (DAMP). El sistema inmunitario innato es capaz de “activarse” únicamente frente a estas “señales de peligro” detectadas por los PRR de forma específica [28].

Por el contrario, el sistema inmune adaptativo genera respuestas antígeno-específicas y confiere memoria inmunológica tras el primer contacto con el antígeno. La respuesta inmune adaptativa está mediada por componentes celulares (linfocitos T y B) y humorales (anticuerpos). Las células presentadoras de antígeno (APC), en especial células dendríticas y macrófagos, tienen un papel fundamental en la conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, ya que son las responsables de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T en el contexto de las moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC) presentes en su superficie [26]. En consecuencia, el sistema inmune innato tiene como segunda función estimular y polarizar la respuesta inmunitaria adaptativa con objeto de optimizar la eliminación del patógeno y minimizar los daños tisulares colaterales [29].

#### **1.4.1 Monocitos-macrófagos**

Los monocitos son heterogéneos en términos de morfología, marcadores de superficie y capacidad fagocítica, y exhiben una elevada plasticidad en su proceso de diferenciación, que es tejido y/o estímulo dependiente. La plasticidad del sistema de diferenciación mieloide se refleja en la capacidad de transdiferenciación que exhiben los distintos tipos celulares derivados de monocitos. Los monocitos se desarrollan en la médula ósea y circulan por la sangre, al recibir la señal apropiada dejan a esta última y emigran por el endotelio de los capilares o las vénulas, en el compartimiento del tejido conectivo maduran hasta convertirse en macrófagos.

Así, por ejemplo, a partir de monocitos se pueden diferenciar *in vivo* e *in vitro* macrófagos y células dendríticas, por características y propiedades fenotípicas y funcionales distintas entre ellas [30-34].

#### 1.4.2 Células dendríticas

Las células dendríticas (DC's) humanas, son una población heterogénea en cuanto a fenotipo, localización anatómica y función. Las DC's se distribuyen prácticamente en todos los tejidos, y las circulantes representan solamente un 0.5% del total de las células mononucleares de sangre periférica. En función de su linaje o de su estado de activación (inmaduras o maduras), tienen la capacidad de iniciar una respuesta inmunitaria o promover tolerancia en las células efectoras o linfocitos T [35].

En ausencia de procesos inflamatorios, las células dendríticas se encuentran en estado inmaduro (iDC's), y se caracterizan por ser células principalmente fagocíticas. Las iDC's residen en los tejidos periféricos y constantemente sensan el microambiente capturando antígenos propios y extraños mediante macropinocitosis y fagocitosis de manera constitutiva a través de la proyección de pseudópodos y la formación de grandes vacuolas intracelulares [36, 44].

Sería importante explicar cuáles son las diversas poblaciones de dendríticas y que dependen de su origen, haciendo una relación con respecto al modelo que elegiste para generar CD ¿de qué tipo serían? Y esto último también retomarlo cuando hablas de los receptores que expresan

Las distintas subpoblaciones de iDC's, expresan selectivamente una gran variedad de receptores endocíticos [45-47]. Entre ellos, se pueden mencionar:

- **Receptores lectina de tipo C (CLR)**, que permiten el reconocimiento de antígenos glicosilados presentes en células eucariotas y procariotas.
- **Receptores para el fragmento Fc (FcRs)** de las inmunoglobulinas (Ig), que permiten la endocitosis de complejos inmunes (CI) antígeno-anticuerpo.
- **Receptores para componentes del complemento** a través de los cuales internalizan microorganismos opsonizados y células apoptóticas.

- **Receptores “scavenger”** (RSs) capaces de reconocer cuerpos apoptóticos, lipoproteínas propias y diversos componentes presentes en bacterias y parásitos.
- **Receptores de tipo Toll** (TLRs), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

Ante la detección de señales de peligro en el microambiente, ya sea por reconocimiento directo a través de los receptores endocíticos o, indirectamente mediante el reconocimiento de distintos mediadores de la respuesta inflamatoria, las iDC's responden incrementando sus procesos de endocitosis y procesamiento, e inician el proceso de maduración. A diferencia de los macrófagos (principales células fagocíticas) que degradan casi completamente las moléculas endocitadas, las iDC's conservan parcialmente el producto de la endocitosis, mediante la regulación del pH en los compartimentos fagosomales/endosomales. Estos mecanismos permiten limitar el rango de antígenos que serán presentados así como “preservar” la información endocitada [48, 49].

Posterior a la detección de señales de peligro, las DC's inmaduras se activan y migran hacia los ganglios linfáticos, donde juegan un papel importante en la activación de los linfocitos T. La activación de las iDC's induce un proceso que involucra diversas etapas denominadas “maduración” es necesario destacar que es un proceso que ocurre de manera continua y coordinada, y que transforma a las DC's en células presentadoras de antígenos altamente eficientes para estimular linfocitos T [49]. Durante este proceso, se reduce la capacidad de las DC's de captar antígenos, mediante una disminución de la actividad macropinocítica y fagocítica, así como también mediante la disminución de la expresión de receptores antigénicos [50].

Las células dendríticas maduras (mDC's) expresan citocinas y altos niveles de moléculas co-estimulación tales como CD40, CD80, CD83 y CD86, además presentan un aumento importante en la expresión de complejos péptido antigénico/MHC (MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad). Este incremento, si bien se encuentra asociado a una mayor síntesis de las moléculas MHC II, se debe fundamentalmente, a la relocalización de dichas moléculas en la superficie celular desde el compartimento endosomal [43, 50-52].

Asimismo, se incrementa la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, ligando de las quimiocinas CCL19 y CCL21. Estas quimiocinas son expresadas por células endoteliales linfáticas y venas del endotelio alto de las zonas T de los órganos linfáticos secundarios sitios a los cuales se dirigen las células dendríticas en proceso de diferenciación [53].

El proceso de maduración también induce cambios en la morfología celular, que incluyen la pérdida en la capacidad de adhesión, la reorganización del citoesqueleto y la adquisición de movilidad. Ésta última, es una característica sobresaliente de las mDC's, siendo las quimiocinas, aquellas que tienen un rol fundamental, debido a que regulan la migración de las DC's hacia los ganglios linfáticos. No obstante, se ha reportado también que las iDC's son capaces de migrar en ausencia de un proceso inflamatorio, indicando que los procesos de maduración y de migración podrían estar regulados como eventos independientes [49-54].

### **1.4.3 Citocinas y su papel regulador en la respuesta inmune**

Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmune e inflamatoria, intervienen como factores de crecimiento de distintas células, entre las cuales y de forma destacada, las células hematopoyéticas. Dentro del grupo de las citocinas se incluyen las interleucinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN), los factores estimuladores de colonias (CSF) y las quimiocinas [55].

Las citocinas actúan como reguladores sistémicos a concentraciones del orden de nano o picomoles, modulando la actividad de un amplio espectro de tipos celulares, las citocinas pueden actuar como factores de crecimiento locales, a través de un mecanismo autocrino (sobre la propia célula), paracrino (sobre una célula vecina), yuxtacrino (implicando interacciones intercelulares) o retrocrino (a través de formas solubles de ciertos receptores de membrana) [56].

En cualquier caso, la función biológica de las citocinas se produce a través de su interacción con receptores de membrana específicos que desencadenan una cascada de reacciones bioquímicas en el interior de la célula diana que determina su acción biológica [55-57].

#### **1.4.3.1 IL-10**

Tiene una importante función biológica sobre las DC's y macrófagos, es un potente inhibidor de la presentación de antígenos y tiene un potente efecto inhibitorio sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$  en DC's y macrófagos. La función fundamental de esta citocina es suprimir la respuesta inmune, pero también promueve efectos estimulantes al favorecer la activación de los linfocitos B. Algunos grupos de trabajo han encontrado un papel de esta citocina en el desarrollo de patogénesis durante la infección por DENV [58-60].

#### **1.4.3.2 INF- $\gamma$**

Los INF son muy bien conocidos por sus funciones en los mecanismos de defensa del hospedero. El INF- $\gamma$  ejerce efectos inmunorreguladores, anti-proliferativos y pro-inflamatorios, es producido fundamentalmente por linfocitos T activados, células dendríticas y células NK. La función reguladora de esta molécula principalmente deriva en células presentadoras de antígeno, linfocitos B y T, ya que aumenta la expresión de moléculas del MHC en las células presentadoras de antígeno además de que tiene efectos sobre la proliferación y diferenciación de las células B y T [61-64].

En la infección por DENV se describe una relación entre niveles elevados de INF- $\gamma$  y la gravedad de la enfermedad por varios autores, también se ha encontrado que tiene un papel en el control de la infección [65, 66].

#### **1.4.3.3 TNF**

El factor de necrosis tumoral, también conocido como canectina, juega un papel importante en la inflamación, apoptosis y desarrollo de la respuesta inmune. Es producido por una amplia variedad de células epiteliales y del sistema inmune. El TNF induce la activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular lo que lleva al reclutamiento de células inflamatorias, inmunoglobulinas y sistema del complemento, provocando la activación de linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetaria y probablemente la oclusión vascular sea la causa de necrosis tumoral. Además TNF- $\alpha$  regula el desarrollo del tejido linfoide a través del control de la apoptosis. Algunos grupos de trabajo encuentran a TNF- $\alpha$  involucrado en la patogénesis y gravedad de la infección por DENV [67-69].

#### **1.4.4 Moléculas de superficie en células dendríticas**

Las moléculas de superficie contribuyen a la función de las DC's tanto en la unión célula-célula como en la señalización. Como se mencionó anteriormente las distintas poblaciones de DC's, presentan una marcada heterogeneidad en la expresión de sus moléculas de superficie [70].

##### **1.4.4.1 Moléculas de caracterización**

###### **1.4.4.1.1 CD1a**

Las moléculas CD1 son un grupo de moléculas pertenecientes al complejo principal de histocompatibilidad, que participan en la presentación a las células T de una amplia variedad de antígenos lipídicos y lipoproteicos. Se expresan en la superficie celular como heterodímeros compuestos por una cadena polipeptídica pesada unida no covalentemente con  $\beta$ 2-microglobulina. A diferencia de las MHC de clase I y II, las moléculas de la familia CD1 no son polimórficas [71].

Las moléculas CD1a pertenecen a la familia CD1 y se encuentran principalmente expresadas en células dendríticas y timocitos corticales. En este trabajo, CD1a ha sido utilizado como marcador de diferenciación de células dendríticas derivadas de monocitos.

###### **1.4.4.1.2 CD14**

Es una glicoproteína unida a la membrana celular mediante un enlace glucofosfatidilinositol (GPI) y se encuentra expresado predominantemente en células mieloides. Es un receptor de alta afinidad para el complejo formado por lipopolisacárido (LPS) y la proteína de unión a LPS (LBP) y funciona como un correceptor para TLR 4. Las células dendríticas derivadas de monocitos, expresan bajos niveles de CD14 [72]. En este trabajo, la baja expresión de CD14 fue utilizada como parámetro de diferenciación de las DC's.

###### **1.4.4.1.3 CD83**

Es una glicoproteína transmembranal perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Su expresión ha sido ampliamente utilizada como marcador de DC's maduras. Algunos estudios sugieren que estaría involucrado en la activación de los linfocitos T, sin embargo, todavía existe cierta controversia sobre su rol específico [71, 72].

#### 1.4.4.2 Moléculas de co-estimulación CD80 y CD86

Las moléculas CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) poseen una región extracelular con dos dominios tipo Ig (uno variable y otro constante), una porción transmembrana y una cola citoplasmática corta. Numerosos estudios han demostrado que las moléculas CD80 y CD86 expresadas en la superficie de células presentadoras de antígeno son las responsables de proveer *in vitro* e *in vivo* las señales de co-estimulación para regular la activación de células, esto debido a que poseen especificidad de unión por los receptores CD28 presentes en linfocitos T tal como se muestra en la figura 6 [73].

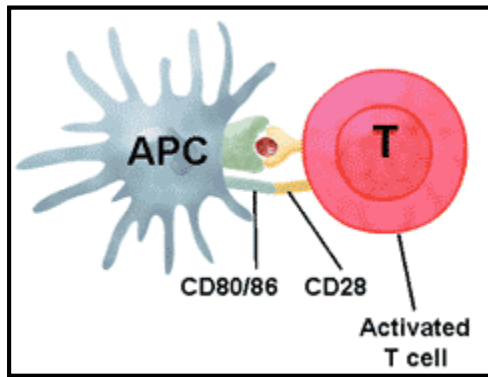


Figura 6. Señales de co-estimulación para células T.

CD80 y CD86 comparten sólo el 25% de homología en la secuencia, especialmente en la cola citoplasmática, donde CD86 tiene 3 sitios potenciales de fosforilación por la PKC, indicando que esta molécula puede tener propiedades de señalización.

La presencia de CD80 ha sido documentada en células B, células dendríticas, células de Langerhans, monocitos activados, linfocitos T y una variedad de líneas tumorales. Aunque todavía no es claro el papel de los ligandos de la familia B7 en las células T, un hallazgo reciente es que los linfocitos T de memoria humanos expresan una forma funcional de CD86 que puede co-estimular las respuestas de las células T vírgenes. [73, 74].

### **1.4.4.3 Moléculas de presentación de antígeno**

Los linfocitos T reconocen antígenos solo en forma de péptidos mostrados por los productos de genes propios del MHC en la superficie de APC. Las APC especializadas, como las DC's capturan antígenos, los interiorizan, los procesan y muestran los péptidos asociados a la clase II a los linfocitos T CD4+ [75].

El MHC es una región génica que codifica moléculas de las clases I y II del MHC, así como otras proteínas. La función de MHC I y II es unirse a antígenos peptídicos y mostrarlos para su reconocimiento por los linfocitos T específicos frente al antígeno. Los antígenos peptídicos asociados a las moléculas de la clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8+, mientras que los antígenos peptídicos asociados a la clase II son reconocidos por los linfocitos T CD4+. Cada molécula del MHC tiene una amplia especificidad por los péptidos que tienen características estructurales comunes, como aminoácidos de anclaje [76-78].

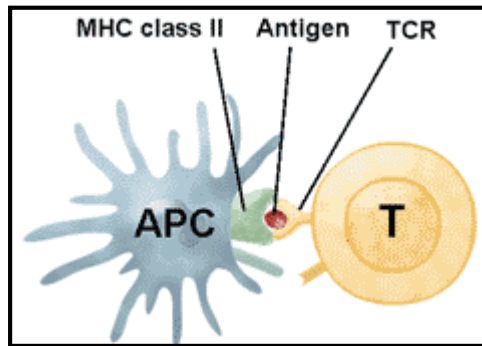
La expresión de productos génicos del MHC aumenta con estímulos inflamatorios particularmente citocinas como INF- $\gamma$ , que estimulan la transcripción de genes del MHC.

El MHC humano también es llamado HLA (Antígeno Leucocitario Humano), los genes de la clase I del HLA humano se describieron por primera vez mediante métodos serológicos. Los genes de la clase II se identificaron realizando una reacción de mezcla de linfocitos y existen tres: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR [79].

#### **1.4.4.3.1 HLA-DR**

El HLA-DR se expresa en la superficie de las células presentadoras de antígenos humanas, células dendríticas, incluidos los linfocitos B, los monocitos y macrófagos. HLA-DR es una proteína transmembranaria heterodimérica compuesta de subunidades alfa y beta, y desempeña un importante papel en la presentación de los péptidos a los linfocitos T (figura 7) [80].

El péptido antigénico se aloja en una hendidura formada por los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , mientras el reconocimiento del MHC-II por parte del linfocito T cooperador se hace en la cadena  $\beta 2$ . En esta hendidura conformada por las regiones  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , se presentan péptidos de entre 12 y 16 aminoácidos [81].



**Figura 7. Presentación de antígenos a linfocitos T**

#### **1.4.4.3.2 CTLA-4**

El antígeno asociado al linfocito T citolítico (CTLA-4), es la principal molécula inhibidora implicada en la regulación negativa de la activación de los linfocitos. CTLA-4 es expresada principalmente en la superficie celular de los linfocitos T activados, no obstante, varios estudios han demostrado la expresión del gen CTLA-4 en otro tipo de células, incluyendo células dendríticas, linfocitos B, monocitos, granulocitos. En los linfocitos T activados, CTLA-4 utiliza dos mecanismos inhibitorios diferentes, uno de ellos es la transmisión de una señal negativa a través de su región intracelular, y el segundo es el antagonismo competitivo de la señal coestimuladora mediada por CD28 [82-85].

### **1.5 Receptores en células dendríticas**

Como se mencionó anteriormente las DC's expresan una gran variedad de receptores, que se asocian principalmente con la alta capacidad que tienen para capturar y presentar antígeno, a continuación se describen los receptores que son de importancia para el presente trabajo.

#### **1.5.1 Receptor CD32**

El receptor CD32 (FcγRII) es una glicoproteína de 40 kD con capacidad de unir complejos de IgG con una constante de afinidad baja. Se han identificado tres genes, FcγRIIA, B y C, localizados en el cromosoma 1q 23-24, los cuales codifican para seis isoformas de este receptor FcγRIIA1, A2, B1, B2, B3 y C1. Se expresa en la superficie de monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, células B y plaquetas. El entrecruzamiento de varios de estos receptores con inmunocomplejos provoca la activación de

la célula respectiva, que en el caso de las células fagocíticas supone un aumento de esa actividad fagocitadora, y en el caso de las plaquetas, un aumento de la trombosis [86, 87].

Estudios recientes indican que CD32 interviene en la potenciación de la infección por DENV en líneas celulares y células humanas generadas in vitro. Sin embargo poco se ha descrito acerca de la influencia de las vías de señalización intracelular [88].

### **1.5.2 Receptores tipo lectina**

Las lectinas son proteínas que reconocen de manera específica carbohidratos presentes en antígenos propios y patógenos. En vertebrados, las lectinas se clasifican en diferentes subgrupos, siendo los receptores lectina de tipo C uno de los mejor estudiados. Los CLR se caracterizan por tener al menos un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) a través del cual unen carbohidratos de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los CLR pueden ser proteínas solubles o proteínas transmembranales, y se han definido subgrupos en función de su homología de secuencia, estructura y disposición del CRD respecto al resto de la molécula. Un subgrupo engloba lectinas solubles, y otro lectinas de membrana que de acuerdo al número de CDR son de tipo I (Contienen de 8 a 10 CLR) por ejemplo CD205 (DEC-205) y CD206 (receptor de manosa), o tipo II (Contienen un solo dominio CLR), como CD209 (DC-SIGN) [89-93].

### **1.5.3 Receptor CD205**

El receptor CD205 (DEC-205) tiene un peso molecular de 205 KDa que contiene 10 CLR, se expresa preferencialmente en DC's, monocitos, células epiteliales de la corteza del timo, aunque también se puede encontrar en células B, células T. Es homólogo al receptor de manosa en macrófagos. Algunos autores han realizado experimentos y encuentran que la función presentadora de antígeno en DC's está asociada con un alto nivel de DEC-205, debido a su alta expresión es empleado como marcador de fenotipo en iDC's [93-95].

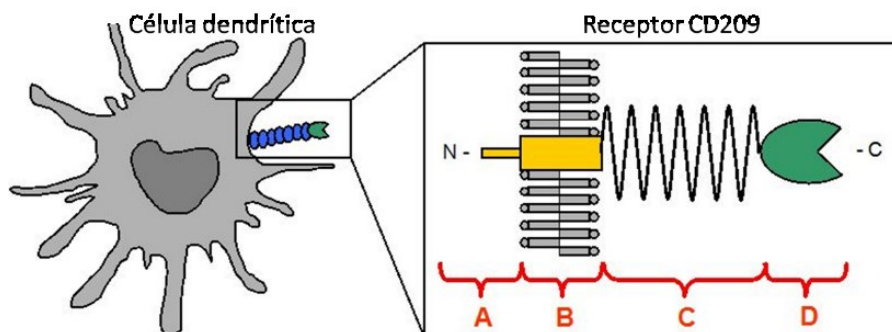
### **1.5.4 Receptor CD206**

El receptor CD206 o receptor de manosa, es una proteína transmembrana de 175 kDa, recibe su nombre por su capacidad para reconocer de manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  moléculas con residuos de manosa, fucosa y N-acetilglucosamina en la porción terminal. Se expresa específicamente en macrófagos también en células dendríticas y una gran variedad de células

endoteliales y epiteliales [44]. Posee un CRD, ocho CTL (de los cuales del CTL-4 al -8 son funcionales), un dominio intermembrana y una porción intracelular de 45 aminoácidos [88, 95].

### 1.5.5 Receptor CD209

El receptor CD209 inicialmente fue denominado DC-SIGN (Por sus siglas en inglés; Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-Integrin), la cual es una proteína de membrana tipo-II con un dominio extracelular de lectina tipo C (lectina  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente). El CD209 es una proteína integral de membrana tipo II de 404 aminoácidos con un extremo carboxilo terminal. La proteína está organizada en cuatro dominios distintos: un dominio citoplasmático N-terminal que contiene señales de internalización, un dominio transmembranal hidrofóbico, una región  $\alpha$ -helicoidal y un dominio de reconocimiento de carbohidratos que puede interactuar dependiente de calcio con una variedad de patógenos (figura 8). El receptor CD209 es expresado principalmente por células dendríticas localizadas en sitios de exposición a antígenos como tejidos mucosos del intestino (duodeno y colón), vesícula biliar, cérvix, vagina, endometrio, bronquios pulmonares, esófago y mucosa bucal, además de sangre periférica [96-98].



**Figura 8. Estructura del receptor CD209.** El receptor se compone de: A) Dominio citoplasmático, B) Dominio transmembranal, C) Región  $\alpha$ -helicoidal y D) Dominio de reconocimiento de carbohidratos.

Todas las lectinas calcio dependientes son proteínas de membrana que actúan como receptores de adhesión a la célula y están involucrados en regulación de las vías de señalización, además de reconocer estructuras específicas de carbohidratos presentes en patógenos. Esta proteína de membrana, funciona como receptor de muchos virus, como el virus dengue, virus del Ébola, VIH, citomegalovirus (CMV), virus de hepatitis C (VHC), entre otros; además de bacterias, levaduras y otros parásitos [34]. El receptor CD209 tiene como función de mediar en la unión de las células T con las DC's a través de moléculas de adhesión (ICAM-3, moléculas de adhesión intercelular-3); además, también regula la migración trans-endotelial de las células dendríticas, a través del ICAM-2 (moléculas de adhesión intercelular-2), desde el endotelio vascular hasta el tejido linfoide [99-102].

#### **1.5.5.1 Función y señalización**

El receptor CD209 es probablemente la lectina con el mayor rango de ligandos descrito, siendo capaz de actuar como receptor de adhesión celular y de reconocer estructuras de carbohidratos presentes en antígenos propios y en patógenos. Presenta una alta afinidad por carbohidratos con dimanosas terminales y estructuras internas de manosas ramificadas (manotriosas  $\alpha 1 \rightarrow 3$ ,  $\alpha 1 \rightarrow 6$ ), y por carbohidratos que contienen fucosa, en concreto por los trisacáridos que constituyen los antígenos de los grupos sanguíneos de Lewis (Lex, Ley, Lea, Leb). Como receptor de patógenos, CD209 interacciona con sus PAMP y el complejo CD209-patógeno se internaliza, promoviendo el procesamiento y la posterior presentación de antígenos a los linfocitos T, para acabar induciendo respuestas inmunitarias frente a dichos microorganismos [98, 102].

El receptor CD209 es capaz de transmitir señales intracelulares específicas tras su interacción con carbohidratos presentes en patógenos, señales que a su vez se interrelacionan con las señales procedentes de TLR. En función de la naturaleza del carbohidrato reconocido por CD209 las células secretan un patrón diferente de citocinas [99-103].

Así, la unión de patógenos que expresan manosas en su superficie, como M. tuberculosis o HIV-1, conduce a un aumento en la producción de IL-10, IL12 e IL-6 de forma dependiente de Raf-1 [104].

Sin embargo, la unión de ligandos que contienen fucosa, como Ley de *H. pylori*, disminuye la secreción de IL-12 e IL-6 de manera dependiente de Raf-1 mientras que se incrementa la producción de IL-10 de forma independiente de Raf-1. El mecanismo molecular responsable del aumento en la producción de IL-10 de forma Raf-1-dependiente implica la posterior acetilación de p65 de NFκB, que conlleva a un incremento en la actividad transcripcional de IL-10. Por otro lado, la activación de ERK en la ruta de señalización de CD209 parece ser dependiente del ligando involucrado. Así, la activación de CD209 con anticuerpos específicos frente al CRD, la unión de gp120 de HIV-1, o la unión del alérgeno Ara h1, induce fosforilación de ERK1/2 [96, 107].

### **1.6 Respuesta inmune e inmunopatología de la enfermedad**

Los mecanismos de patogénesis por DENV no están bien definidos, no obstante, varios factores se relacionan con para su desarrollo: 1) factores virales, tales como la virulencia de la cepa y 2) factores del hospedero, tales como la respuesta inmune y sus características genéticas. Dentro de la respuesta inmune asociado a la severidad de la enfermedad se han definido: la respuesta cruzada en infecciones secundarias, y la producción excesiva de citocinas de tipo inflamatorio (IFN-γ, TNF, IL-6, IL-8, IL-10, etc.) inducida por la sobre estimulación de macrófagos y células dendríticas [108].

La infección con un serotipo del virus dengue brinda inmunidad homotípica de por vida. Los mecanismos de respuesta inmune innata y adaptativa parecen estar involucrados en la protección contra la enfermedad y en la recuperación de la infección. La secreción de INF-α e INF-β por las células infectadas y las células NK activadas son procesos de las fases tempranas de la infección que previenen la diseminación del virus y se asocian a un cuadro clínico benigno.

Las DC's activadas secretan citocinas (INF-α, TNF-α, IL-12, IL-10) y presentan antígenos virales a los linfocitos T CD4+. Como ya mencionamos anteriormente el DENV entra a las células blanco (principalmente células dendríticas, monocitos) a través de receptores específicos y se ha observado que el virus parece inducir una producción aumentada de IL-12 [109-111].

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados por los péptidos presentados en moléculas de clase II del MHC proliferan y secretan citocinas que polarizan la respuesta hacia las células efectoras más adecuadas para la eliminación del patógeno, T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 (Th17) o incluso células T reguladoras (Treg). Como en las células dendríticas humanas infectadas con el DENV no hay inducción de la producción de IFN- $\alpha$  queda afectada también la capacidad de activación de células T naive hacia una respuesta de tipo Th1.

Además, se ha reportado que las células dendríticas infectadas con el virus del DENV-2 son incapaces de inducir la diferenciación de la población de células CD4<sup>+</sup> productoras del IFN- $\gamma$ . En los pacientes con FD se presenta activación celular de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> desde el momento de la manifestación de los síntomas, aunque se ha encontrado que muy pocos linfocitos CD8<sup>+</sup> son específicos y que además están programados para apoptosis. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que son específicos para las proteínas del DENV responden a la activación produciendo IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , además de expresar el marcador de desgranulación CD107a en la superficie celular y exhibir actividad citotóxica *in vivo* [112-115].

En las infecciones secundarias es clara la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria con reactividad cruzada entre los diferentes serotipos. Adicionalmente, se ha documentado que durante el periodo de defervescencia ocurre una apoptosis significativa de las células mononucleares de sangre periférica en los pacientes con FHD [117-121].

Las células T ejercen dos funciones principales:

- Producción de citocinas (INF- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) que tienen un papel crucial en la regulación de las funciones inmunológicas, el desarrollo de una respuesta antiviral eficaz y la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, macrófagos y células B.
- Lisis de las células infectadas.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son capaces de eliminar las células infectadas por mecanismos citotóxicos, lo que contribuye a la recuperación de la infección.

Las células B activadas por virus producen anticuerpos que median las funciones de neutralización del virus extracelular al bloquear la unión o fusión de la envoltura viral a su receptor en la membrana plasmática celular, pero también son capaces de mediar la eliminación de células infectadas por virus a través de un mecanismo de citotoxicidad celular o de citolisis

mediada por complemento. La presencia de anticuerpos neutralizantes al serotipo viral o anticuerpos mediadores de citotoxicidad celular se han asociado a mejor curso clínico de la infección. Además los anticuerpos IgM e IgG se unen a los antígenos virales solubles y favorecen la eliminación a través de la circulación por células fagocíticas [121-125].

La patogenia de la FHD es compleja y existen dos propuestas que son apoyadas por evidencias de laboratorio y epidemiológicas: una propone que se encuentra involucrada la respuesta inmune frente a una infección secundaria contra la virulencia del virus, ambas como factores determinantes en la progresión hacia las formas severas de la infección por DENV. La más aceptada es la infección secundaria que genera el fenómeno de ADE (potenciación mediada por anticuerpos), una infección con un serotipo de DENV induce la formación de anticuerpos heterotípicos que reaccionan cruzadamente con el resto de los serotipos. Estos anticuerpos heterotípicos en concentraciones subneutralizantes son capaces de reconocer epítopes presentes en los virus y al formar inmunocomplejos facilita la entrada en monocitos y/o macrófagos. Se plantea que la infección se amplifica, pues los inmunocomplejos pueden acceder con más facilidad a los receptores Fc, favoreciendo que un mayor número de células sean infectadas [122-133].

El fenómeno de ADE ha sido asociado a un cambio en el tropismo celular del virus y a un aumento del número de células infectadas y en consecuencia una mayor producción de virus. Las células infectadas liberan mediadores que participan en la permeabilidad vascular, el choque hipovolémico y la muerte. Ensayos in vitro han demostrado que la interacción entre la región Fc del anticuerpo y el receptor CD32 son necesarias para que tengan lugar el fenómeno de ADE. Se ha evidenciado en modelo de ratones que, tras ser infectados estos animales por DENV eran capaces de desarrollar un aumento de la permeabilidad vascular ocasionando la muerte, esto causado por el fenómeno de ADE [134].

La importancia de ADE en el desarrollo de la FHD y SCD ha sido sustentada por evidencias epidemiológicas; sin embargo, no se ha logrado elucidar por completo la descarga de citocinas o la activación de las células efectoras que caracterizan la enfermedad. Una regulación inadecuada de los linfocitos T se asocia a la estimulación heterotípica de estas durante la infección secuencial [135, 136]. Clones de linfocitos T de memoria de reactividad cruzada se

expanden preferentemente durante una infección secundaria al tener un menor umbral de activación, conduciendo a una elevada producción de citocinas.

Niveles elevados de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se han asociado significativamente a la gravedad de la enfermedad y se correlacionan con la activación de los linfocitos T. También se han encontrado aumentados durante la infección los marcadores de activación de linfocitos T como CD69, CD38 y CCR7,. Se ha corroborado un aumento en la activación de linfocitos T CD8+ efectores, los cuales son importantes en el control de la infección viral, sin embargo, una intensa proliferación de estas células se ha implicado en la patogénesis de DENV [137, 140].

Una cascada de citocinas (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, RANTES, MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)) con acción proinflamatoria o anti-inflamatoria, contribuyen a complicaciones de la FHD/SCD como la fuga capilar, al actuar directamente sobre la permeabilidad de las células endoteliales vasculares. Los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-10 parecen estar involucrados en la patogénesis de la trombocitopenia y las manifestaciones hemorrágicas [118-125].

Por otra parte varios autores han defendido el papel de la respuesta Th2 en la patogénesis de la FDH. Un cambio de respuesta Th1 predominante en el 66% de los pacientes de FD a respuesta Th2 dominante en el 71% de los pacientes con FHD grado IV, por otra parte algunos estudios han demostrado que en FDH IV hay un incremento máximo de los niveles de IL-4, IL-6 e IL-10, mientras que los niveles más altos de INF- $\gamma$  fueron detectados en los pacientes con FD [128, 129].

Se ha sugerido la acción de inmunocomplejos Ig-proteína NS1 en la activación del complemento y la liberación de C3a y C5a, con efecto directo sobre la permeabilidad vascular. Anticuerpos específicos de las proteínas E, NS1, prM son capaces de reconocer de forma cruzada plaquetas y endotelio vascular y ser causantes de daños a través de citotoxicidad o apoptosis, se ha explicado este fenómeno a partir de un mimetismo molecular entre las proteínas virales y factores de la coagulación, plasminógeno y moléculas de adhesión expresadas sobre plaquetas y células endoteliales [137].

## 1.7 Participación de células dendríticas en la infección por dengue

La infección se inicia cuando un mosquito hembra *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus* infectado deposita partículas virales, las cuales entran en contacto con las células dendríticas de la piel, realizándose una interacción del DENV con receptores de las células blanco [98].

En el humano el virus del dengue se une a receptores celulares a través de la proteína E del virus que inducen su incorporación por alguna de las vías endocíticas de la célula. Son múltiples los estudios que se han realizado con el fin de caracterizar los receptores celulares para el DENV, hasta ahora se han propuesto varios receptores, siendo el más importante el CD209 ya que interacciona con el dominio III de la proteína E [144].

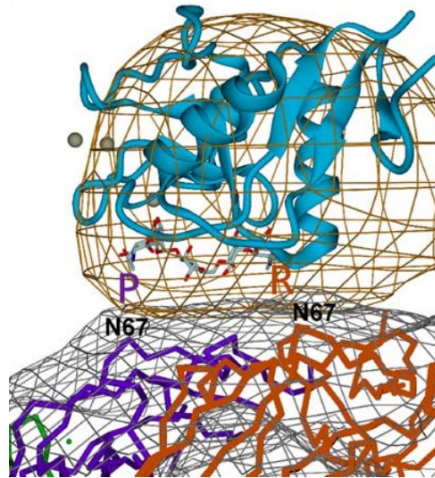
Otro factor de importancia en células dendríticas infectadas es la producción de citocinas, también responsables de la modificación del microambiente celular para la correcta activación de linfocitos. Cuando los macrófagos y células dendríticas son activadas por el virus dengue se induce la síntesis y liberación de citocinas pro-inflamatorias causando daño en el endotelio y problemas de coagulación, desencadenando un dengue severo. Estudios en pacientes han demostrado han demostrado que en una infección con dengue hay incremento en la expresión de citocinas como IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  las cuales se han detectado principalmente en pacientes con FHD [138].

## 1.8 Papel del receptor CD209 en la infección de virus dengue en células dendríticas

El CRD reconoce estructuras de carbohidratos específicas como N-glicanos presentes en el VIH. El receptor CD209 es muy estudiado como blanco para los fármacos antivirales, ya que juega un papel fundamental durante la infección, mediante la interacción con glicoproteínas, presentes en la superficie del agente patógeno [99-102].

La interacción del DENV con CD209, tiene un papel importante ya que regula la respuesta inmune innata para activar la respuesta inmune adaptativa mediante la interacción ligando-receptor que se lleva a cabo por el reconocimiento de manosas presentes en el dominio III de la proteína E del DENV a través de su CRD. La proteína E del DENV posee dos sitios potenciales de glicosilación ligada a N, es la única glicoproteína en la superficie de DENV y es responsable de la interacción con DC-SIGN, tal como se muestra en la figura 9 [150].

Una vez que se lleva a cabo la interacción virus-receptor se forma la vesícula endocítica que se transforma en un endosoma temprano y posteriormente en un endosoma tardío, el cual se fusiona con un lisosoma que acidifica el pH de la vesícula. El cambio de pH induce los cambios de conformación del dominio II de la proteína E, que favorecen la exposición y el anclaje inmediato del péptido de fusión a la membrana de la vesícula, lo que conlleva finalmente a la liberación de la nucleocápside al citoplasma [144].



**Figura 9. Formación del complejo DENV-CRD.** En azul se presenta el dominio CRD de CD209, en naranja, morado y verde la proteína del DENV, mostrando a la N 67 como un aminoácido necesario para se lleve a cabo la interacción virus-receptor. Tomado de..

Algunos grupos de investigación han hecho microscopía electrónica de la interacción de la proteína E de DENV y el dominio CRD del receptor CD209, esta interacción se ha corroborado mediante estudios *in silico* por el método de Docking proteína-proteína encontrando que en la interacción la proteína de E de DENV-CD209 hay interacción entre aminoácidos por enlaces de hidrógeno, estos estudios muestran que en la interacción de la proteína E y el CD209 hay un aminoácido crucial para que se lleve a cabo esta interacción la N 67 (Asparagina 67) de la proteína E [144, 150].

Estudios *in vitro* muestran que las células dendríticas se activan al entrar en contacto con agentes patógenos, induciendo la expresión altos niveles de moléculas de presentación, co-estimulación (MHC I, MHC II, CD80, CD83, CD86, etc.) y citocinas, sin embargo, la

activación pudiera verse comprometida, esto dependiendo del agente patógeno, alterando así la correcta activación del linfocito. Algunos estudios *in vitro* en líneas celulares monocíticas muestran que se observa un incremento significativo de CD83 y CD80 a las 48 horas de infección con DENV-1 y lo que concluyen es que el virus induce la activación de estas células [148].

Por otro lado, estudios *in vitro* demuestran que el virus dengue (4 serotipos) puede infectar células dendríticas inmaduras por la interacción con el receptor CD209, además de que se observa una disminución de la expresión del receptor durante la infección [48, 101], sin embargo la activación de las células dendríticas puede encontrarse alterada por la entrada de virus a la célula vía receptor CD209 por lo que en el presente trabajo se evaluó la expresión de moléculas que determinan el estado de activación de DC's.

## 1.9 JUSTIFICACIÓN

El dengue es un problema de salud pública en México y el mundo. En México el virus dengue se encuentra ampliamente distribuido en todo el País. Debido a que no existe una terapia antiviral específica y una vacuna eficiente es importante seguir estudiando los factores que desencadenan la patogénesis de dengue, esto a través del estudio de sus principales células blanco en el humano.

Las células dendríticas son las células blanco del virus dengue y son muy importantes en el desarrollo de la respuesta inmune (innata y adaptativa), estas células interactúan con el virus dengue por medio de receptores específicos principalmente el CD209. La patogénesis de infección por dengue no está bien definida y la interacción con las principales células blanco nos proporciona información valiosa para entender sus mecanismos de evasión, por lo tanto es necesario determinar la importancia del receptor CD209 en células dendríticas durante la infección por dengue y su participación en el proceso de activación celular.

## **1.10 HIPÓTESIS**

El estímulo de anti-CD209 en células dendríticas previo a la infección con DENV-2 disminuye la expresión de moléculas de co-estimulación, y la producción de citocinas proinflamatorias.

## **1.11 OBJETIVOS**

### **1.11.1 Objetivo general**

Determinar cambios en las moléculas de co-estimulación, presentación de antígeno, receptores, citocinas y título viral en células dendríticas con anti-CD209 e infección con virus dengue serotipo 2.

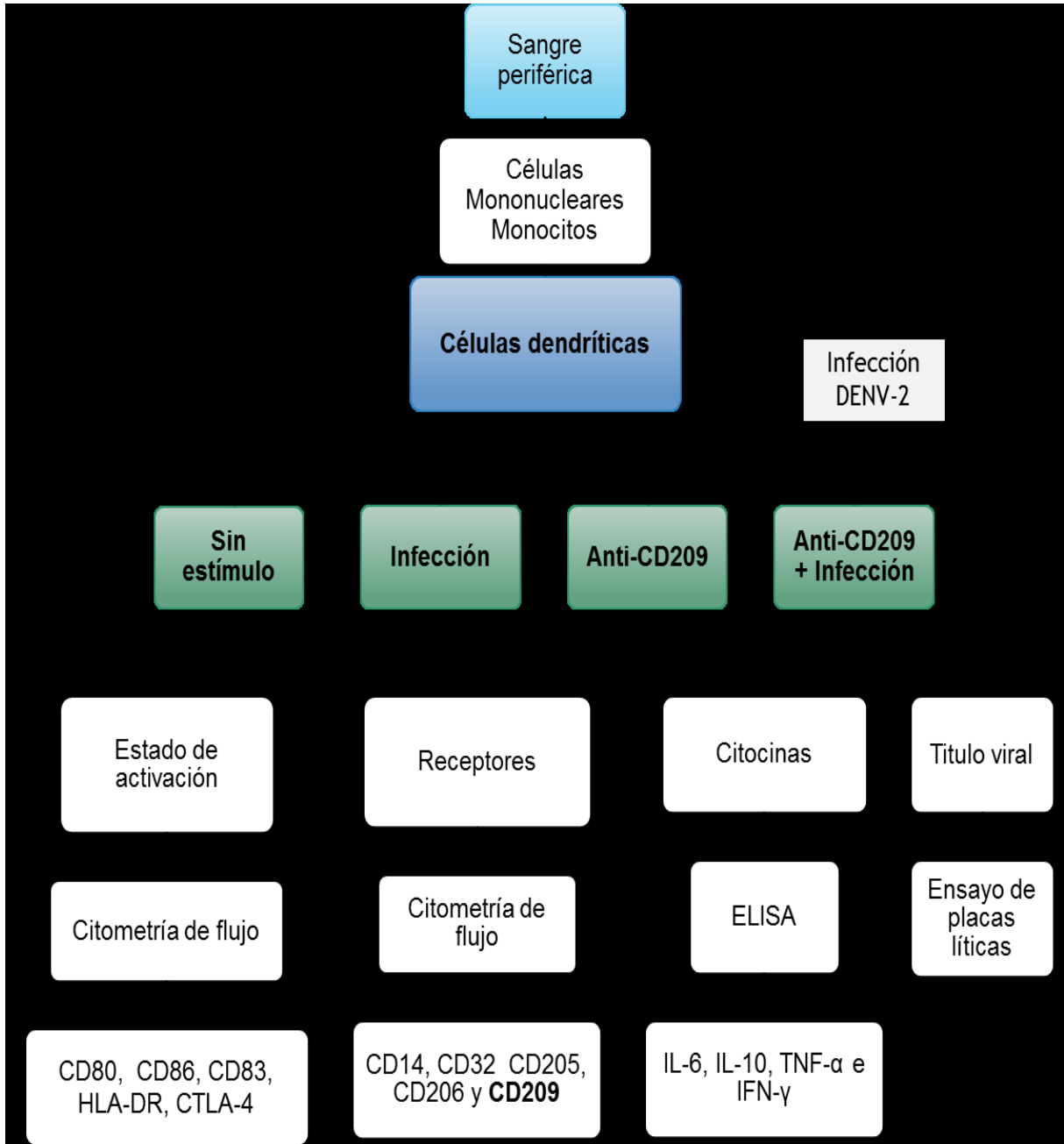
### **1.11.2 Objetivos particulares**

1. Estandarización del proceso de diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica.
2. Evaluar el efecto de la infección con virus dengue serotipo 2 en la expresión de moléculas de co-estimulación, presentación de antígeno, receptores, citocinas y título viral .
3. Determinar cambios en las moléculas de co-estimulación, presentación de antígeno, receptores, citocinas y título viral en células dendríticas con anti-CD209 e infección con virus dengue serotipo 2.

## CAPITULO II

### 2 METODOLOGÍA

#### 2.1 Diagrama general de trabajo



## **2.2 Muestras de sangre periférica**

Se trabajó con muestras del Banco de Sangre del Hospital de Traumatología y Ortopedia del Instituto Mexicano Seguro Social, de sujetos donadores clínicamente sanos, negativos a las pruebas de detección del virus de hepatitis C, VIH, antígeno de superficie de Hepatitis B, serología para sífilis (VDRL o RPR), brucella y chagas.

## **2.3 Separación de células mononucleares de sangre periférica**

La separación de las células mononucleares (CMN) se realizó mediante centrifugación por densidad utilizando Ficoll-Histopaque, inicialmente, se separó el plasma por centrifugación a 1700 rpm durante 10 min, posteriormente, se adicionó la sangre al ficoll en una relación 1:3 (ficoll: sangre), centrifugando a 600g por 30 minutos a 4 °C. Se recuperó el anillo de CMN, y se eliminaron restos de glóbulos rojos con solución de lisis, finalmente se resuspendió en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, por sus siglas en inglés) al 10% de suero fetal bovino (SFB, por sus siglas en inglés). Se determinó viabilidad por azul de tripán.

## **2.4 Estandarización de la obtención de células dendríticas**

Se realizó la estandarización de la obtención de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se evaluó lo siguiente:

- a) Concentración de células mononucleares (CMN) y tiempo de adherencia determinada por morfología de las células dendríticas diferenciadas, y conteo celular con azul de tripán.
- b) Concentración de citocinas en ng/ml (IL-4 y GM-CSF) y tiempo de diferenciación por evaluación morfológica de las células.
- c) Caracterización fenotípica y morfológica de las células dendríticas.

Nota: Cada experimento se realizó por triplicado.

## **2.5 Diferenciación de monocitos a células dendríticas.**

### **2.5.1 Concentración de células mononucleares y tiempo de adherencia**

Las células mononucleares se colocaron a diferentes concentraciones en cultivo:  $4 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $2.5 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  CMN/cm<sup>2</sup>. Primero se separaron los monocitos por adherencia al plástico a partir de las CMN en cultivo (a las concentraciones de CMN antes mencionadas); e incubaron durante 4 horas, posteriormente se eliminaron por lavados con medio RPMI al 1% de SFB las células no adherentes (linfocitos).

Para realizar la diferenciación a células dendríticas se utilizaron las citocinas: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) a concentración de 200 ng/ml e Interleucina-4 (IL-4) a concentración de 100 ng/ml. Las células se dejaron incubar a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 días, realizando un cambio de medio al tercer día de cultivo. Se contaron las células diferenciadas obtenidas al final del cultivo.

Se realizó el mismo procedimiento incubando las CMN durante 12 horas.

### **2.5.2 Concentración de citocinas (IL-4 y GM-CSF) y tiempo de diferenciación**

Para determinar la concentración óptima de citocinas para la diferenciación de células dendríticas se empleó la concentración de  $2 \times 10^6$  CMN/cm<sup>2</sup> se dejaron adherir las células durante 4 horas (condiciones óptimas de adherencia). Se procedió a determinar las concentraciones de trabajo de las citocinas de diferenciación probando 200 ng/ml de GM-CSF y 100 ng/ml de IL-4, 100 ng/ml de GM-CSF y 50 ng/ml de IL-4, 50 ng/ml de GM-CSF y 25 ng/ml de IL-4. Las células se dejaron incubar a 37 °C a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 días, hasta observar la diferenciación de monocitos a células dendríticas realizando un cambio de medio al tercer día de cultivo.

Al quinto día de diferenciación las células se evaluaron por morfología además de que se colocaron en suspensión para evaluar el fenotipo por citometría de flujo, como se describe más adelante.

## **2.6 Estimulación de células dendríticas con anti-CD209**

Para estimular el receptor CD209 en células dendríticas se evaluaron diferentes concentraciones de anti-CD209 (2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml y 0.25 µg/ml) incubando  $4 \times 10^5$  células/ml por pozo, durante 1 hora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo y se infectaron con virus dengue serotipo 2 a M.O.I (índice de multiplicidad) de 1 del stock viral, se incubaron durante 1 hora con el virus y posteriormente se realizaron dos lavados con PBS, se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas y se recuperó sobrenadante para determinar título viral. Además para corroborar que el estímulo se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Los ensayos de título viral e inmunofluorescencia serán descritos a continuación.

## **2.7 Determinación de título viral por ensayo de placas líticas**

Para conocer el título viral se realizaron ensayos de placas líticas con los sobrenadantes de las distintas condiciones (Control sin infección y sin anti-CD209 estímulo, infección con DENV-2, con anti-CD209 y anti-CD209 + infección con DENV-2) en células BHK-21 las cuales se cultivaron en medio MEM al 80% de confluencia el día antes de la infección. Los sobrenadantes obtenidos se incubaron 1 hora a 37 °C al 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS y se agregó una capa de agarosa (0.7%) y medio DMEM al 5% de SFB. Las placas se dejaron incubar durante 72 horas, se retira el agar y posteriormente se realiza la tinción con cristal violeta para el conteo de placas líticas.

## **2.8 Inmunofluorescencia**

El ensayo se realizó en una placa de 24 pozos, primeramente las células dendríticas inmaduras se colocaron en suspensión celular a una concentración de  $3 \times 10^6$  células, y se agregan  $1.5 \times 10^5$  células por pozo, se dividen las células dendríticas para evaluar las diferentes condiciones: sin estímulo, estímulo con anti-CD209 (esto evaluando las diferentes concentraciones), infección con DENV-2 y células dendríticas con estímulo anti-CD209 e infección con DENV-2. Se añadió el estímulo de anti-CD209 correspondiente a cada pozo (2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml y 0.25 µg/ml) incubando las células, durante 1 hora a 37 °C y 5%

de CO<sub>2</sub>, pasado el tiempo de incubación se realizaron 2 lavados con PBS para retirar el exceso de anti-CD209, después se llevó a cabo la infección de células dendríticas en los pozos correspondientes a MOI de 1 durante 35 minutos tanto en las células con estímulo anti-CD209 a las diferentes concentraciones como en las células dendríticas sin estímulo, se fijan con paraformaldehído al 4 % y se bloquea con PBS al 1 % de SFB a temperatura ambiente, después se realiza la tinción de anti-CD209 con IgG-CFL 488 a los pozos correspondientes, realizando lavados con PBS para retirar el exceso, para después agregar anti-E a los pozos con infección posteriormente teñir con anti-PE, se realizan lavados para retirar el exceso de anticuerpo y finalmente se agrega hoestch a todos los pozos, durante 2 minutos. Se lavan los pozos y se observan al microscopio.

## **2.9 Infección de células dendríticas**

Se tiene un stock de virus dengue serotipo 2 suficiente para realizar los experimentos descritos a continuación.

Las células dendríticas inmaduras se ponen en suspensión celular a una concentración de  $3.2 \times 10^6$  células, para realizar su infección en placas de 24 pozos a M.O.I de 1 del stock viral. Se incubaron durante 1 hora con el virus y posteriormente se realizaron dos lavados con PBS, para eliminar el virus que no entre a las células. Las células infectadas se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> para recuperar sobrenadante y evaluar la expresión de marcadores de superficie a las 72 horas post infección. La infección se llevó a cabo de igual forma, en las células dendríticas bloqueadas con CD209. Es importante mencionar que se cuenta con un control sin infección, tanto para células infectadas y células con anti-CD209. Al sobrenadante de las células infectadas se le determinó el título viral por el ensayo de placas líticas descrito anteriormente.

## **2.10 Fenotipo de células dendríticas inmaduras, moléculas de activación y receptores por citometría de flujo.**

El fenotipo y las moléculas de superficie fueron evaluados por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos que reconocen moléculas específicas de células dendríticas: CD1a, CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CTLA-4, CD32, CD205,

CD206 y CD209. Se utilizaron 50,000 células para evaluar cada molécula incubando cada anticuerpo anti-CD1a acoplado a PE (Ficoeritrina), anti-CD14 acoplado a APC (Alofocianina), anti-CD80 acoplado a PE Cy5, anti-CD83 acoplado a FITC (Isotiocianato de fluoresceína), anti-CD86 acoplado a Pacific Blue, anti-HLA-DR acoplado a FITC, anti-CTLA-4 acoplado a PE, anti-CD32 acoplado a PE, anti-CD205 acoplado a Alexa Fluor 647, anti-CD206 acoplado a eFluor 450 y anti-CD209 acoplado a FITC, durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, se realizó un lavado con PBS retirando así el exceso de anticuerpo. Posteriormente, se realizaron las lecturas de las muestras en el citómetro de flujo FACS Canto II (BD Bioscience) y se realizó el análisis con el software FACSDiva (BD bioscience).

## **2.11 Determinación de citocinas por ELISA.**

Se determinó la concentración de citocinas en los sobrenadantes obtenidos del cultivo de las DC's bajo las diferentes condiciones por la técnica ELISA MAX Deluxe Set Protocol (BioLegend) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las citocinas que se evaluaron fueron IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

Se añadieron 100  $\mu$ L del anticuerpo de captura a cada pozo de las placas de microtitulación y se incubaron durante la noche a 4 °C, al día siguiente, se lavaron las placas 4 veces, con 200  $\mu$ l del PBS (0.05% tween 20). Se añadió el diluyente de la muestra para bloquear y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Posteriormente se lavaron las placas 4 veces, añadimos la curva estándar de cada citocina y las muestras a los pozos apropiados, para después incubar a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. Después se lavaron las placas 4 veces y se agregó el anticuerpo de detección a cada pozo e incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Se lavaron las placas 4 veces más, agregamos 100  $\mu$ l de Avidin-HRP diluida a cada pozo e incubamos a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. Finalmente se lavaron las placas 5 veces de 30 segundos a un minuto por cada lavado y se añadieron 100  $\mu$ l de disolución de sustrato TMB a cada pozo, y se incubaron en la oscuridad durante 15 - 20 minutos, añadimos 100  $\mu$ l de disolución de stop a cada pozo y se procedió a realizar la lectura a una absorbancia a 450 nm y 570 nm con el lector de placas.

## CAPITULO III

### 3 RESULTADOS

Los resultados serán presentados por los objetivos planteados anteriormente:

#### 3.1 Objetivo 1.

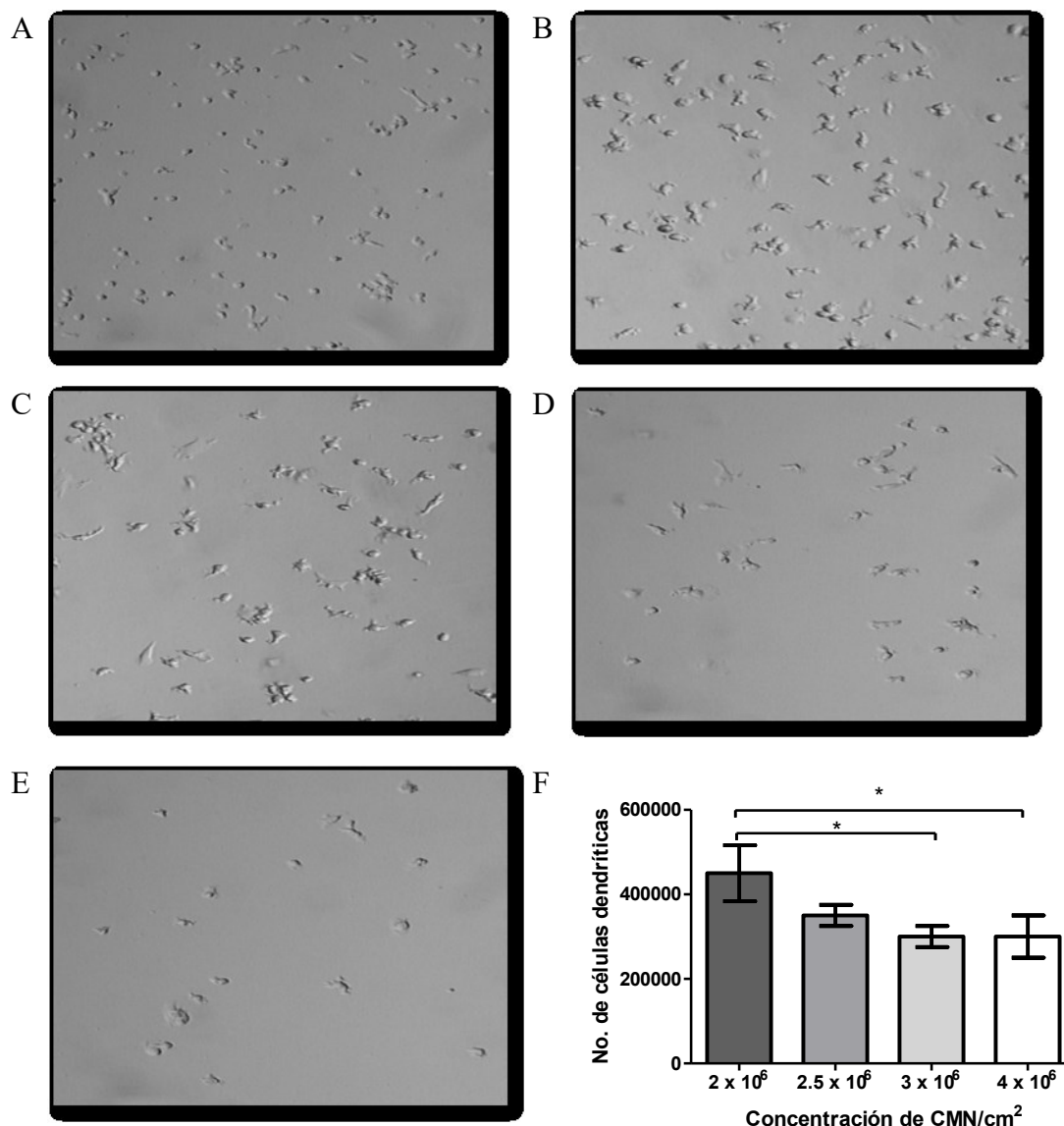
##### **Estandarización del proceso de diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica.**

Los monocitos son precursores naturales de macrófagos y células dendríticas, esta diferenciación puede llevarse a cabo en un microambiente adecuado. Este proceso puede simularse *in vitro*, al estimular monocitos obtenidos de sangre periférica, con el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4). Para llevar a cabo la diferenciación a DC's fue necesaria la estandarización de las siguientes variables, corroborando el proceso mediante la caracterización fenotípica y morfológica de estas células:

- a) Concentración de células mononucleares (CMN) y tiempo de adherencia medida por morfología de las células dendríticas diferenciadas, y conteo celular con azul de tripan.
- b) Concentración de citocinas en ng/ml (IL-4 y GM-CSF) y tiempo de diferenciación por evaluación morfológica de las células.

### 3.1.1 Concentración de células mononucleares

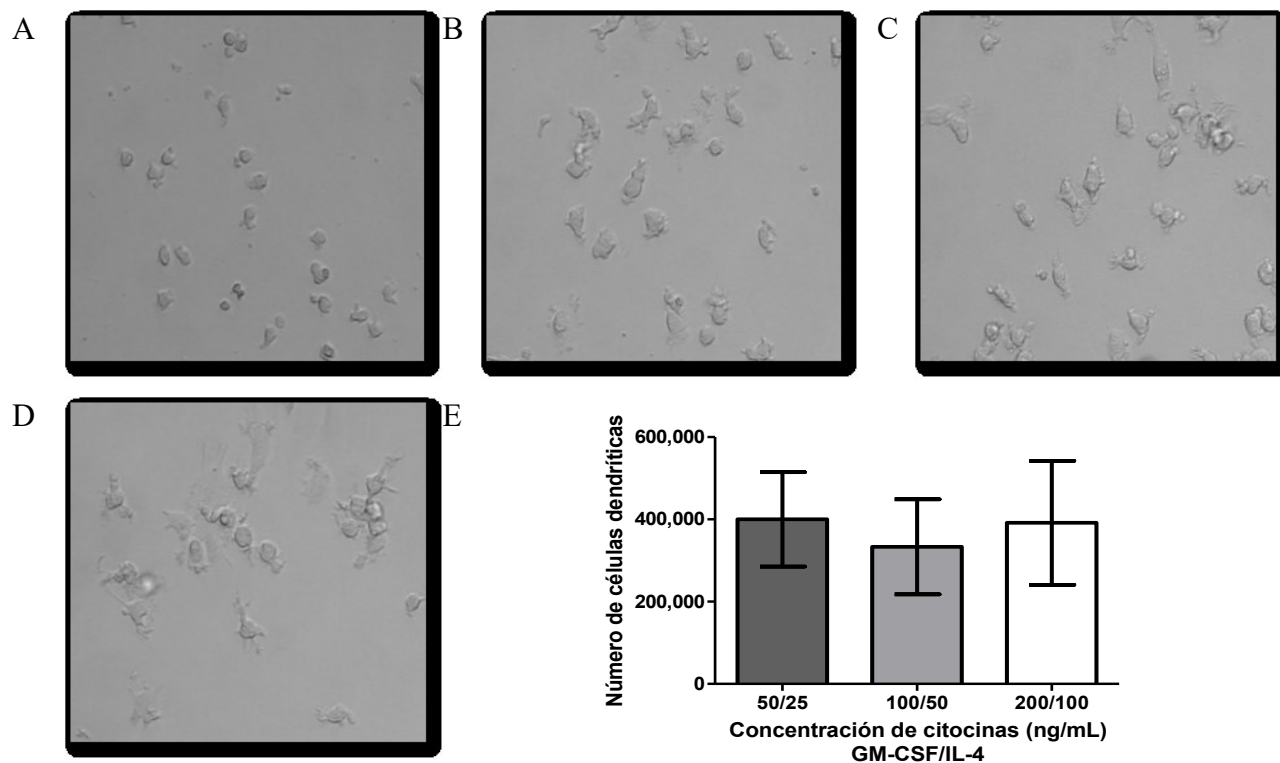
Las CMN está formada por varias poblaciones celulares, principalmente linfocitos, monocitos y polimorfonucleares, de estas células únicamente los monocitos tienen la característica de adherencia al plástico, característica utilizada en este trabajo para separar a esta población celular y posteriormente inducir su diferenciación. Para determinar la concentración de CMN adherentes óptima para obtener un mayor número de DC's, se evaluaron bajo las mismas condiciones de diferenciación 200 ng/ml y 100 ng/ml de GM-CSF e IL-4, respectivamente varias concentraciones de CMN por  $\text{cm}^2$  en cultivo durante 5 días de cultivo en un atmosfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y 37 °C de temperatura. Al final de cultivo se realizó un conteo de células con morfología de células dendríticas. Se evaluaron cuatro concentraciones celulares:  $2 \times 10^6$ ,  $2.5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  células/ $\text{cm}^2$ . En todos los casos se observó un cambio en la morfología de las células al estimularse con citocinas respecto a las células sin estímulo (Figura 10 A-E). Las células sin citocinas eran pequeñas y circulares, mientras que en aquellas que fueron estimuladas con GM-CSF e IL-4, las células aumentaron de tamaño y se observó el crecimiento de prolongaciones en forma de velo alrededor de las células (Figura 10 A-E). Si bien el cambio en la morfología fue el mismo, debido a que el estímulo era igual en todos los casos, el número de células obtenido para las distintas concentraciones de CMN/ $\text{cm}^2$  fue diferente. Al cultivar  $2 \times 10^6$  CMN/ $\text{cm}^2$  se obtuvo el mayor número de DC's  $450,000 \pm 66,000$  células, a  $2.5 \times 10^6$  CMN/ $\text{cm}^2$  se obtuvieron  $350,000 \pm 25,000$  células, mientras que a 3 y  $4 \times 10^6$  CMN/ $\text{cm}^2$  se obtuvieron  $300,000 \pm 25,000$  y  $\pm 50,000$  células (Figura 10F). Se encontró que a mayor número de CMN/ $\text{cm}^2$  se obtuvieron menor número de DC's, lo anterior puede deberse a que se formaban agregados de CMN y esto impedía la adherencia de monocitos y por lo tanto, un menor número de células era diferenciado.



**Figura 10. Determinación del número de células mononucleares (CMN)/cm<sup>2</sup> para la obtención de células dendríticas.** Se evaluaron distintas concentraciones de CMN para determinar la concentración óptima para diferenciar un mayor número de DC's. En el panel A, se presentan CMN sin diferenciar, del panel B-E se observan células diferenciadas con citocinas a 200 y 100 ng/mL de citocinas GM-CSF e IL-4, respectivamente. En B) a una concentración de 2x10<sup>6</sup> CMN/cm<sup>2</sup>, en C) 2.5x10<sup>6</sup> CMN/cm<sup>2</sup>, D) 3x10<sup>6</sup> CMN/cm<sup>2</sup>, E) 4x10<sup>6</sup> CMN/cm<sup>2</sup>. En el panel F se representa en grafica el número total de células obtenidas en un área de 25 cm<sup>2</sup>. Las fotografías están tomadas con el objetivo 20x.

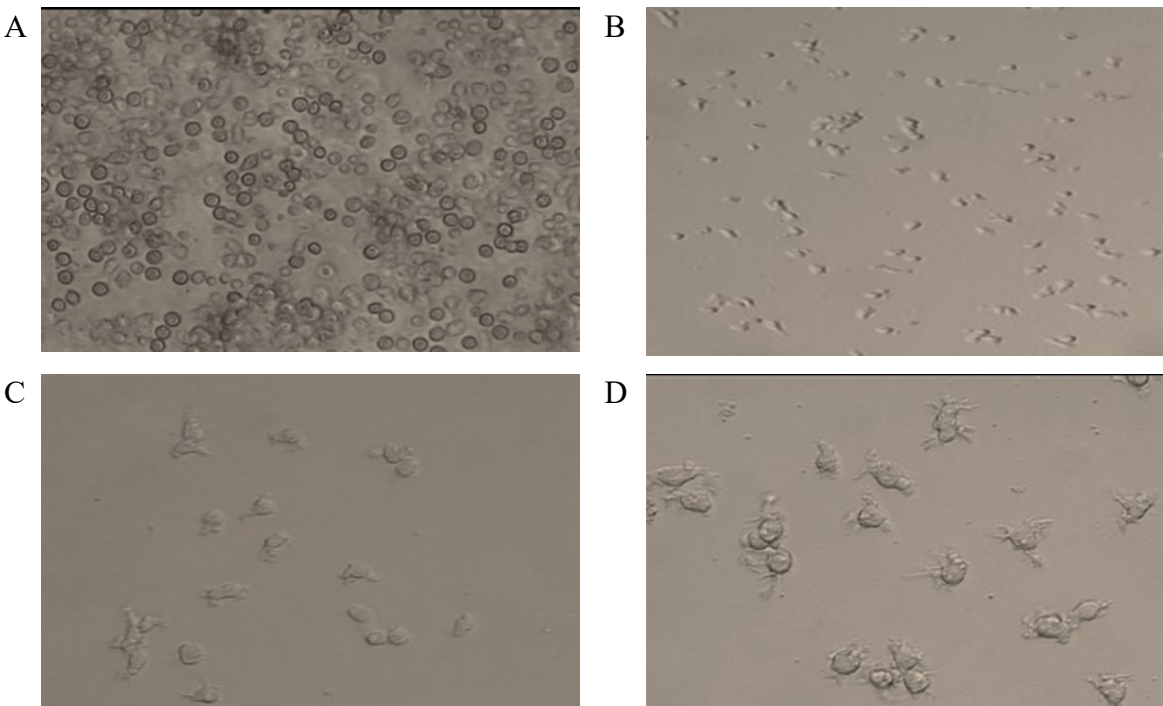
### 3.1.2 Concentración de citocinas (IL-4 y GM-CSF)

Posterior a determinar el número de CMN/cm<sup>2</sup> fue necesario establecer la concentración adecuada de citocinas que inducían la diferenciación de DC's, en los resultados anteriores se había logrado diferenciar a una concentración de 200 y 100 ng/ml de GM-CSF e IL-4 respectivamente, sin embargo, se probaron concentraciones menores como 100 y 50 ng/ml, 50 y 25 ng/ml., utilizando solo medio sin citocinas como control negativo de diferenciación. No se observó una diferenciación en el control sin citocinas solo células adherentes pequeñas y circulares (Figura 11 A), mientras que en las células estimuladas con citocinas no se observaron diferencias en la morfología de las DC's (prolongaciones en forma de velo y mayor tamaño) a ninguna concentración (Figura 11 B-D). Se determinó el número de DC's que se generaron en cada concentración sin encontrarse diferencias significativas entre concentraciones con valores promedios de 390,000 DC's para la mayor concentración, 333,333 DC's para la siguiente y finalmente 400,000 para la menor concentración como se muestra en la figura 11E. En la figura 1, del apéndice se presentan las imágenes del día 1, 3 y 5 durante el proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas empleando diferentes concentraciones de citocinas, se observa que agregando una concentración de 50 ng/ml de GM-CSF y 25 ng/ml de IL-4 las células se encuentran diferenciadas al día 5 sin formar agregados de células, lo que ayuda a que las células no se estimulen entre ellas y permanezcan en un estado inmaduro.



**Figura 11. Evaluación de concentraciones de citocinas para optimizar la diferenciación.** Se evaluaron 3 concentraciones de GM-CSF e IL-4 en A) observamos la concentración de 50 y 25 ng/mL, en B) 100 y 50 ng/mL, C) 200 y 100 ng/mL, respectivamente. En el panel de D, observamos células sin citocinas como control de diferenciación. En el panel F, se presenta la gráfica comparativa de las 3 concentraciones utilizadas.

Finalmente, en la figura 12 se muestra el proceso de diferenciación celular desde la separación de CMN de sangre periférica hasta la obtención de células dendríticas, en la figura 12A se muestran CMN, posteriormente se eliminan células no adherentes quedando únicamente células adherentes o monocitos (Figura 12B), se agrega el estímulo de diferenciación 50 ng/ml de GM-CSF y 25 ng/ml de IL-4, al día 1 de aplicar el estímulo de diferenciación, se comienzan a observar cambios en la morfología la mayoría de las células, dejan de ser redondas para observarse la aparición de pequeñas prolongaciones (dendritas). En el día 3 de cultivo las prolongaciones se observan mejor definidas en todas las células adheridas en el caja de cultivo (Figura 12C), mientras que al día 5 de cultivo las células tienen mayor tamaño, están totalmente diferenciadas con las dendritas extendidas en la caja de cultivo (Figura 12D). Lo anterior, se confirmó con la fenotipificación de las DC's obtenidas y al compararse con lo reportado en la literatura.



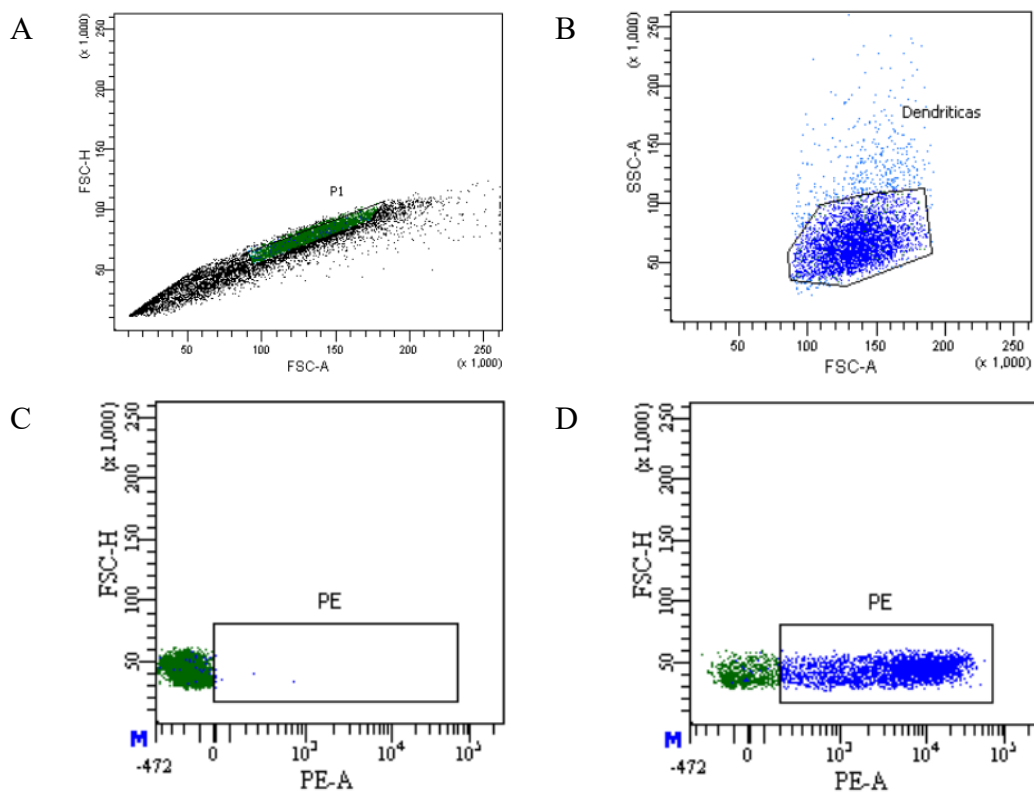
**Figura 12. Proceso de diferenciación de DC's.** En el panel A, observamos CMN sin diferenciar, en B) células adherentes (monocitos) al día 0 del proceso de diferenciación, en C) DC's al día 3 de diferenciación, D) DC's al día 5 de diferenciación. Todas las células observadas fueron diferenciadas a 50 y 100 ng/mL de GM-CSF e IL-4, respectivamente.

Además de la evaluación morfológica de las células dendríticas, se realizó la determinación del fenotipo por citometría de flujo, en sus dos estados de maduración (DC's inmaduras y maduras). La fenotipificación de células dendríticas es compleja debido a la falta de marcadores únicos para estas células, por lo que se utiliza el proceso de maduración de las células y se evalúa la determinación del cambio en la expresión de algunas moléculas como CD1a, CD14, CD32, CD205, CD206, CD209, CD80, CD83, CD86 y HLA-DR. Los marcadores evaluados fueron de superficie y se dividieron en moléculas de caracterización para células dendríticas, moléculas de presentación de antígenos-coestimulación y finalmente receptores.

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de características de células o partículas suspendidas en líquido, se pueden medir múltiples parámetros celulares como tamaño, complejidad y por supuesto, cualquier componente celular que pueda ser monitoreado con un anticuerpo acoplado a un fluorocromo. Los datos generados por el citómetro de flujo pueden ser representados en relación a una variable, en forma de histograma, o en gráficos de puntos (dot-plot), como se observa en la Figura 13.

Para realizar un análisis adecuado es necesario un control negativo, en este caso fueron células dendríticas, sin ninguna tinción, útil para establecer las características de la población a analizar con base a su tamaño, granularidad y auto fluorescencia, definiendo con lo anterior los límites de detección.

Para el análisis se construyó primeramente la gráfica FSC-A vs FSC-H (Figura 13A), la cual relaciona el área de cada célula contra su altura, estas determinaciones deben siempre guardar una proporción lineal, que gráficamente se observa como una línea con ángulo de  $45^\circ$ , aquellas que no forman parte de esta “pendiente” son células en dobletes o tripletes, que no guardan una proporción de altura-área y alteran los porcentajes de células positivas y sus intensidades de fluorescencia. Tomando en cuenta lo anterior, se eligió la población P1 (Figura 13A). Posteriormente, se construyó la gráfica FSC-A (tamaño) vs SSC-A (complejidad) a partir de la cual se seleccionó la población a analizar (células dendríticas) figura 13B. Utilizando el control negativo se establecen los límites de detección en cada uno de los fluorocromos (Figura 13C). Una vez seleccionada la población homogénea a analizar, se buscan los parámetros de fluorescencia que nos indicarán células positivas a alguna molécula determinada (PE, APC, Pacific Blue y FITC). Finalmente, se analizó el porcentaje de las células positivas a cada marcador, figura 13D.



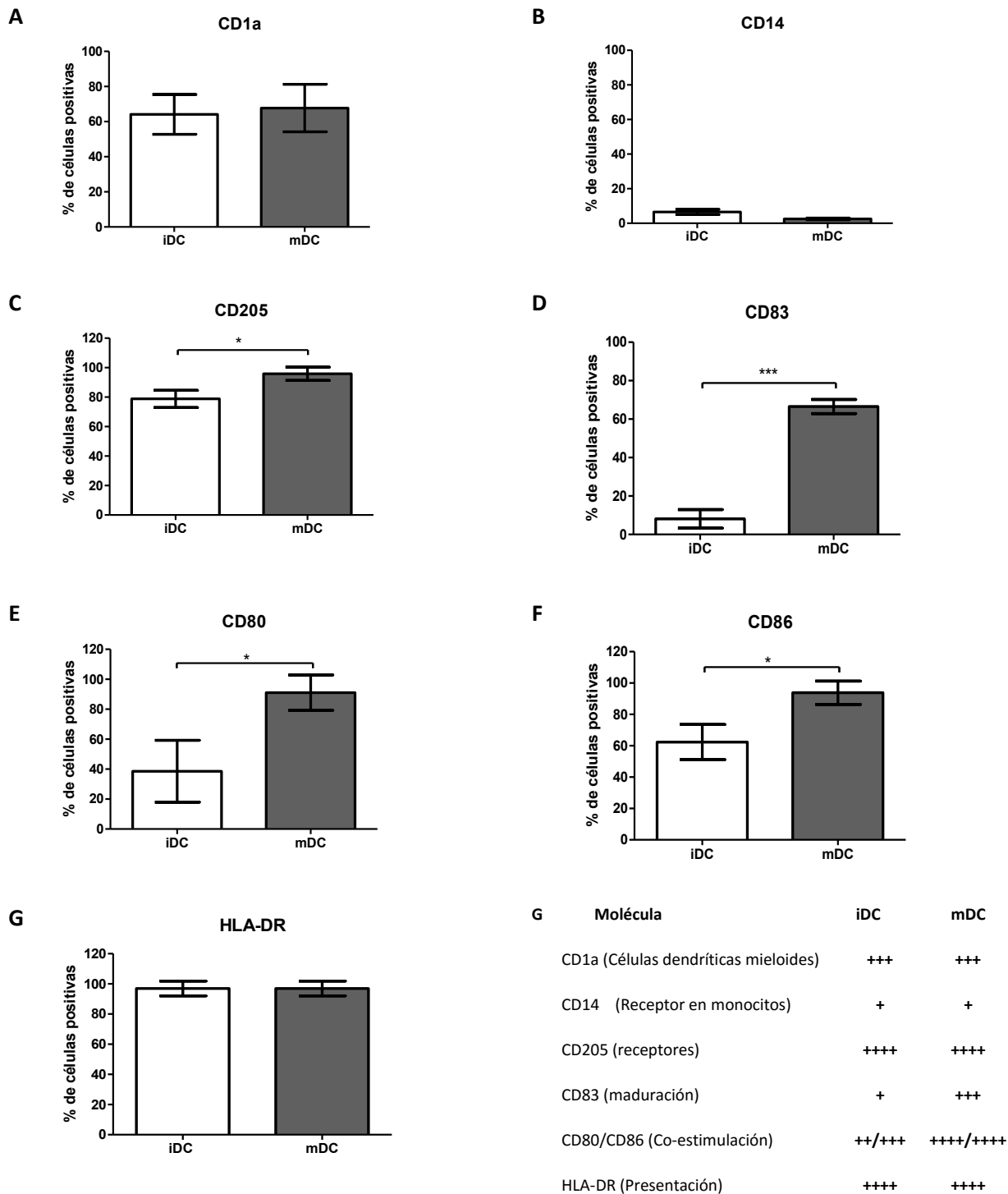
**Figura 13. Secuencia de análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo.** Gráficas tipo Dot plot para el análisis de resultados, en la figura A) se muestra la población de células sencillas, en B) se muestra un gráfico para de selección de población homogénea de células dendríticas, C) muestra un gráfico para establecer el límite de detección para el fluorocromo PE utilizando el control negativo como referencia, y en D) se muestra un gráfico de células positivas al fluorocromo PE bajo un estímulo determinado.

### 3.1.3 Fenotipo de células dendríticas inmaduras (iDC's)

Para confirmar las características morfológicas de las células dendríticas se hace una evaluación de moléculas de superficie. Se evaluaron los marcadores de superficie: CD1a, CD14, CD83, CD205, CD80, CD86 y HLA-DR en células dendríticas inmaduras y en células dendríticas maduras estimuladas con LPS, esto debido a que el fenotipo de las DC's se establece de manera ideal con la diferencia en la expresión de varias moléculas entre células dendríticas inmaduras y maduras (estimuladas con LPS). Existen varias moléculas que se utilizan para definir a las poblaciones de DC's como lo es CD1a y CD14; mientras que algunas otras moléculas deben

variar según sus estados de diferenciación de las DC's tal es el caso de receptores (como CD205) y moléculas de presentación y co-estimulación, como HLA-DR, CD80, CD83 y CD86.

Los resultados obtenidos muestran que la molécula CD1a no presenta variaciones respecto al estado de maduración, como se esperaba, pues es una molécula presente en poblaciones de DC's inmaduras y maduras (Figura 14A). Mientras que la molécula CD14, al ser característica de monocitos, debe ser negativa o de muy baja expresión (independiente del estado de maduración) lo cual coincidió con lo encontrado (Figura 14B). En la figura 14C, se muestra el porcentaje de expresión del receptor CD205, el cual se esperaba que disminuyera en DC's maduras según lo descrito con los estados de maduración para receptores, sin embargo, el estímulo de maduración utilizado LPS se ha observado que es capaz de aumentar este tipo de receptores, el aumento va de  $78.8 \pm 5.8\%$  para DC's inmaduras a  $95.87 \pm 4.48\%$  en DC's maduras. Según lo reportado en la bibliografía la maduración induce un aumento de moléculas de presentación y activación para preparar a las DC's en la activación de los linfocitos. Estas moléculas se espera que aumentaran posterior a la maduración con LPS, como sucedió y se muestra en la Figura 14 D-G. Todas estas moléculas aumentaron significativamente en las DC's maduras, para CD83 aumentó de  $8.13 \pm 4.8\%$  en iDCs a  $66.57 \pm 3.67\%$  posterior al estímulo (figura 14D). Respecto a las moléculas de co-estimulación en ambos estados se encontraron diferencias significativas sin embargo, fueron más marcadas para CD80 donde se encontró  $38.6 \pm 20.65\%$  para iDC's y  $91.07 \pm 11.79\%$  posterior al estímulo (Figura 14E). Para CD86 el porcentaje de células positivas en iDC's fue mayor que CD80, con  $62.4 \pm 11.2\%$ , mientras que para DC's maduras el % de células positivas para CD86 fue similar al CD80 con un  $93.8 \pm 7.4\%$  (figura 13F). Mientras que no se observó cambios entre DC's inmaduras y maduras para la molécula de presentación HLA-DR (figura 14G).



**Figura 14. Expresión de marcadores de superficie para células dendríticas inmaduras y maduras.** Se muestra la expresión de las moléculas CD1a, CD14, CD205, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR (A-F) comparando la expresión de iDC's y DC's m-LPS, G) muestra un cuadro comparativo de todas las moléculas determinadas, las cruces fueron asignadas con base a los porcentajes de células positivas; (+) 1-20% de células positivas, (++) 21 - 45 % de células positivas, (+++) 46 - 75 % de células positivas y (++++) 76 - 100 % de células positivas. Se aplicó la prueba estadística t de student,  $p < 0.05$ .

Con los resultados anteriores, se determinó el fenotipo de las células dendríticas en ambos estados de maduración, concluyendo que se diferenciaron células funcionalmente distinguidas como células dendríticas. Los principales marcadores que nos indica que se logró diferenciar DC's son la ausencia de CD14 en ambos estados de maduración, el aumento de CD83 y CD80.

### 3.2 Objetivo 2

#### **Evaluar el efecto de la infección con virus dengue serotipo 2 en la expresión de receptores, marcadores de activación presentación y el título viral.**

Para determinar el efecto del virus en la activación de células dendríticas, primero fue necesario determinar el tiempo de medición, para lo anterior, se realizó una cinética de la expresión de las moléculas de caracterización, co-estimulación y presentación de antígeno a las 24, 48 y 72 horas post infección con el virus DENV-2 a MOI de 1.

Se evaluaron algunas moléculas del fenotipo clásico de DC's (CD1a, CD14, CD80, HLA-DR) para determinar el efecto del virus para todos los tiempos los cuales se presentan en la tabla 2. La expresión de CD1a, molécula presente en células dendríticas de origen mieloide como se esperaba se mantuvo constante en todos los tiempos. Respecto a CD14, molécula que se debe encontrar en baja expresión o negativa en células dendríticas, se encontró un aumento significativo en el % de células que lo expresaban desde las 48 horas post infección ( $18.38 \pm 5.3$ ) y sigue en aumento respecto al tiempo a las 72 horas ( $37.05 \pm 13 \%$ ), en otras células como macrófagos se ha descrito que esta molécula puede ser empleada como receptor por el virus dengue [151], esto es probablemente debido a que el virus dengue induce la expresión de este receptor u otros para mediar su entrada a un mayor número de células. Mientras que en la molécula CD83, el cual es un marcador de maduración presente en DC's se observó un incremento significativo desde las 48 horas de infección, lo que indicaba que el virus inducía la maduración de las DC's, sin cambios significativos entre las 48 y 72 horas.

**Tabla 2.** Expresión de moléculas de caracterización en DC's: CD1a, CD14 y CD83 a 24, 48 y 72 horas post infección con DENV-2.

	Sin infección	Infección con DENV-2		
		24 h	48 h	72 h
<b>CD1a</b>	93.33 ± 2.4	90.63 ± 2.6	96.63 ± 0.7	98.53 ± 0.9
<b>CD14</b>	2.05 ± 1.9	1.85 ± 1.1	18.38 ± 5.3*	37.05 ± 13*
<b>CD83</b>	40.83 ± 10.8	30.43 ± 12.3	76.98 ± 16.3*	75.30 ± 6.8*

La tabla muestra promedio y desviación estándar (n=4): t de student, p <0.05.

También fue importante determinar la expresión de moléculas de co-estimulación CD80, CD86 y presentación de antígeno HLA-DR y CTLA-4; los resultados se muestran en la tabla 3. Al determinar la expresión de moléculas de co-estimulación CD80 y CD86 se observa un aumento significativo en estas moléculas desde las 48 horas y se sostiene a las 72 horas de infección. Respecto a HLA-DR no hubo diferencias estadísticamente significativas a los diferentes tiempos de infección determinados, mientras que para la molécula CTLA-4 que induce una regulación en la respuesta de linfocitos, se observó un aumento en su expresión desde las 48 horas hasta las 72 horas post infección (Tabla 2).

**Tabla 3.** Expresión de moléculas de co-estimulación (CD80, CD86) y presentación de antígeno (HLA-DR, CTLA-4) en DC's a 24, 48 y 72 horas post infección con DENV-2.

	Sin estimulo	Infección con DENV-2		
		24 h	48 h	72 h
<b>CD80</b>	85.09 ± 1.4	84.43 ± 15.3	94.93 ± 5.2*	98.80 ± 0.4*
<b>CD86</b>	57.88 ± 16.5	66.88 ± 2.8	86.55 ± 5.2*	88.50 ± 2.6*
<b>HLA-DR</b>	99.95 ± 0.1	99.88 ± 0.2	98.70 ± 1.7	99.60 ± 0.4
<b>CTLA-4</b>	0.67 ± 0.9	0.87 ± 0.8	10.15 ± 5.2*	17.53 ± 8.7**

La tabla muestra promedio y desviación estándar (n=4): t de student, p <0.05.

Con los resultados anteriores podemos concluir que a las 48 horas las células dendríticas infectadas empiezan a madurar a partir de las 48 horas manteniéndose esta maduración hasta las 72 horas en la mayoría de las moléculas. La infección con el DENV-2 induce su maduración y aumento de las moléculas CD83, CD80 y CD86, pero también induce cambios importantes que podrían interferir con la respuesta de las DC's a la infección como son la expresión de CTLA-4, el cual lleva a una inactivación de linfocitos T y un aumento en la

expresión de la molécula CD14, que podría contribuir al aumento del título viral ya que puede tener un papel de receptor en DC's. Con los resultados anteriores, se decidió determinar la expresión de otros receptores a 72 horas post infección encontrándose los resultados representados en la tabla 4. Se observó que los receptores CD205 y CD206 se encontraron aumentados a estos tiempos respecto a las células sin infectar.

Respecto a los receptores solo fueron evaluados al tiempo de 72 horas post infección debido a los cambios observados para las distintas moléculas antes mencionadas. El receptor CD205 contrario a lo predicho posterior a la infección se induce un aumento de este receptor posterior a la infección, mientras que el CD209 no muestra cambio. Sin embargo, no mostraron un cambio receptor CD209 se observa una disminución significativa, esto podría deberse a que el receptor se ha descrito como la principal vía de entrada para DENV por lo tanto al interaccionar con el virus, se induce la endocitosis receptor-virus y disminuye la expresión en superficie durante el proceso de infección.

**Tabla 4.** Expresión de receptores tipo lectina: CD205, CD206 y CD209 en DC's infectadas con DENV-2 durante 72 horas.

	Sin estimulo	Infección con DENV-2 72 h
CD205	86.13 ± 8	99.75 ± 0.3*
CD206	97.05 ± 1.6	96.98 ± 1.2
CD209	67.49 ± 10.1	47.11 ± 5.7*

La tabla muestra promedio y desviación estándar (n=4): t de student, p <0.05.

### 3.2.1 Expresión de moléculas de co-estimulación, presentación de antígeno, receptores y citocinas en células dendríticas infectadas con DENV-2

Para determinar los cambios inducidos por el virus DENV se evaluó la expresión en las moléculas de caracterización, co-estimulación, presentación de antígeno y receptores, así como cambios en la producción de citocinas y título viral, esto al infectar células dendríticas con DENV-2 durante 72 horas.

#### 3.2.1.1 Moléculas de caracterización para células dendríticas

Respecto a las moléculas de caracterización no se observan cambios significativos durante la infección, para CD1a, tal como se esperaban (figura 15A) debido a la naturaleza de estas moléculas, CD83 un marcador específico de maduración se esperaba un aumento significativo inducido por el virus como parte de una maduración, sin embargo, en promedio se conserva el porcentaje de células positivas,  $20.53 \pm 14.09 \%$  y  $19.85 \pm 11.12$ , en DC's sin estímulo y DC's infectadas con DENV-2 72 hrs post infección, respectivamente (figura 15B).

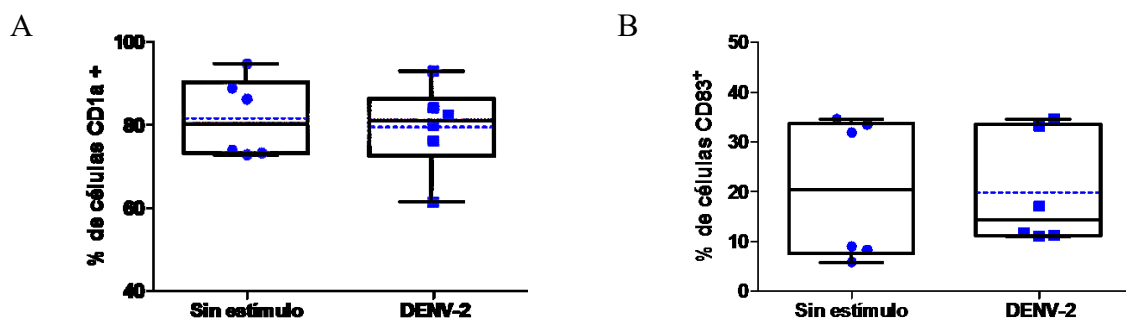
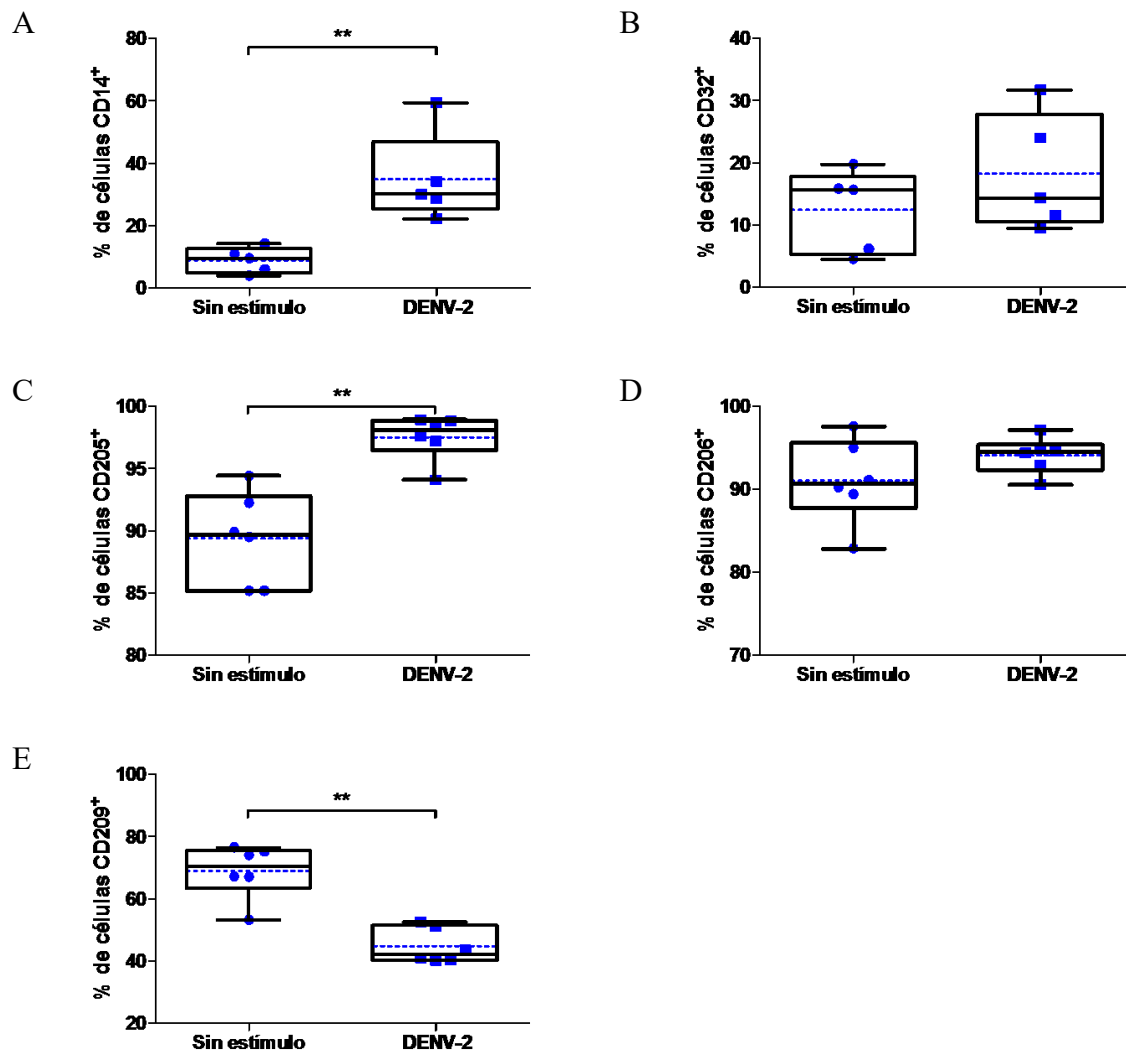


Figura 15. Expresión de moléculas de caracterización: CD1a y CD83 en DC's infectadas con DENV-2. Gráficos de las moléculas de caracterización comparando la expresión DC's sin estímulo (iDC's) y DC's infectadas con DENV-2 durante 72 horas. (n=6) t de student,  $p < 0.05$ .

### 3.2.1.2 Expresión de receptores en células dendríticas infectadas con DENV-2.

Se evaluó el cambio en la expresión de algunos receptores inducido por la infección. Al evaluar la expresión de los receptores de superficie en células dendríticas a diferentes tiempos de infección con DENV-2 se demostró que hay cambios importantes en la expresión de algunas moléculas. CD14 es una molécula que disminuye progresivamente a medida que las células se diferencian de monocitos a DC's. Las DC's se caracterizan por una baja expresión de CD14 lo que corresponde a lo obtenido en las DC's sin estímulo con  $8.98 \pm 4.07$  %, sin embargo, la infección induce un incremento significativo a  $34.9 \pm 14.36$  % tal como se muestra en la figura 16A. Otro receptor, el CD32, receptor tipo Fc, participa en el incremento de la infección al "capturar" anticuerpos unidos a virus, con lo cual se incrementa la infección, este fenómeno es conocido como ADE, la infección de DC's con DENV-2 no induce un aumento de la expresión de receptor, para DC's sin estímulo el % de células positivas es de  $12.44 \pm 6.65$  y se mantiene durante la infección con un valor de  $18.24 \pm 6.34$  % tal como se presenta en la figura 16B.

También se evaluaron receptores tipo lectina como: CD205, CD206 y CD209, los cuales se han relacionado con el reconocimiento de moléculas glicosiladas, como el virus DENV. El receptor CD205, mostró un incremento significativo inducido por la infección de  $89.41 \pm 3.70$ % de células en células sin infección a  $97.52 \pm 1.806$ % para las DC's infectadas con DENV-2 (figura 16C). Mientras que el receptor CD206 no presentó cambios en su expresión, el % de expresión en DC's sin estímulo es de  $91.05 \pm 5.062$  y se mantiene durante la infección con DENV-2 con un valor de  $94.09 \pm 2.191$  % (figura 16D). Finalmente, se evaluó el receptor CD209, el cual presentó una disminución significativa en el porcentaje de células positivas para las DC's infectadas con DENV-2, en la figura 16E se observa esta disminución de  $68.94 \pm 8.69$  % a  $44.84 \pm 5.63$  % de células que expresan a este receptor.



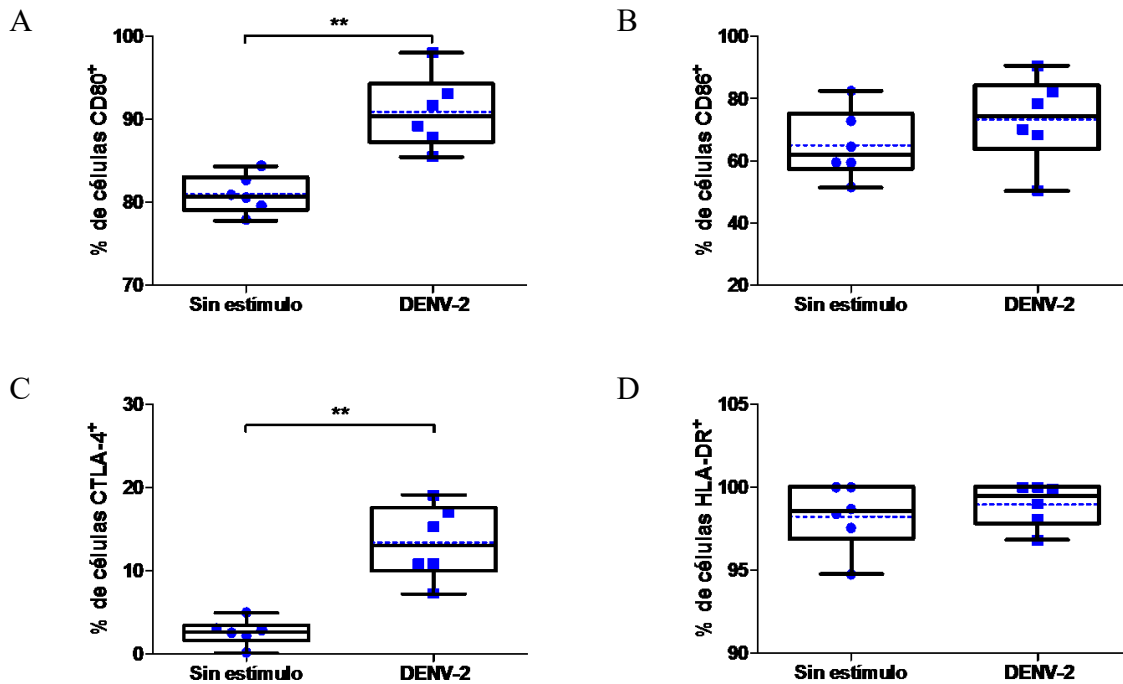
**Figura 16. Expresión de receptores: CD14, CD32, CD205, CD206 y CD209 en DC's infectadas con DENV-2.** Gráficos de los receptores comparando la expresión de DC's sin estímulo (iDC's) y DC's infectadas con DENV-2 durante 72 horas: (n=6) t de student, p<0.05.

Con lo anterior, podemos concluir que el virus aumenta algunos receptores como CD14 y CD205, probablemente para asegurar la infección de las células, pero la infección, mientras que disminuye la expresión del receptor CD209, lo cual puede deberse a la internalización del complejo receptor-virus.

### **3.2.1.3 Expresión de moléculas de co-estimulación y presentación de antígeno en células dendríticas durante la infección con DENV-2.**

Se evaluó la expresión de moléculas de co-estimulación CD80 y CD86, las cuales interaccionarán con las moléculas CD28 presentes en linfocitos para asegurar su activación. Además de las moléculas de co-estimulación existe una molécula con función contraria que induce en los linfocitos un estado de anergia, esta molécula es CTLA-4, que también fue evaluada. Finalmente evaluamos la expresión de la molécula HLA-DR de presentación de antígenos.

Los resultados encontrados muestran que el virus induce un estado de activación, las moléculas de co-estimulación se incrementan, particularmente la expresión de CD80 en DC's infectadas con DENV-2 se presenta en un  $90.90 \pm 4.40\%$  de las células infectadas mientras que aquellas no infectadas tiene un  $81.02 \pm 2.28\%$  de células positivas, como se muestra en la figura 17A. Mientras que la expresión de CD86 se mantiene, no hay diferencias estadísticamente significativas posterior a la infección (figura 17B). La molécula con función contraria a co-estimulación CTLA-4, se encontró que aumentó en las DC's infectadas con DENV-2 de un  $2.66 \pm 1.549$  en células no infectadas hasta un  $13.42 \pm 4.44\%$  de células positivas, como se muestra en la figura 17C, lo anterior, podría relacionarse con el aumento de células anérgicas, ya que esta molécula compite con las moléculas de CD80 y CD86 inhibiendo la activación de linfocitos. Finalmente, los resultados obtenidos para la molécula de presentación de HLA-DR no presentó cambios en su expresión tal como se muestra en la figura 17D.



**Figura 17.** Expresión de moléculas de co-estimulación (CD80 yCD86) y moléculas de presentación de antígeno (CTLA-4 y HLA-DR) en DC's infectadas con DENV-2. Gráficos de las moléculas de co-estimulación y presentación de antígeno, comparando la expresión de DC's sin estímulo (iDC's) y DC's infectadas con DENV-2 durante 72 horas: (n=6) t de student, p<0.05.

Lo anterior, nos señala que la infección induce la expresión de moléculas de presentación y co estimulación necesarias para la activación de linfocitos, sin embargo, es importante destacar a expresión de CTLA-4, que podría inducir anergia en los linfocitos, por lo que habrá una competencia entre las moléculas CD80/86 y el CTLA-4, en la activación o inhibición de los linfocitos.

### 3.2.1.4 Secreción de citocinas de células dendríticas infectadas con DENV-2

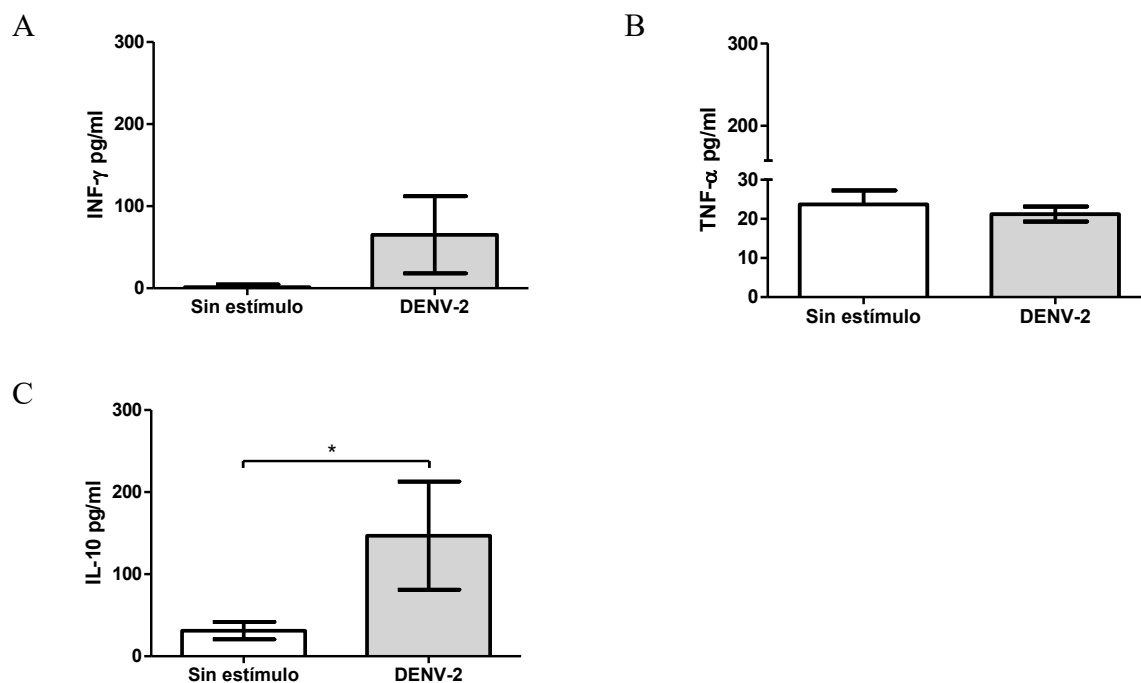
Otro aspecto importante relacionado a la expresión de moléculas de presentación y co-estimulación que favorece una activación de linfocitos es la producción de citocinas. Estas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversas poblaciones celulares que generalmente actúan como mensajeros intercelulares que suelen intervenir en la maduración y amplificación de la respuesta inmune, provocando múltiples actividades biológicas una vez que se unen a los receptores específicos de las células diana adecuadas.

Las citocinas liberadas por las células dendríticas pueden contribuir al desarrollo de un proceso anti-inflamatorio o pro-inflamatorio, algunos autores han demostrado que las citocinas durante la infección con DENV tienen un papel crucial ya que actúan sobre las células del endotelio vascular desencadenando así la patogénesis de la enfermedad. En el presente trabajo se analizan los niveles de IL-10, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 ya que algunos estudios en sueros de pacientes con dengue demuestran que estas citocinas se encuentran incrementadas durante una infección con dengue.

Específicamente, IL-6 participa en los procesos de inflamación y reclutamiento de monocitos en el lugar de la infección, sin embargo, no fue posible detectarlo en ninguna de las condiciones analizadas, con un límite de detección del ensayo de 2.8 pg/ml. El INF- $\gamma$  aumenta la actividad citotóxica y fagocítica de macrófagos e induce la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II en células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. El INF- $\gamma$  también incrementa el desarrollo y diferenciación de células T además tiene un papel dual, es pro-inflamatorio y anti-inflamatorio, lo cual lo convierte en una proteína singular debido a que su comportamiento depende del medio en el que se encuentre. Los resultados que se encontraron de INF- $\gamma$  en las dos condiciones (infectadas y no infectadas), no se observan diferencias significativas, con una concentración  $1.78 \pm 3.57$  pg/ml y  $47.52 \pm 29.29$  pg/ml, respectivamente, como se muestra en la figura 18A. Por otro lado, TNF- $\alpha$  es capaz de activar a las DC's e inducir la migración y activación de las células T; los resultados muestran que no hay diferencias en los niveles de esta citocina entre las células infectadas y las no infectadas con una concentración de  $23.74 \pm 3.56$  pg/ml y  $21.24 \pm 1.93$  pg/ml, respectivamente, como se muestra en la figura 18B. Finalmente, IL-10 se asocia a la capacidad de regular la proliferación y diferenciación celular definiendo su efecto inmunosupresor y anti-inflamatorio, los resultados encontraron muestras que la infección con DENV-2 induce un aumento significativo de IL-10 respecto a los niveles de las DC's, siendo casi 4 veces mayor post infección,  $31.16 \pm 10.64$  pg/ml y  $147 \pm 65.92$  pg/ml en DC's infectadas, como se presenta en la figura 18C.

### 3.2.1.5 Título viral

El título viral se determinó por ensayo de placas líticas a partir de los sobrenadantes obtenidos de las DC's a las 72 horas de infección con DENV-2 y en promedio fue de  $1220 \pm 857.5$  UFP/ml (figura 18D) en células infectadas.



**Figura 18. Niveles de citocinas (IL-10, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) en pg/ml en DC's infectadas con DENV-2 y título viral en UFP/ml de sobrenadantes de DC's infectadas con DENV-2. A, B y C) Gráficos comparando los niveles de IL-10, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  de DC's sin estímulo (iDC's) y DC's infectadas con DENV-2 durante 72 horas. D) Título viral de las DC's infectadas con DENV-2: (n=6) t de student,  $p < 0.05$ .**

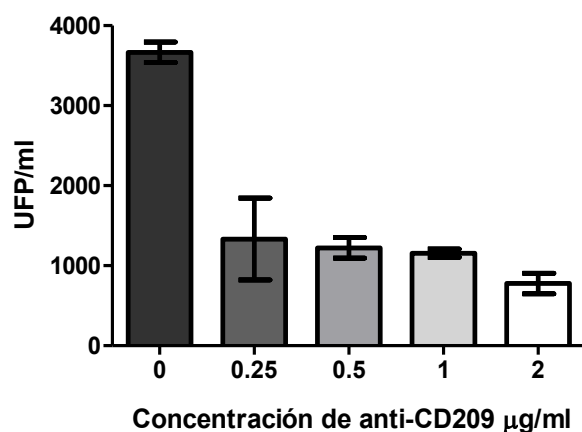
### 3.3 Objetivo 3

**Determinar cambios en los marcadores de activación, receptores y título viral al estimular con anti-CD209 e infectar células dendríticas con virus dengue serotipo 2.**

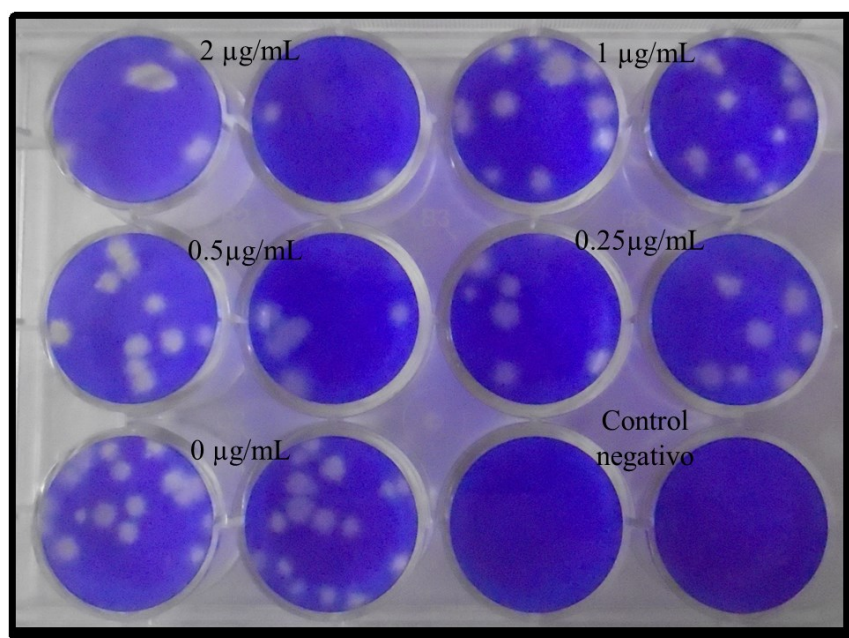
#### 3.3.1 Estimulación de células dendríticas con anti-CD209

Debido a que el receptor CD209 es una de las principales vías de entrada del DENV, se planteó estimular a las DC's con este receptor para inducir en las células los efectos de una estimulación antigénica mediada por este receptor y al mismo tiempo bloquear o reducir la entrada del virus a las DC's. Se evaluaron diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD209: 2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{g/ml}$ .

Primeramente se realizó un ensayo para determinar el efecto del estímulo con el anticuerpo sobre la infección, para lo anterior, se estimuló durante una hora con el anticuerpo anti-CD209 a diferentes concentraciones (2, 1, 0.5 y 0.25  $\mu\text{g/ml}$ ), antes de la infección con el virus DENV-2. Se determinó el título viral por ensayo de placas líticas a partir de los sobrenadantes obtenidos a las 48 horas de infección, al titular los sobrenadantes se observa que a las diferentes concentraciones se reduce significativamente el título viral, utilizado el anticuerpo anti CD209 a 2  $\mu\text{g/ml}$  se obtuvieron  $777.3 \pm 157.1$  UFP, mientras que a la concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  se obtuvieron  $1156 \pm 62.3$  UFP, a una concentración de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  se obtuvieron  $1222 \pm 157.1$  UFP y finalmente a la concentración de 0.25  $\mu\text{g/ml}$  se obtuvieron  $1333 \pm 628.5$  UFP, en todas las concentraciones se logra una reducción en el título viral respecto a las células sin estímulo solo infectadas donde se obtuvo una concentración de  $3367 \pm 157.1$  UFP, como se muestra en la figura 18. La disminución del título viral es significativamente menor a la concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  como se observa en la figura 19 y 20. La reducción en el título viral podría deberse a un bloqueo de la entrada del virus por el receptor o al estímulo ejercido por el anticuerpo anti-CD209. Por lo anterior, en para ensayos posteriores se emplea la concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  de anti-CD209 para estimular a las DC's.

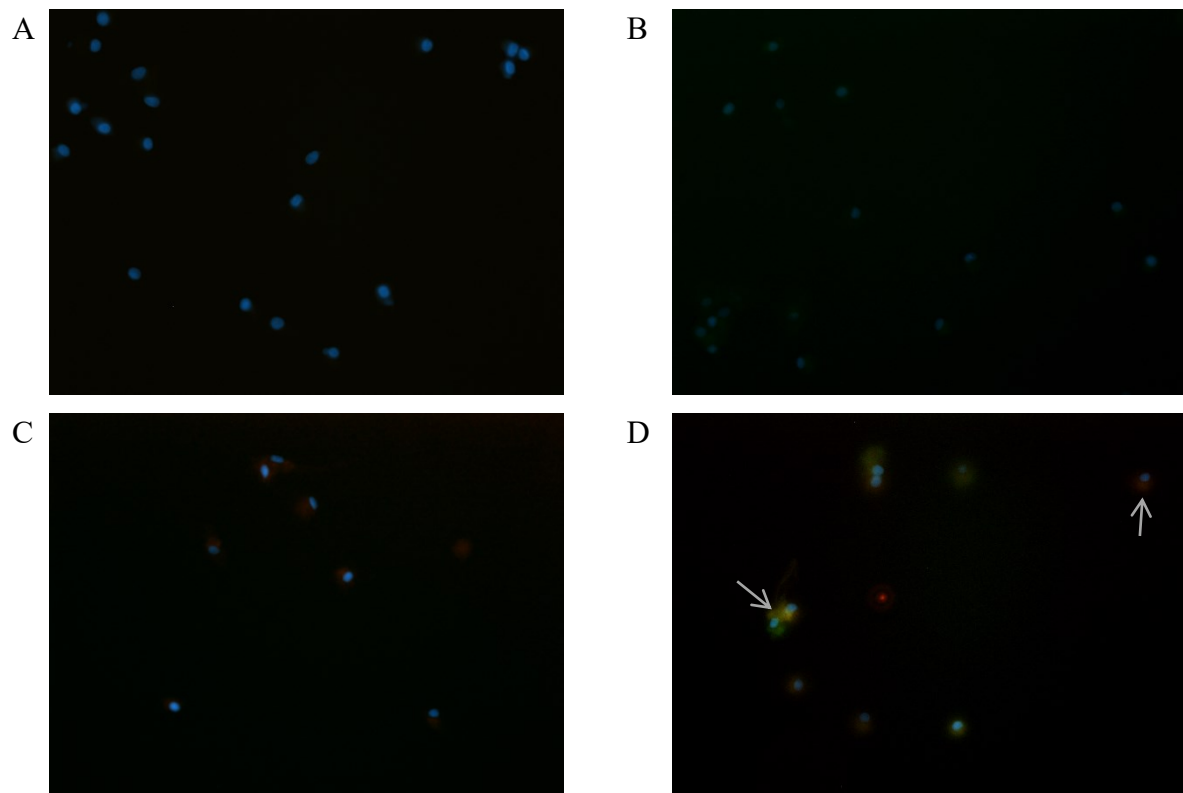


**Figura 19. Título viral de sobrenadantes de DC's estimuladas a diferentes concentraciones de anti-CD209 e infectadas con DENV-2.** Se gráfica el título viral en UFP/ml (Unidades formadoras de placa/ ml) de las DC's estimuladas a diferentes concentraciones de anti-CD209 y posteriormente infectadas con DENV-2.



**Figura 20. Ensayo de placas líticas.** En cada pozo se observa el número de placas líticas que se obtuvo al titular el sobrenadante de las DC's estimuladas a diferentes concentraciones de anti-CD209 e infectadas con DENV-2.

La disminución del título viral al usar el anticuerpo anti CD209 a 2  $\mu\text{m}/\text{ml}$  fue al menos 4 veces mayor respecto a la infección sin estímulo adicional, para corroborar que existía algún efecto de bloqueo de la infección mediado por el estímulo del receptor con el anticuerpo anti CD209, se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anti-CD209 y la infección del DENV-2. En la figura 21A se observan DC's sin estímulo donde sólo se observan núcleos teñidos con hoestch, en la figura 21B se presentan células positivas a el receptor CD209 en verde alrededor del núcleo en la membrana de la célula. El virus DENV-2 es detectado en color rojo en la figura 21C al utilizar un anticuerpo que reconoce la proteína E de membrana viral (la cual interacciona con el receptor CD209 durante la infección). Al realizar la tinción del receptor en células infectadas se encontró que se encuentran ubicados juntos, como se observa en figura 21D, en color amarillo por la mezcla del color verde y rojo, respectivamente.



**Figura 21. Ensayos de inmunofluorescencia en DC's.** A) DC's sin estímulo, B) DC's con estímulo de anti-CD209, C) DC's infectadas con DENV-2 y D) DC's estimuladas con anti-CD209 e infectadas con DENV-2. Los núcleos están teñidos con Hoestch (se observan en azul), anti-CD209 se encuentra marcado con verde y la proteína E de DENV-2 se encuentra teñida con rojo. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo 20X.

Debido a que en la inmunofluorescencia colocalizamos el virus y el receptor, fue necesario determinar si el receptor se encontraba internalizado o en la membrana para determinar si realmente el anticuerpo bloqueaba la entrada del virus a la célula o era internalizado junto al virus. Para lo anterior, se determinó la expresión de superficie del receptor con otro anticuerpo anti CD-209 (que reconocía otro dominio del receptor). En la tabla 4, se muestran que el anticuerpo sigue en superficie posterior al estímulo, con un porcentaje de expresión mayor al 90% para todas las concentraciones evaluadas.

**Tabla 5.** Porcentaje de células positivas a anti-CD209 en DC's.

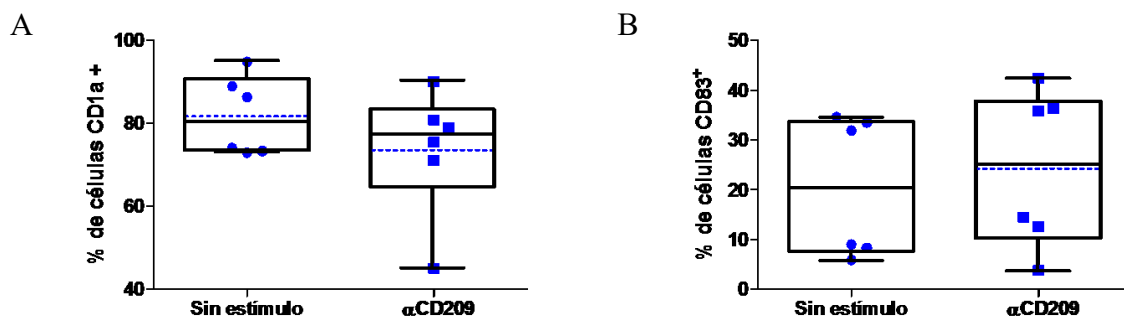
Concentración de anti-CD209 (µg/ml)	0	0.25	0.5	1	2
% de células positivas	98.86 ± 3.5	99.23 ± 2.2	99.15 ± 1.5	98.72 ± 1.7	99.14 ± 2.3

La tabla muestra promedio y desviación estándar (n=2).

Con lo anterior, podríamos decir que el anticuerpo se encuentra bloqueando en cierta medida (no totalmente) la entrada del DENV a la célula. Sin embargo, es necesario determinar el efecto de activación sobre DC's con el estímulo del anticuerpo anti CD209.

### 3.3.2 Expresión de moléculas de caracterización para células dendríticas estimuladas con el anticuerpo anti CD209

En cuanto a las moléculas de caracterización no se muestran cambios significativos, para CD1a tal como se muestra en la figura 22A con un % de expresión en DC's sin estímulo de  $81.73 \pm 9.48$  y en DC's con anti-CD209 el % de expresión fue de  $73.55 \pm 15.30$ , respecto a CD83 se muestra que el estímulo con anti-CD209 no está induciendo la maduración de DC's ya que el % de células positivas es de  $24.24 \pm 15.87$  con respecto a las DC's sin estímulo con  $20.53 \pm 14.09$  % (Figura 22B).



**Figura 22. Expresión de moléculas de caracterización CD1a y CD83 en DC's estimuladas con anti-CD209.** Gráficos de las moléculas de caracterización comparando la expresión de DC's sin estímulo (iDC's) y DC's con estímulo anti-CD209: t de student,  $p < 0.05$

### 3.3.3 Expresión de receptores de células dendríticas estimuladas con anti CD209

El receptor CD14 se encontró aumentado respecto a las DC's no estimuladas, como se observa en la figura 23A, donde se muestran diferencias significativas entre las DC's sin estímulo ( $8.98 \pm 4.07$  %) y las DC's estimuladas con anti-CD209 ( $33.90 \pm 6.74$  %), porcentajes muy similares a los de la infección, por lo que podríamos decir que el aumento de CD14 durante la infección podría deberse al estímulo de CD209 cuando el virus entra por esta vía. Respecto a CD32 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones sin estímulo y con anticuerpo anti CD209, con  $12.44 \pm 6.665$  % y  $16.58 \pm 9.31$  %, respectivamente, como se muestra en la figura 23B. Los receptores de interés tipo lectina CD205 y CD206, no presentan diferencias con el estímulo anti-CD209, para CD205 los valores fueron de  $89.41 \pm 3.706$  % en DC's sin estímulo y  $94.71 \pm 4.474$  % en DC's con el estímulo de anti-CD209, como se muestra en la figura 23C; para CD206 los valores fueron de  $91.05 \pm 5.062$  % en DC's sin estímulo y el % en DC's con el estímulo de antiCD209 fue de  $90.09 \pm 3.498$ , como se muestra en la figura 23D). Sin embargo, para el receptor CD209 se observa una disminución en el % de células positivas en las DC's con estímulo ya que al parecer el receptor es endocitado posterior a la infección, posiblemente los receptores endocitados son aquellos que no unieron al anticuerpo utilizado para estimular a las DC's; la expresión en DC's sin estímulo es de  $68.94 \pm 8.67$  % y en las DC's con estímulo es de  $56.01 \pm 7$  % tal como se muestra en la figura 23E, el porcentaje de reducción.

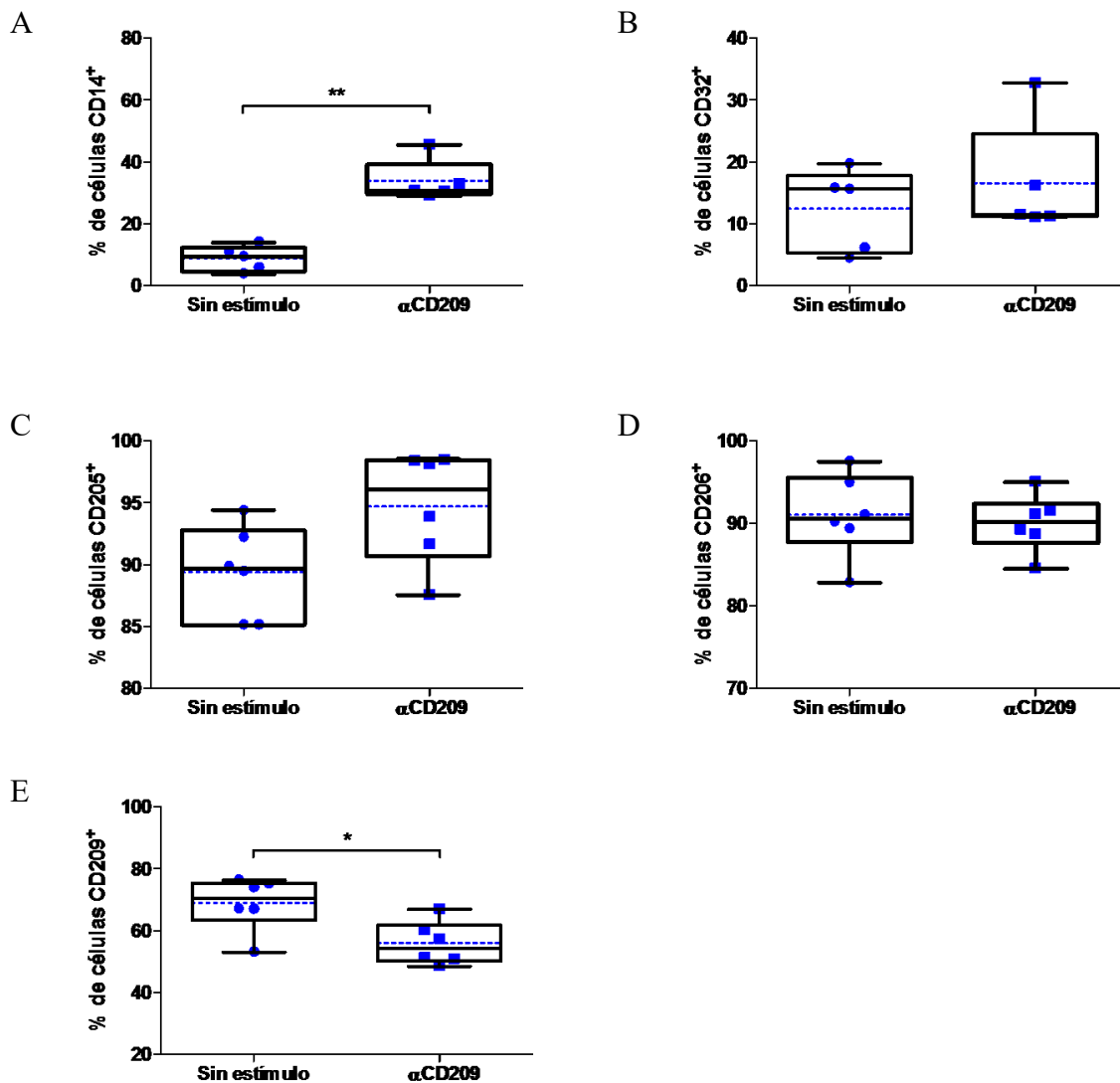
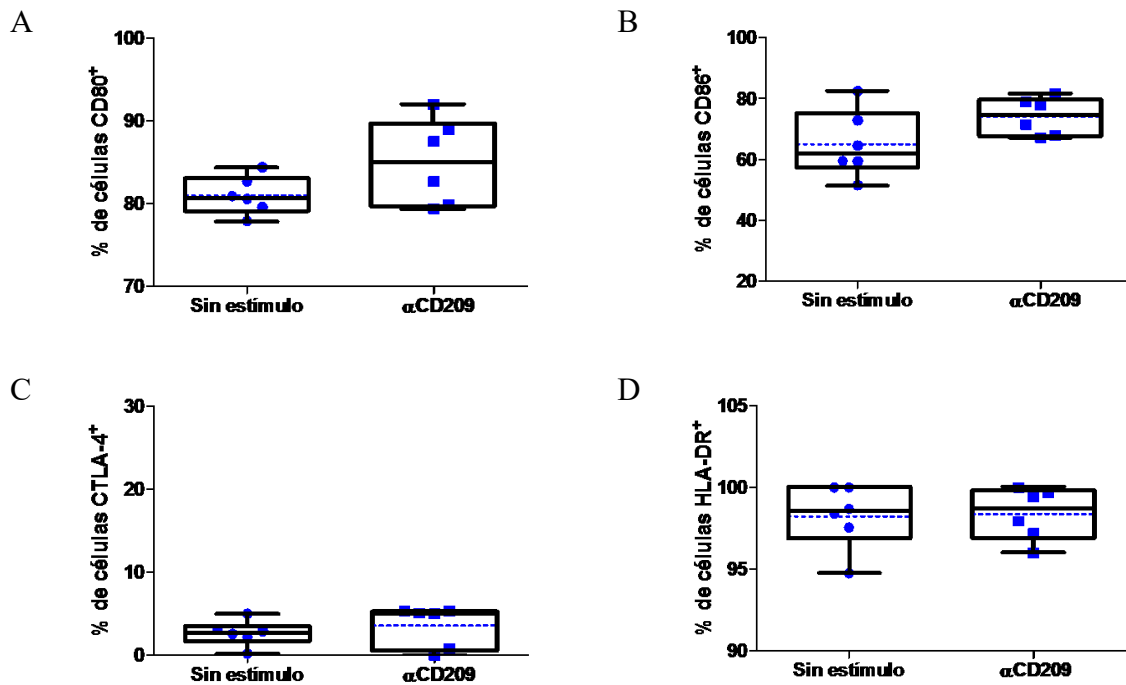


Figura 23. Expresión de receptores: CD14, CD32, CD205, CD206 y CD209 en DC's estimuladas con anti-CD209. Gráficos de los receptores comparando la expresión de DC's sin estímulo (iDC's) y DC's estimuladas con anti-CD209: (n=6) t de student,  $p < 0.05$ .

### 3.3.4 Expresión de moléculas de co-estimulación y presentación de antígeno en células dendríticas estimuladas con anti- CD209

Se evaluó la expresión de moléculas de co-estimulación CD80, CD86 y CTLA-4 moléculas de presentación de antígeno HLA-DR al estimular con anti-CD209. Se obtuvo que no hay cambios significativos en el porcentaje de células positivas, esto comprado con las DC's sin estímulo como se presentan en la figura 24.

En cuanto a las moléculas de co-estimulación se observa que no hay diferencias significativas para CD80 tenemos que el % de células positivas no varía, sin embargo, en promedio tenemos que para las DC's sin estímulo es de  $81.02 \pm 2.289$  % y en las DC's estimuladas con anti-CD209 es de  $85.07 \pm 5.15$  (figura 24A). Para CD86 tenemos que el % de células positivas de DC's sin estímulo es de  $65.05 \pm 11$  que comparado con las DC's estimuladas con anti-CD209 aumenta a  $74.14 \pm 6.1$  % (Figura 23B). En las figuras 24C y 24D se presentan los resultados para CTLA-4 y CD14 respectivamente y observamos que no hay diferencias entre ambas poblaciones de DC's. con lo anterior, podemos concluir que el estímulo logra un ligero estímulo en las DC's inducir la expresión de la molécula HLA-DR, CD86 y no inducir la expresión de la molécula CTLA-4, sin embargo, también se ve incrementada la expresión de CD14 como con el DENV-2.



**Figura 24. Expresión de moléculas de co-estimulación (CD80 yCD86) y moléculas de presentación de antígeno (CTLA-4 y HLA-DR) en DC's con anti-CD209.** Gráficos de las moléculas de co-estimulación y presentación de antígeno, comparando la expresión de DC's sin estímulo (iDC's) y DC's con estímulo anti-CD209: (n=6) t de student,  $p < 0.05$ .

### 3.3.5 Secreción de citocinas de células dendríticas con el estímulo de anti-CD209

Los niveles de citocinas no se encuentran alterados al estimular a las DC's con anti-CD209 tal como se presenta en la figura 16. Para IL-10 tenemos que la concentración es de  $31.16 \pm 10.64$  pg/ml en DC's sin estímulo concentración que no aumenta en DC's con estímulo ya que la concentración es de  $39.35 \pm 24.64$  pg/ml (figura 25A). En cuanto INF- $\gamma$  se observa que no hay aumento en la concentración ya que es de  $1.787 \pm 3.57$  pg/ml en DC's sin estímulo y de  $9.87 \pm 13.27$  pg/ml para DC's con anti-CD209 como se muestra en la figura 25B. TNF- $\alpha$  tampoco presenta diferencias ya que en DC's sin estímulo la concentración es de  $23.72 \pm 3.56$  pg/ml con respecto a las DC's con estímulo que es de  $18.41 \pm 3.78$  pg/ml (figura 25C), de igual manera a la infección no se detectaron niveles de IL-6 bajo este estímulo, con un límite de detección de 2.8 pg/ml.

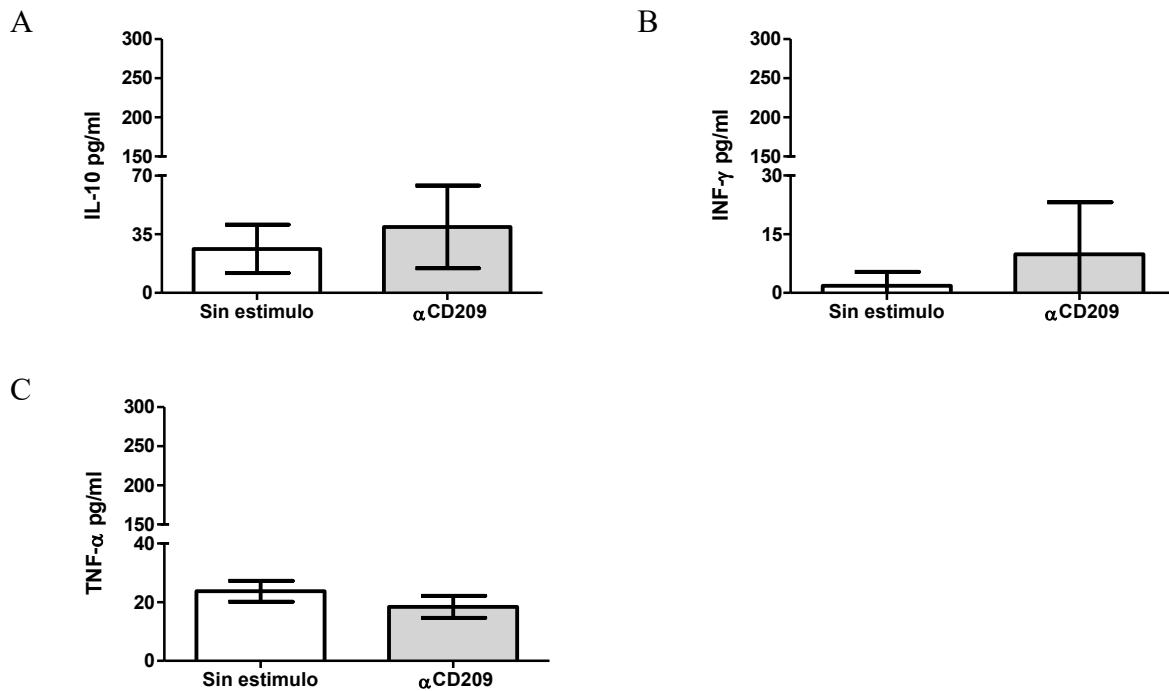


Figura 25. Niveles de citocinas IL-10, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en DC's con anti-CD209. (n=6) t de student,  $p < 0.05$ .

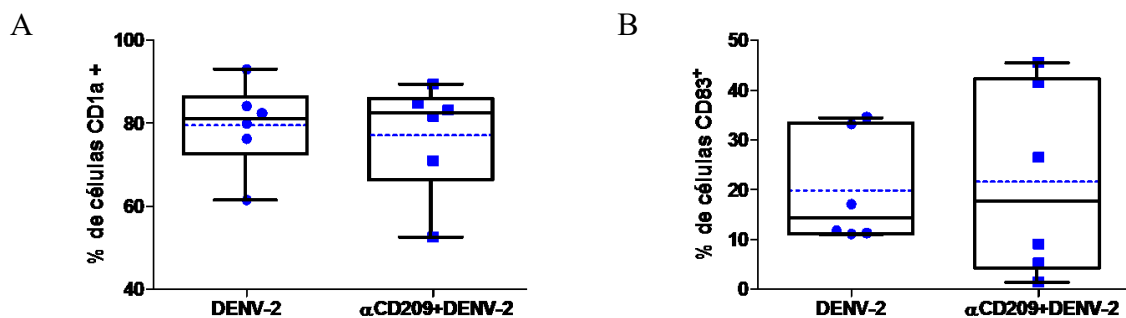
### **3.4 Cambios en moléculas de co-estimulación, receptores, citocinas y título viral al estimular las DC's con anti-CD209 e infectar con virus dengue serotipo 2**

Las DC's expresan altos niveles de moléculas de activación y co-estimulación tales como CD40, CD80, CD83 y CD86, además de una marcada expresión de HLA-DR. Algunos estudios *in vitro* muestran que las células dendríticas se activan al estar en contacto con agentes patógenos. Se han realizado algunos trabajos con DENV y han encontrado que cuando las células dendríticas se infectan expresan altos niveles de moléculas de activación y co-estimulación; sin embargo, no existe una correlación entre la expresión de moléculas de co-estimulación, receptores y citocinas; además en este objetivo evaluamos el papel que tiene el receptor CD209 en las DC's durante la infección con DENV-2.

A continuación se presenta la expresión de las moléculas de caracterización, co-estimulación, presentación de antígeno y receptores.

#### **3.4.1 Expresión de moléculas de caracterización en células dendríticas infectadas con DENV-2 y estimuladas con anti CD209 e infectadas con DENV-2**

Se evaluaron las moléculas de superficie presentes en las DC's como CD1a y se observa que no hay cambios significativos en la expresión de CD1a y CD83, en la figura 26A se presentan los gráficos, para CD1a el porcentaje promedio de células positivas es similar entre células infectadas e infectadas/estimuladas con anti CD209,  $79.54 \pm 10.46 \%$  y  $77.11 \pm 13.46 \%$ , respectivamente. Respecto a CD83 tenemos que no hay cambios significativos como se observa en la figura 26B, el porcentaje promedio de células positivas es similar entre células infectadas e infectadas/estimuladas con anti CD209,  $19.85 \pm 11.12 \%$  y  $21.58 \pm 15.87 \%$ , respectivamente.



**Figura 26. Expresión de moléculas de caracterización: CD1a y CD83 en DC's infectadas con DENV-2 y DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2. (n=6) t de student,  $p < 0.05$ .**

### 3.4.2 Expresión de receptores en células dendríticas infectadas con DENV-2 y estimuladas con anti CD209 e infectadas con DENV-2

Los resultados obtenidos muestran que el receptor CD14 muestra que al estimularlo con anti-CD209 disminuye la expresión hasta un 50% durante la infección, con un  $34.90 \pm 14.36$  % para las células infectadas y un  $17.20 \pm 14.97$  % para células infectadas y estimuladas con anti CD209, como se muestra en la figura 27A. Respecto a CD32, tenemos un comportamiento similar a CD14, disminuye su expresión de  $12.44 \pm 6.65$  % a  $7.20 \pm 4.97$ % como se presenta en la figura 27B. Otro receptor que disminuye su expresión es CD206 con  $91.05 \pm 5.06$  % en DC's infectadas con DENV-2 con respecto a las DC's que tiene estímulo previo con anti-CD209 con  $88.98 \pm 4.19$  % (figura 27D). Se observa una disminución ya que probablemente el estímulo previo con anti-CD209 está disminuyendo la entrada de virus a la célula vía receptor CD209 y por lo tanto no se activa una señalización para inducir la síntesis de otros receptores en membrana para así seguir captando más virus. CD205 y CD209 no presentan diferencias en su expresión tal como se presentan en la figura 27C y 27E.

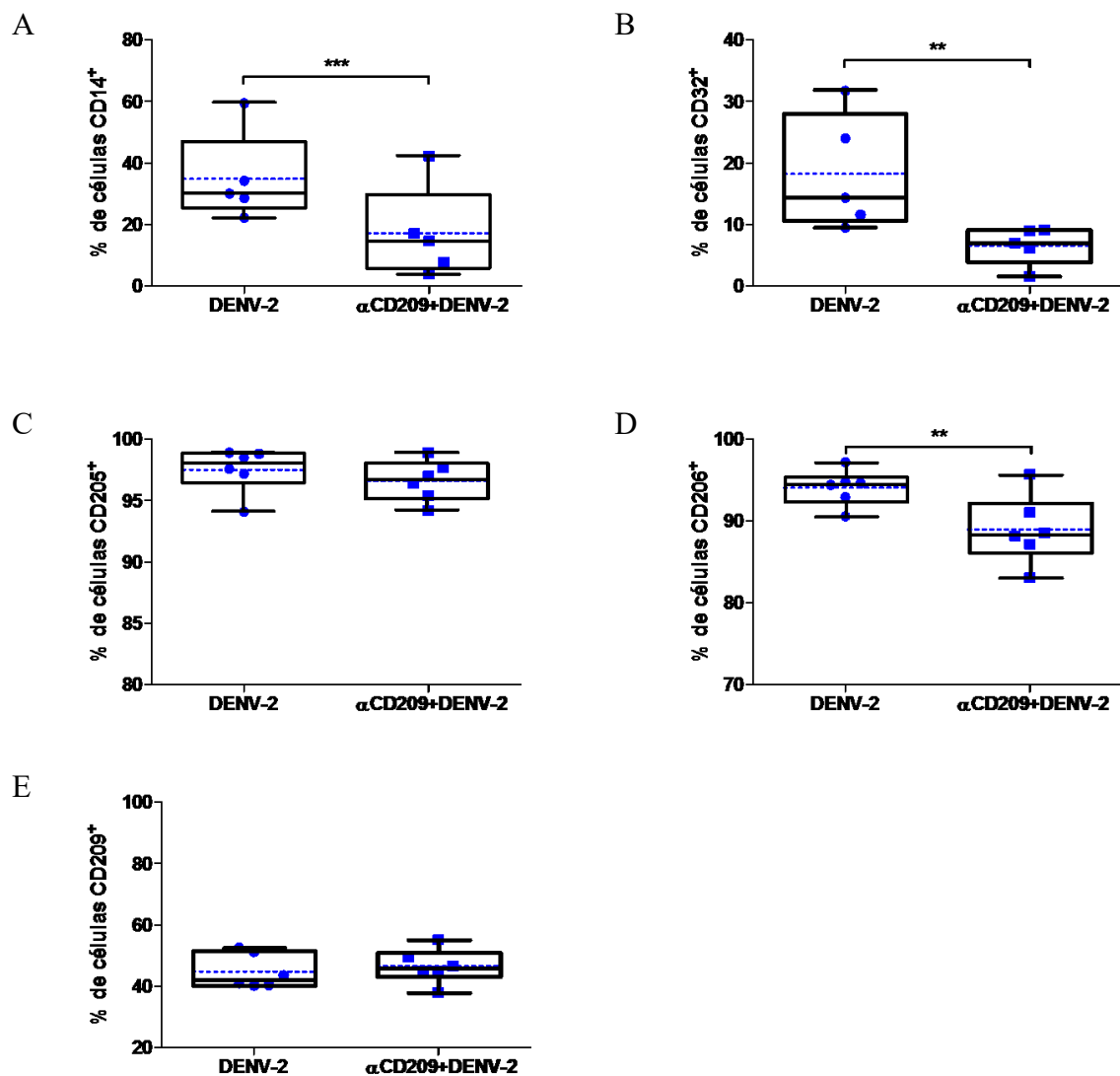
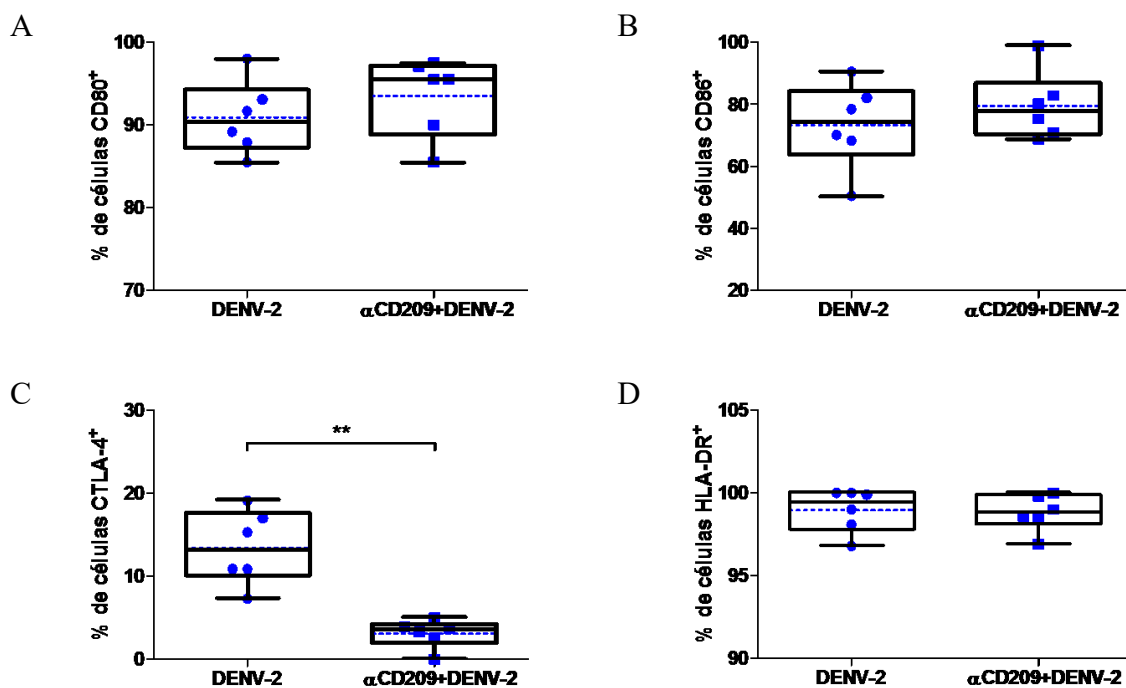


Figura 27. Expresión de receptores: CD14, CD32, CD205, CD206 y CD209 en DC's infectadas con DENV-2 y DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2. Gráficos de los receptores comparando la expresión de DC's infectadas con DENV-2 y DC's infectadas con DENV-2 con estímulo previo de anti-CD209: (n=6) t de student,  $p < 0.05$ .

### 3.4.3 Expresión de moléculas de co-estimulación y presentación en células dendríticas infectadas con DENV-2 y estimuladas con anti CD209 e infectadas con DENV-2

Las moléculas de co-estimulación no presentan diferencias significativas entre ambos grupos, infección e infección/estímulo anti CD209, sin embargo, la expresión de CD80 es mayor que CD86 como se puede observar en la figura 28 A y B.

La expresión de CD80 en DC's infectadas con DENV-2 es de  $90.90 \pm 4.4$  % y en las DC's infectadas con estímulo previo anti-CD209 es de  $93.52 \pm 4.75$  %, figura 28A. Respecto, a CD86 tenemos que la expresión va de  $73.33 \pm 13.82$  % a  $79.47 \pm 10.88$  % en DC's infectadas con DENV-2 con respecto a las células que tienen el estímulo previo de anti-CD209 (figura 28B). En cuanto a CTLA-4 se muestra que disminuye significativamente su expresión en las DC's que tienen el estímulo previo con anti-CD209, de  $13.42 \pm 4.44$  % con solo la infección a  $3.08 \pm 1.703$  % cuando se estimulan previamente con anti CD209, como se muestra en la figura 28C, lo cual es útil debido a que la célula no inducirá anergia en los linfocitos que sean estimulados. Finalmente, la molécula de presentación HLA-DR no presentó cambios significativos como se observa en la figura 28D, con porcentajes cercanos al 100%.



**Figura 28.** Expresión de moléculas de co-estimulación (CD80 yCD86) y moléculas de presentación de antígeno (CTLA-4 y HLA-DR) en DC's infectadas con DENV-2 y DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2. Gráficos de los moléculas comparando su expresión en DC's infectadas con DENV-2 y DC's infectadas con DENV-2 con estímulo previo de anti-CD209: (n=6) t de student,  $p < 0.05$ .

### 3.4.4 Secreción de citocinas en células dendríticas infectadas con DENV-2 y estimuladas con anti-CD209.

La expresión de citocinas se ve regulada por la infección con DENV-2, para IL-10 no hay diferencias significativas, sin embargo, hay una disminución en la concentración en las DC's infectadas con DENV-2 la concentración es de  $147 \pm 65.92$  que disminuye a  $112.2 \pm 35.16$  en las DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2, como se muestra en la figura 29A. Respecto a INF- $\gamma$ , no se observan diferencias significativas como se muestran en la figura 29B con valores alrededor de 45 pg/ml, para TNF- $\alpha$  se presentaron diferencias significativas, mostrando una mayor concentración en las DC's infectadas y estimuladas con anti-CD209 ( $27.97 \pm 5.449$  pg/ml), respecto a las DC's infectadas con DENV-2 sin estímulos ( $21.24 \pm 1.93$  pg/ml) como se observa en la figura 29C.

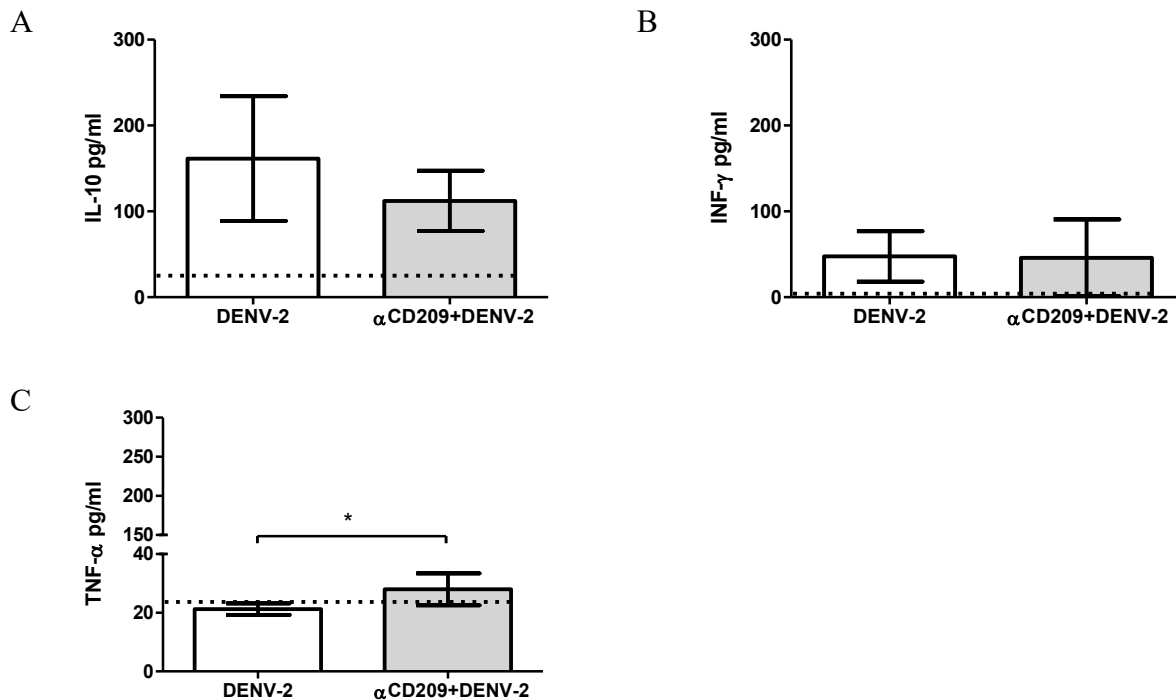
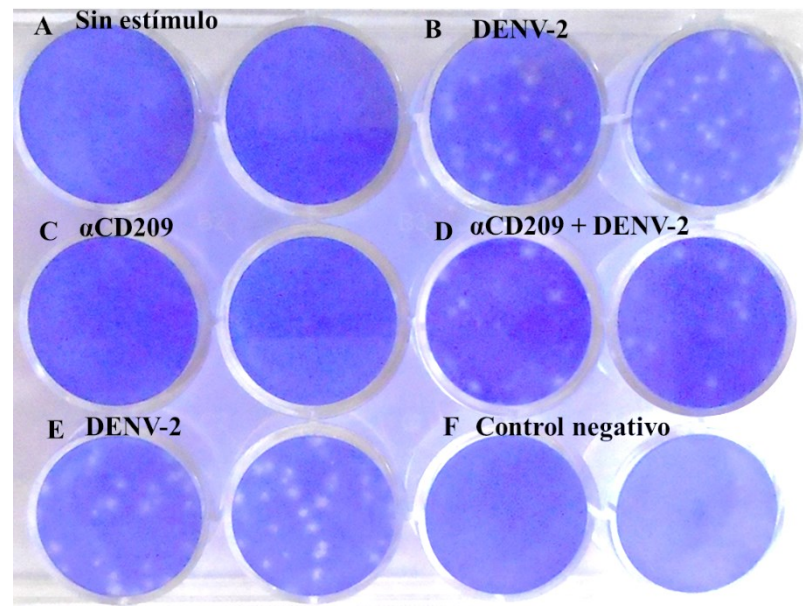


Figura 29. Niveles de citocinas IL-10, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en DC's infectadas con DENV-2 y DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2. (n=6) t de student,  $p < 0.05$ .

### 3.4.5 Título viral en células dendríticas infectadas e infectadas y estimuladas previamente con anti-CD209.

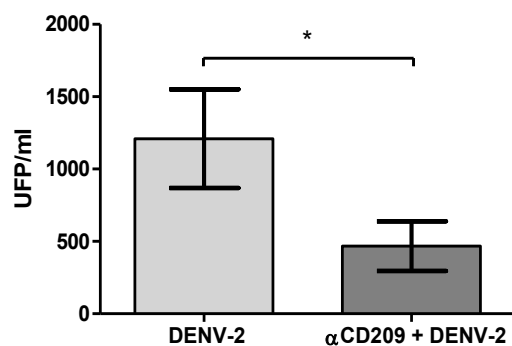
El título viral se determinó por ensayo de placas líticas (figura 30) a partir de los sobrenadantes obtenidos de las DC's a las 72 horas con las distintas condiciones de trabajo (sin estímulo, infección con DENV-2, estímulo con anti-CD209, estímulo con anti-CD209+infección con DENV-2). Se realizó el conteo de placas líticas de cada pozo y se determina así el título viral en unidades formadoras de placa por ml. Los sobrenadantes de DC's no infectadas y DC's con anti- CD209 como era de esperarse no tienen placas líticas (figura 30A y 30C). En cuanto a las DC's infectadas con DENV-2 (Figura 30B y 30E) se observa un mayor número de placas líticas con respecto a las que tienen bloqueo de CD209 e infección (Figura 30E).



**Figura 30. Ensayo de placas líticas.** En cada pozo se observa el número de placas líticas obtenido a partir del sobrenadante de DC's de las distintas condiciones. Sobrenadantes de: A. DC's sin estímulo, B. y E. DC's infectadas con DENV-2, D. DC's con anti-CD209 e infección con DENV-2 y F. Control negativo de la infección, monocapa de células sin ningún tratamiento.

Al estimular previamente células dendríticas con anti-CD209 se observa que hay una disminución de la infección con DENV-2, lo cual se corrobora al comparar el título viral para las DC's infectadas con DENV-2 con el título viral de las DC's a las cuales se ha añadido previamente anti-CD209.

Se observa en promedio una disminución del título viral de un 50 % que es estadísticamente significativa (figura 31), en DC's infectadas con DENV-2 se tienen  $1220 \pm 857.5$  UFP/ml que disminuyen a  $796.7 \pm 877.4$  UFP/ml en las DC's a las cuales se ha estimulado previamente con anti-CD209 e infectado con DENV-2. Cabe señalar que el receptor CD209 se ha descrito como la principal vía de entrada del DENV sin embargo existen otros receptores en células dendríticas que pueden mediar la entrada de virus a la célula.



**Figura 31. Título viral de sobrenadantes en DC's durante la infección con DENV-2 y DC's con estímulo previo de anti-CD209 e infección con DENV-2.** Se muestra el título viral en UFP/ml (Unidades formadoras de placa/ ml). En la gráfica se presenta el promedio y desviación estándar de n=6.

Las DC's presentan un fenotipo característico con cada estímulo como se muestra en la tabla 5, aunque el fenotipo es similar cabe señalar que los porcentajes de expresión varían en cada condición, en algunas moléculas el % varía poco pero existen diferencias significativas. Al infectar DC's con DENV-2 se observa que el fenotipo cambia significativamente en la expresión de CD14, esto debido a que la interacción dengue-receptor este activando algún factor de transcripción que este aumentando la expresión de CD14, probablemente sea la misma vía de señalización que está activando el estímulo de anti-CD209, ya que la unión anti-CD209 receptor facilita la endocitosis de este complejo y también aumenta la expresión de CD14.

En cuanto a CD209 la expresión se ve afectada ya que el receptor se ha descrito como la principal vía de entrada para DENV y por lo tanto es endocitado. Al realizar un estímulo previo con anti-CD209 en DC's podemos evaluar el papel del receptor CD209, se puede observar en la columna de estímulo con anti-CD209 que las DC's se activan y estas células son capaces de activar al linfocito T, sin embargo la respuesta no está completa ya que también debe haber expresión de otros factores como citocinas, quimiocinas etc, que activen a las DC's y por lo tanto activen correctamente al linfocito. Al realizar un estímulo previo con anti-CD209 e infectar con DENV-2 se observa que la expresión de CD14 disminuye significativamente respecto a las DC's infectadas con DENV-2, además se observa que las DC's presentan el fenotipo característico de DC's activadas, por lo tanto activaran correctamente al linfocito y eliminaran al virus.

**Tabla 6.** Fenotipo de DC's con las diferentes con condiciones.

Molécula de superficie	Fenotipo de células dendríticas			
	Sin estímulo	DENV-2	Anti-CD209	Anti-CD209 + DENV-2
CD14	+	++	++	+
CD32	+	+	+	+
CD205	++++	++++	++++	++++
CD209	+++	++	+++	+++
CD80	++++	++++	++++	++++
CD86	+++	+++	+++	++++
CTLA-4	+	+	+	+

Las cruces fueron asignadas con base a los porcentajes de células positivas; una cruz para aquellas moléculas donde el porcentaje fue de 1-20%, dos cruces para aquellas moléculas donde el porcentaje estuvo entre 21 y 45 % y tres cruces entre 46 y 75 % y cuatro cruces entre 76 y 100 %.

El fenotipo que se obtuvo en cada condición es interesante ya que al infectar a las DC's con DENV-2 se esperaba un incremento de las moléculas de co-estimulación y se obtiene que CD80 está incrementada, sin embargo, no hay incremento significativo en la expresión de CD83, que no corresponde a lo reportado [48], esto probablemente debido a que las condiciones

experimentales no fueron similares ya que en ese grupo de trabajo infectaron a las DC's con DENV-1 a MOI de 5, durante 48 horas, que difiere de nuestras condiciones de trabajo que fue infección con DENV-2 a MOI de 1 durante 72 horas. También se obtiene que hay incremento de CTLA-4 durante la infección, esta molécula es capaz de ejercer una función anérgica en linfocitos por lo tanto llegamos a la conclusión de que el DENV-2 es capaz de activar a la célula dendrítica sin embargo no asegura que se lleve a cabo una correcta activación del linfocito T.

En cuanto a las DC's con estímulo de anti-CD209 previo a la infección se obtiene que la expresión de CD14 disminuye, la expresión de CTLA-4 se mantiene baja, además de que la célula dendrítica se ha activado correctamente: hay incremento en expresión de CD80/CD86 y HLA-DR esenciales para llevar a cabo la activación del linfocito. Se llega a la conclusión de que un estímulo con anti-CD209 previo a la infección con DENV-2 las DC's no altera la activación de la célula dendrítica, lo que ayudara a eliminar eficientemente el virus que haya entrado a la célula.

### **3.5 Discusión de resultados CREI QUE YA HABIAS INCLUIDO LA DISCUSIÓN AL PrESENTAR LOS RESULTADOS**

El dengue es una enfermedad viral que continúa siendo un importante problema de Salud Pública a nivel mundial, esto debido a su rápida diseminación dependiente de vectores, además de que no existe una terapia antiviral específica. Hay importantes avances en el conocimiento de la biología del virus dengue, estructura viral y función de sus proteínas; así como en los mecanismos de replicación y traducción del genoma viral. Sin embargo, la patogénesis del dengue continúa siendo un reto en investigación, diversos estudios *in vitro* han demostrado que los monocitos y células dendríticas son el principal blanco del virus dengue en humanos debido a que poseen receptores de alta afinidad para el DENV [48]. La interacción del DENV con la célula blanco, ocurre entre la proteína E viral (dominio III, residuos de manosa de la asparagina 67 (Asn 67) de la proteína E) y el receptor CD209 (DC-SING), CD14, receptor de manosas, etc, posterior a este reconocimiento se lleva a cabo una endocitosis mediada por receptor [144].

Algunos agentes patógenos tienden a regular el proceso de activación en las DC's, por ejemplo el virus Vaccinia, Virus del Herpes, etc. inhibe la maduración de DC's por lo tanto inhibe la correcta activación de los linfocitos T, en cuanto a la infección con DENV-2 se ha observado que incrementa la expresión de moléculas de co-estimulación CD80/CD86 [48, 148]. Como se mencionó las células dendríticas son los principales blancos de la infección lo cual se ve reflejado en la respuesta inmune de los pacientes, debido a que estas células son las responsables de orquestrar la respuesta inmune innata al producir citocinas que logran activar otras células que participan en la respuesta inmune y generan un microambiente que favorece la eliminación del virus, además es capaz de inducir la respuesta adaptiva de linfocitos T, al activar adecuadamente a estas células a través de sus moléculas de presentación (que se unen al receptor TCR en linfocitos) y sus moléculas de co estimulación, que en conjunto estas dos señales logran una activación capaz de eliminar al virus. Estas señales también necesitan de una tercera señal provista por las DC's que son nuevamente las citocinas. Esta activación de linfocitos depende del estado de activación de las células dendríticas, la cual es inducida por el virus y la señalización estimulada por la unión Virus-Receptor. Por lo anterior, es importante evaluar el efecto del virus en la activación del virus y si la activación de las DC's mediante el receptor CD209 puede cambiar este estado de activación viral y la producción de citocinas.

Para el presente trabajo se diferenciaron células dendríticas *in vitro*, a partir de monocitos de sangre periférica mediante GM-CSF e IL-4, las cuales células diferenciadas presentan morfología y fenotipo de las células dendríticas inmaduras (iDC's): **CD1a<sup>+++</sup>**, **CD14<sup>+</sup>**, **CD205<sup>++++</sup>**, **CD83<sup>+</sup>**, **CD80<sup>++</sup>**, **CD86<sup>+++</sup>**, **HLA-DR<sup>++++</sup>**. Estas células fueron infectadas y/o activadas con CD209, para evaluar el efecto del virus en la activación de las DC's y si este efecto se veía alterado al inducir la activación previa con el receptor CD209.

Como se mencionó para la activación de linfocitos es necesaria la expresión de moléculas de presentación como el HLA-DR, tanto la infección como el estímulo con CD209 altos porcentajes de células cercanos al 100% presentan la expresión de esta molécula (alta expresión media por célula), es decir, el virus no trunca la presentación de antígenos virales, sin embargo, puede utilizar otros mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Algunos autores han encontrado que HLA-DR [152] es una molécula que protege a los individuos de FHD por lo tanto la expresión se debe mantener al 100 % bajo los diferentes estímulos, en estudios

anteriores en Tailandia y Cuba se encontró que ciertos alelos de HLA se encuentran asociados a la resistencia o susceptibilidad a la FHD [153]; en México han encontrado que HLA-DRB1\*4 es el alelo que se encuentra involucrado en la resistencia de FHD por lo tanto la expresión de HLA-DR siempre debe estar incrementada [154]

Otra señal importante en la activación de linfocitos serían las inducidas por las moléculas de activación, como CD80, CD86, que logran inducir un estímulo en linfocitos y CTLA-4, molécula que induce una anergia en estas células. La infección induce un aumento en el porcentaje de células que expresan la molécula CD80, pero no en CD86, sin embargo, al tener funciones similares se compensa su expresión, el estímulo con CD209 no aumenta se mantiene como en el control sin estímulo, sin embargo, con el estímulo y la infección se aumenta de nuevo el CD80 a porcentajes similares a los de la infección con DENV-2. Estos resultados concuerdan con Lozach y colaboradores [48], encontraron que al infectar DC's con DENV-1 hay un incremento en la expresión de CD80/CD86 pero al bloquear CD209 lo que encontró fue una disminución que nosotros no observamos, probablemente se debe a que las condiciones experimentales difieren en cuanto a tiempo de infección, etc. Una estimulación negativa de activación contraria a CD80/86 es la provista por CTLA-4, la cual es aumentada por el DENV-2 respecto a las células sin estímulo, el porcentaje de células que expresan este marcador se reduce con el estímulo previo con CD209. Lo anterior, podría influir positivamente en la activación de una respuesta adecuada en la eliminación del virus de manera más rápida. El presente trabajo es el primer reporte que mencione que le DENV-2 induce la expresión de CTLA-4, como mecanismo de regulación de la respuesta inmune adaptativa.

En las células infectadas con DENV, una variedad de mediadores inmunes alteran las respuestas anti-virales y activación celular, dentro de estos mediadores se encuentran las citocinas. Algunos autores han encontrado incremento de IL-10 en suero de pacientes infectados con DENV, se observan niveles más elevados en pacientes con FHD. A nivel celular IL-10 puede bloquear la actividad de NF- $\kappa$ B, vía de señalización crítica para la respuesta antiviral, ya que se podría bloquear el efecto pro-inflamatorio es decir la producción de IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ ; así como la presentación de antígenos y expresión de moléculas de co-estimulación [155-160].

Finalmente, mencionamos una tercera señal de citocinas que completa la activación de linfocitos pero también influye en el microambiente que activa a otras células de la respuesta innata. Respecto a esta señal, la infección produjo solamente IFN- $\lambda$  e IL-10, mayores niveles de IL-10 que IFN- $\lambda$ . La producción de IL-10 podría favorecer un microambiente de regulación en todas las células potenciando la anergia de la respuesta en linfocitos y en otras células. IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que puede regular la respuesta antiviral mediante la inhibición de IL-12 e IL-6 (no detectada en el presente trabajo), llevando a la activación de linfocitos con capacidad de regular así una respuesta antiviral [157, 161]. Por otro lado, el estímulo único de CD209 no produjo ninguna citocina, sin embargo, el estímulo de CD209 previo a la infección produjo de igual manera IL-10, IFN- $\gamma$  y adicionalmente TNF- $\alpha$ ; cabe resaltar que la concentración de IL-10 es ligeramente menor cuando se estimula previamente con CD209, mientras que IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son mayores que la infección con DENV2, esto podría indicar que también se está estimulando el microambiente pro inflamatorio y la respuesta tipo Th1 en linfocitos. Las células dendríticas infectadas con DENV, se ha encontrado que la expresión de IL-10 en suero se encuentran elevados. En cuanto a INF- $\gamma$  tenemos que es una citocina que se ha reportado como marcador de severidad en pacientes con dengue [162], sin embargo, tiene un papel clave en el control de infecciones virales ya potencia la transcripción de genes involucrados en actividades inmunomoduladoras, antivirales, etc. Respecto al aumento de IFN- $\gamma$  se conoce que esta citocina tiene actividad citotóxica y fagocítica en macrófagos e induce la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II en células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno [163, 164], por lo tanto, la presencia de esta citocina ayuda a las células dendríticas a incrementar la expresión de moléculas de presentación de antígeno lo cual corresponde con los resultados que obtuvimos.

Al igual que la maduración de las DC's, la expresión de los receptores que median la infección, y su activación, son importantes de monitorear en el proceso de la infección, debido a que inducen una activación y funcionan como la vía de entrada del virus a la célula, al tener más puertas se incrementará el título viral, se infectarán más células y podría relacionarse en pacientes con formas severas de la enfermedad. Po lo anterior, fueron evaluados varios de los receptores que se conoce participan en el proceso de infección tal es caso de CD14, CD32 (receptor tipo Fc), CD206 y CD209, aun cuando no se ha relacionado el receptor tipo lectina CD205, por la naturaleza del receptor y sus ligandos. Estos receptores tipo lectina, se

caracterizan por un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que reconoce manosa o galactosa presentes en la estructura de agentes patógenos, tras la captación de estos antígenos se activan vías de señalización que inducen respuestas como la secreción de citocinas específicas, esta señalización está regulada por la activación de NF- $\kappa$ B [165-169]

La molécula CD14 debe ser negativa o de baja expresión, en células dendríticas diferenciadas, esta molécula tiene función de receptor de alta afinidad para el complejo formado por LPS y la proteína de unión al LPS (LBP). Los resultados obtenidos muestran que la expresión de CD14 en DC's inmaduras es muy baja y sin embargo durante la infección con DENV-2 se aumenta su expresión significativamente, esto puede deberse a una estrategia del virus, de aumentar la expresión de receptores para asegurar su entrar a la célula, con ello aumentar los niveles de replicación e infectar a un mayor número de células, esta estrategia se ha observado en otros virus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C (HCV) que incrementan el número de receptores en superficie para seguir replicándose [170-173]. El estímulo utilizado de anti CD209 previo a la infección logra reducir la expresión de CD14 de manera significativa, sin embargo, esta aumentado respecto a las células sin estímulo y sin infección lo que podría indicar que el aumento de CD14 es debido no por efecto del virus sino de su entrada vía receptor CD209 y alguna cascada de señalización activada por el receptor, es decir al estimular previamente con anti-CD209 se bloquea en cierta medida la entrada de DENV a la célula por lo tanto se puede decir que el estímulo con anti-CD209, así como la infección con DENV-2 activan la misma vía de señalización que induce la expresión de CD14, pero cuando se lleva a cabo el estímulo anti-CD209+infección DENV-2 la vía de señalización de bloquea, por ello sería necesario medir moléculas como RAF-1 o NF- $\kappa$ B involucradas con la vías que activan la expresión de moléculas de superficie. El receptor CD32, relacionado en pacientes con el fenómeno ADE, de incremento de la infección, se encontró disminuido en el estímulo con CD209 previo a la infección, esto en un escenario de pacientes e infección sería muy importante para reducir el fenómeno ADE y las formas severas de la enfermedad.

Como ya se mencionó los receptores tipo lectina tienen una especificidad por manosa, sin embargo el número de CRD's presentes en los diferentes receptores difiere. El receptor CD206 (receptor de manosa C) altamente expresado en células dendríticas inmaduras y macrófagos, tiene ocho CRD potenciales, de los cuales solo dos han demostrado ser funcionales, CD206 se internaliza en la superficie de los endosomas tempranos y se recicla de nuevo a la membrana plasmática, durante este proceso de reciclaje, el ligando se libera de CD206 en el ambiente ácido de los endosomas para el procesamiento posterior [95, 174]. Los resultados muestran que la infección mantiene un porcentaje alto de células positivas, sin embargo, este número disminuye ligeramente pero de manera significativa al realizar el estímulo con anti CD209 previo a la infección esto podría deberse a que el estímulo induce maduración de las DC's y una disminución de los receptores de antígenos, con lo anterior, se reduciría al menos en un porcentaje la infección de otras células mediante este receptor, esto debido a que la célula dendrítica se activa y reduce su capacidad fagocítica, lo que se han encontrado algunos autores es que CD206 puede jugar un papel importante al menos en una de las etapas de la infección con DENV en macrófagos, se plantea que CD206 mejora la eficiencia de entrada de DENV a la célula ya que podría ayudar a que el virus interactúe con CD209 u otros receptores que tengan mayor afinidad por el virus, aunque también se cree que puede aumentar de la tasa de internalización de DENV, sin embargo se deberían realizar más estudios para CD206 ya que está idealmente preparado para actuar como un receptor de entrada para DENV [175].

Otro receptor endocítico tipo lectina es CD205 (DEC-205), que contiene 10 CRD y se expresa en DC's. CD205 contienen un motivo a base de tirosina para su internalización en las vesículas revestidas de clatrina [92, 93]. Esta internalización favorece que los antígenos unidos a este receptor se una directamente a las vesículas que contienen las moléculas de MHC-II con lo anterior se aumenta y hace eficiente la presentación a linfocitos T. En el presente trabajo se encontró que el virus dengue induce un aumento en el porcentaje de células positivas a este receptor, este aumento se mantiene cuando se estimula previamente a la infección. Los altos niveles de expresión de este receptor deben estar relacionados con la activación de las DC's la alta expresión de HLA-DR y CD80. Además cabe resaltar que es el primer reporte que relaciona la infección con este receptor.

El receptor CD209 estructuralmente es una proteína de membrana, con un solo CDR cuya región citoplásmica contiene 3 motivos: motivo con base de tirosina YKSL, motivo dileucina LL y un motivo tríacido EEE, motivos importantes para el reciclaje e internalización [6]. Por otro lado se ha estudiado que procesos de “splicing” alternativo y polimorfismos a nivel genético dan lugar a variantes de CD209. Tanto a nivel de RNA como a nivel proteico se ha descrito que CD209 aparece formando tetrámeros en la membrana de DC's aumentando así la avidéz por sus ligandos [176], la región del cuello es la responsable de esta multimerización, mientras que existe controversia en el papel que desempeña el CRD en la formación de tetrámeros; en este trabajo se encontró diferencias en cuanto a la infección con DENV-2 entre las diferentes muestras, cada muestra proviene de un donador y lo que se observa son títulos virales diferentes probablemente debido al polimorfismo de CD209 que conlleva a que la captura de DENV sea eficiente o no, se han realizado estudios donde se encuentran variantes génicas de CD209 entre la población (177).

En conclusión la infección induce la maduración de las células dendríticas aumenta el número de células que expresan CD80 y HLA-DR, sin embargo, también aumenta la expresión de receptores como CD14 y CD205, lo cual podría inducir un aumento en el título viral, además de lo anterior, se observa un aumento de la expresión de la molécula CTLA-4 que favorece el estado de anergia en linfocitos y un microambiente regulador con la producción de IL-10. El estímulo con CD209 previo a la infección mantiene el estado de activación de la célula al igual que la infección, pero en este caso no se observa aumento de CD14, que induzca un aumento en el título viral, además que se inhibe la expresión de CTLA-4, con lo que el estado de anergia de linfocitos se reduciría y el microambiente regulador se ve modificado por un aumento de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y una disminución de IL-10.

## CAPITULO IV

### 4 CONCLUSIONES

- La infección con DENV-2 induce la expresión de moléculas de presentación y co-estimulación necesarias para la activación de linfocitos, sin embargo, es importante destacar que se encontró un aumento en la expresión de CTLA-4, que podría inducir anergia en los linfocitos, por lo que habrá una competencia entre las moléculas CD80/86 y el CTLA-4, en la activación de los linfocitos.
- Al estimular previamente células dendríticas con anti-CD209 se observa que hay una disminución de la infección con DENV-2, lo cual se corrobora al comparar el título viral para las DC's infectadas con DENV-2 y el título viral de las DC's a las cuales se ha añadido previamente anti-CD209. Sin embargo el estímulo previo a la infección no altera la activación de células dendríticas ya que hay un incremento en la expresión de moléculas de co-estimulación CD80/CD86.
- El estímulo con CD209 previo a la infección con DENV-2 mantiene el estado de activación de la célula al igual que la infección, pero no se observa aumento de CD14, también se encontró que se inhibe la expresión de CTLA-4, además de que hay un aumento de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y una disminución de IL-10.

### 5 BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization Impact of Dengue, <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html> (Fecha de consulta 20 de Enero del 2016)
2. Samir Bhatt, Peter W. Gething, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, Andrew W. Farlow, et al. (2013). The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature* 496: 504–507
3. SINAVE (Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue). Panorama epidemiológico de Fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue, México, 2008-2016. Secretaría de Salud.
4. Fajardo D.G., Meljem M., Vicente E., Venegas P., et al. (2012). El dengue en México. Conocer para mejorar la calidad de la atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 50 (6): 631-639.

5. Bandyopadhyay S., Lum L.C., Kroeger A. (2006) Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical Medicine and International Health*. 2006; 11 (8): 1238-55.
6. Guha-Sapir D, Schimmer B. (2005). Dengue fever: new paradigmas for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol.*; 2 (1): 1.
7. Noisakran, S., Onlamoon, N., Songprakhon, O., Chokephaibulkit, K., and Chuen Perng C. (2010). Cells in Dengue Virus Infection In Vivo. *Advances in Virology* 10.
8. Guilarde, A. O., M. D. Turchi, J. B. Siqueira, Jr., V. C. Feres, B. Rocha, J. E. Levi, V. A. Souza, L. S. Boas, C. S. Pannuti, and C. M. Martelli. (2008). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever Among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response. *J Infect Dis* 197:817-824.
9. Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. A joint publication of the World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. New edition 2009: 91-105.
10. Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, et al. (2006). The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*. 368: 170-173.
11. Kuhn, R. J. et al. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717–725.
12. Clyde K., Kyle J.L., Harris E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*, 80: 11418–11431.
13. Alvarez, D. E., M. F. Lodeiro, C. V. Filomatori, S. Fucito, J. A. Mondotte, and A. V. Gamarnik. (2006). Structural and Functional Analysis of Dengue Virus RNA. *Novartis Found Symp* 277:120-132.
14. Lindenbach B., Rice C. (2003). Molecular biology of flavivirus. *Adv Virus Res.*; 59:23-61.
15. Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., et. al. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*. 5: 365-375.
16. Modis Y., Ogata S., Clements D., Harrison SC. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 22;427(6972):313-9.
17. Bollati M., Álvarez K., Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, et al. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-prproteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.*; 87:125-48.
18. Chambers T, Weir R, Grakoui A, McCourt D, Bazan J, Fletterick R, et al. (1990). Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for sitespecific cleavages in the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 87:8898-02.
19. Perera R, Kuhn R. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11:369-77.
20. Bartenger R., Miller s. (2008). Molecular aspects of dengue virus replication. *Future Microbiol* 3:155-65.
21. Johansson M, Brooks AJ, Jans DA, Vasudevan SG. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol* 2001; 82: 735-45.
22. Lindenbach BD. Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 1999; 73(6):4611-21.
23. Hidari K. and Suzuki H. (2011). Dengue virus receptor. *Tropical Medicine and Health* 39:2
24. King, A. D., A. Nisalak, S. Kalayanrooj, K. S. Myint, K. Pattanapanyasat, S. Nimmannitya, and B. L. Innis. (1999). B Cells are the Principal Circulating Mononuclear Cells Infected by Dengue Virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30:718-728.
25. Fang, S., Wu, S., Zhang, J., and An, J. (2013). Recent Advances in DENV Receptors. *The ScientificWorld Journal*
26. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*, 1998. 10(5): p. 351-3.

27. Hoffmann, J.A., et al., Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999. 284(5418):p. 1313-8.
28. Gallucci, S. and P. Matzinger, Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*, 2001. 13(1): p. 114-9.
29. Medzhitov, R., Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 2007. 449(7164): p. 819-26.
30. Abramson, S., R.G. Miller, and R.A. Phillips, The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med*, 1977.145(6): p. 1567-79.
31. Akashi, K., et al., A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 2000. 404(6774): p. 193-7.
32. Gordon, S. and P.R. Taylor, Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(12): p. 953-64.
33. Whitelaw, D.M., Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet*, 1972. 5(4): p. 311-7.
34. Tacke, F. and G.J. Randolph, Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*, 2006. 211(6-8): p. 609-18.
35. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: p. 669-92.
36. Stout, R.D. and J. Suttles, Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*, 2004. 76(3): p. 509-13.
37. Zou, W., et al., Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by beta-chemokines rather than IL-12. *J Immunol*, 2000. 165(8): p. 4388-96.
38. Duffield, J.S., The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)*, 2003.104(1): p. 27-38.
39. Akagawa, K.S., Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocytederived macrophages. *Int J Hematol*, 2002. 76(1): p. 27-34.
40. Rougier, N., D. Schmitt, and C. Vincent, IL-4 addition during differentiation of CD34 progenitors delays maturation of dendritic cells while promoting their survival. *Eur J Cell Biol*, 1998. 75(3): p.287-93.
41. Chomarat, P., et al., IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol*, 2000. 1(6): p. 510-4.
42. Conti, L. and S. Gessani, GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. *Immunobiology*, 2008. 213(9-10): p. 859-70.
43. Mellman, I. and R.M. Steinman, Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 2001. 106(3): p. 255-8.
44. Van Voorhis, W.C., et al., Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J Exp Med*, 1982. 155(4): p. 1172-87.
45. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, Dendritic cells: features and functions. *Immunol Rev*, 1980. 53: p. 127-47.
46. Lombardi, G. and Y. Vasquez, Dendritic cells. . *Handb Exp Pharmacol*, 2009(188).
47. Kubach, J., et al., Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance. *Int J Hematol*, 2005. 81(3):p. 197-203.
48. Banchereau, J., et al., Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2000. 18: p. 767-811.
49. Shortman, K. and S.H. Naik, Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(1): p. 19-30.
50. Van Voorhis, W.C., et al., Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J Exp Med*, 1983. 158(1): p. 174-91.
51. Marquez, C., et al., Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood*, 1998. 91(8): p. 2760-71.

52. Banchereau, J. and R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998. 392(6673): p. 245-52.
53. Hume, D.A., Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol*, 2008. 181(9): p.5829-35.
54. O'Neill, D.W., S. Adams, and N. Bhardwaj, Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood*, 2004. 104(8): p. 2235-46.
55. Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V., Banchereau, J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 41-52.
56. Braun, M.C., Kelsall, B.L. (2001). Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors. *Microbes Infect.* 3, 99-107.
57. Cao, S., X. Zhang, J. P. Edwards, and D. M. Mosser. (2006). NF- $\kappa$ B1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* 281: 26041-26050.
58. Cao, S., J. Liu, L. Song, and X. Ma. (2004). The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J. Immunol.* 174: 3484-3492.
59. Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 180, 5771-7.
60. Brightbill, H. D., S. E. Plevy, R. L. Modlin, and S. T. Smale. (2000). A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J. Immunol.* 164, 1940-1951.
61. Deubel V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. In: Gubler D J, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. London, United Kingdom: CAB International; 1997. pp. 335–366.
62. De Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., de Vries, J.E. (1991 a). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 174, 1209-20.
63. Chung, E. Y., J. Liu, Y. Homma, Y. Zhang, A. Brendolan, M. Saggese, J. Han, R. Silverstein, L. Selleri, and X. Ma. (2007). Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* 27: 952-964.
64. Chang, E. Y., B. Guo, S. E. Doyle, and G. Cheng. (2007). Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J. Immunol.* 178: 6705-6709.
65. Kurane I, Ennis F A. Immunopathogenesis of dengue virus infections. In: Gubler D J, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. London, United Kingdom: CAB International; 1997. pp. 273–290.
66. Perspectives on the use of cytokines in the management of infectious complications of cancer. *Clin Infect Dis.* 17 (Suppl 2); S 385-389, 1.993.
67. Hober D., Poli L., et al. (1993) Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), and Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in dengue infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 324–331.
68. Kuno G., Bailey R.E. (1994) Cytokine rponses to dengue infection among Puerto Rican patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 179–182.
69. Laur F., Murgue B., Deparis X., et al. (1998) Plasma levels of tumour necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$ -1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 654–656.
70. Banchereau, J. and R.M. Steinman. 1998. Dendritic Cells and the Control of Immunity. *Nature*, 392(6673): 245-52.
71. Winzler, C., et al., Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factordependent long-term cultures. *J Exp Med*, 1997. 185(2): p. 317-28
72. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*, 2001. 106(3): p. 263-6
73. Sporri, R. and C. Reis e Sousa, Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*, 2005. 6(2): p. 163-70.

74. Dominguez-Soto, A. and A.L. Corbi, Myeloid dendritic cell lectins and their role in immune responses. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007. 8(11): p. 910-20.
75. Parham P, Ohta T (1996). "Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules.". *Science* 272 (5258): 67–74.
76. Klitz W, Maiers M, Spellman S, Baxter-Lowe LA, Schmeckpeper B, Williams TM, and Fernandez-Vina M (2003). "New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans.". *Tissue Antigens* 62 (4): 296–307.
77. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Hurley CK, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, and Trowsdale J. (2005). "Nomenclature for factors of the HLA System, 2004.". *Tissue Antigens* 65 (4): 301–369.
78. Koppelman B, Cresswell P (1990). "Rapid nonlysosomal degradation of assembled HLA class II glycoproteins incorporating a mutant DR alpha-chain.". *J. Immunol.* 145 (8): 2730–6.
79. Clayton LK, Sieh M, Pious DA, Reinherz EL (1989). "Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 gp120 binding.". *Nature* 339 (6225): 548–51.
80. Das HK, Lawrance SK, Weissman SM (1983). "Structure and nucleotide sequence of the heavy chain gene of HLA-DR.". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80 (12): 3543–7.
81. Piatier-Tonneau D, Gastinel LN, Amblard F, et al. (1991). "Interaction of CD4 with HLA class II antigens and HIV gp120.". *Immunogenetics* 34 (2): 121–8.
82. Fernández Ponce Cecilia, Hernández Martínez Juan David, Silvera Redondo Carlos: CTLA-4, una molécula que inhibe la activación de los linfocitos T. *Salud Uninorte* 2006; 22(2) : 168-181. Consultado el 30 de julio de 2015.
83. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation". *Immunity* 1 (5): 405–13.
84. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zhang W, Straus D, Samelson LE, Thompson CB, Bluestone JA (1998). "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4". *Science* 282 (5397): 2263–6.
85. Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, Wei B, Hogg N, Garside P, Rudd CE (2006). "Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4". *Science* 313 (5795): 1972–5.
86. Dairon, M., Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15: p. 203-34.
87. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(1): p. 34-47.
88. Martina, B. E., P. Koraka, and A. D. Osterhaus. 2009. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clin Microbiol Rev* 22:564-581.
89. Geijtenbeek, T.B., and Grinhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 465-479.
90. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
91. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18, 767-811.
92. Barbet, G., M. Demion, I. C. Moura, N. Serafini, T. Léger, F. Vrtovsniak, R. C. Monteiro, R. Guinamard, J. P. Kinet, and P. Launay. (2008). The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 9: 1148-1156.
93. Zelensky, A.N., Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 272, 6179-6217.
94. L.C. Bonifaz, D.P. Bonnyay, A. Charalambous, D.I. Darguste, S. Fujii, H. Soares, M.K. Brimnes, B. Moltedo, T.M. Moran, R.M. Steinman In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination *J. Exp. Med.*, 199 (2004), pp. 815–824
95. Gazi U, Martinez-Pomares L (2009). "Influence of the mannose receptor in host immune responses". *Immunobiology* 214 (7): 554–61.
96. Cambi, A., et al. 2004. Microdomains of the C-type Lectin DC-SIGN are Portals for Virus Entry Into Dendritic Cells. *J Cell Biol*, 164(1): 145-55
97. Lozach, P. Y., L. Burleigh, I. Staropoli, E. Navarro-Sanchez, J. Harriague, J. L. Virelizier, F. A. Rey, P. Despres, F. Arenzana-Seisdedos, and A. Amara. 2005. Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule 3-Grabbing Non-Integrin (DC-SIGN)-Mediated Enhancement of Dengue Virus Infection is Independent of DC-SIGN Internalization Signals. *J Biol Chem* 280:23698-23708.
98. Geijtenbeek, T.B., et al. 2000. DC-SIGN-ICAM-2 Interaction Mediates Dendritic Cell Trafficking. *Nat Immunol*, 1(4): 353-7.

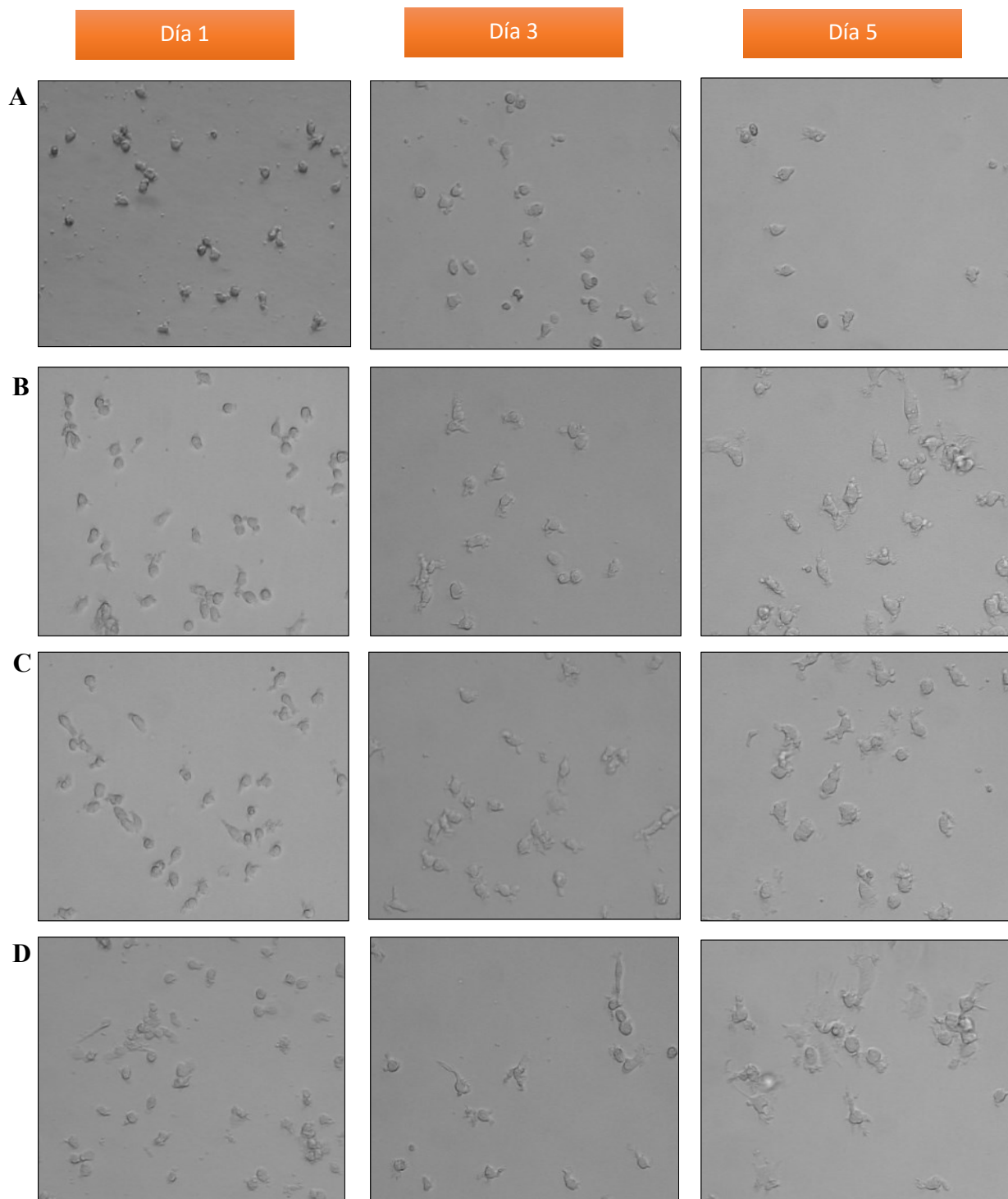
99. Geijtenbeek, T. B., R Torensma, SJ van Vliet, GC van Duijnhoven, GJ Adema, Y Van Kooyk, and CG Figdor 2000 Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100; 575-585
100. Su, VS, KB Gurney and B Lee. 2003 Sugar and Spice: Viral Envelope-DC-SIGN Interactions in HIV Pathogenesis. *Current HIV Research* Vol. 1 No.1 87-89
101. Marovich, M., G. Grouard-Vogel, M. Louder, M. Eller, W. Sun, S. J. Wu, R. Putvatana, G. Murphy, B. Tassaneeritthep, T. Burgess, D. Birx, C. Hayes, S. Schlesinger-Frankel, and J. Mascola. 2001. Human Dendritic Cells as Targets of Dengue Virus Infection. *J Invest Dermatol Symp Proc* 6:219-224.
102. Tassaneeritthep, B., Burgess, D., et al. (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med*; 197 (7): 823-9
103. Zelensky, A.N., Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 272, 6179-6217.
104. McGreal, E.P., Matinez-Pomares, L., and Gordon, S. (2004). Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol immunol* 41, 1109-1121
105. Caparros, E., et al., DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood*, 2006. 107(10): p. 3950-8.
106. Chehimi, J., et al., HIV-1 transmission and cytokine-induced expression of DC-SIGN in human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol*, 2003. 74(5): p. 757-63.
107. Engering, A., et al., The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*, 2002. 168(5): p. 2118-26.
108. Martina, B. E., P. Koraka, and A. D. Osterhaus. 2009. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clin Microbiol Rev* 22:564-581.
109. Ackermann, M.; Padmanabhan, R. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 39926–39937.
110. Alvarez, D.E.; de Lella Ezcurra, A.L.; Fucito, S.; Gamarnik, A.V. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 2005, 339, 200–212.
111. Ank, N.; West, H.; Paludan, S.R. IFN-lambda: Novel antiviral cytokines. *J. Interferon Cytokine Res.* 2006, 26, 373–379.
112. Ashour, J.; Laurent-Rolle, M.; Shi, P.Y.; Garcia-Sastre, A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J. Virol.* 2009, 83, 5408–5418.
113. Ashour, J.; Morrison, J.; Laurent-Rolle, M.; Belicha-Villanueva, A.; Plumlee, C.R.; Bernal-Rubio, D. Williams, K.L.; Harris, E.; Fernandez-Sesma, A.; Schindler, C.; Garcia-Sastre, A. Mouse STAT2 restricts early dengue virus replication. *Cell Host Microbe* 2010, 8, 410–421.
114. Basler, C.F.; Wang, X.; Muhlberger, E.; Volchkov, V.; Paragas, J.; Klenk, H.D.; Garcia-Sastre, Palese, P. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 12289–12294.
115. Best, S.M.; Morris, K.L.; Shannon, J.G.; Robertson, S.J.; Mitzel, D.N.; Park, G.S.; Boer, E., Wolfenbarger, J.B.; Bloom, M.E. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J. Virol.* 2005, 79, 12828–12839.
116. Chen, S.T.; Lin, Y.L.; Huang, M.T.; Wu, M.F.; Cheng, S.C.; Lei, H.Y.; Lee, C.K.; Chiou, T.W.; Wong, C.H.; Hsieh, S.L. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 2008, 453, 672–676.
117. Diamond, M.S.; Harris, E. Interferon inhibits dengue virus infection by preventing translation of viral RNA through a PKR-independent mechanism. *Virology* 2001, 289, 297–311.
118. Diamond, M.S.; Roberts, T.G.; Edgil, D.; Lu, B.; Ernst, J.; Harris, E. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J. Virol.* 2000, 74, 4957–4966.
119. Zhihua K., Quinn M., Chen H 2008 “Monocytes, But Not T or B Cells, Are the Principal Target Cells for Dengue Virus (DV) Infection Among Peripheral Blood Mononuclear Cells” . *Journal of Medical Virology* 80:134-146.
120. Fernandez-Garcia M.,Mazzon M.,Jacobs M., Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe* 2009;5:318-328
121. Byron M, Koraka P, Osterhaus A; Dengue virus pathogenesis: an integrated view; *clinical microb revws* 2009 22 (4).
122. Durbin, A. P., M. J. Vargas, K. Wanionek, S. N. Hammond, A. Gordon, C. Rocha, A. Balmaseda, and E. Harris. 2008. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology* 376:429–435.

123. Halstead SB, O'Rourke EJ. 1977b. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146:201–217.
124. Edgil D, Polacek C, Harris E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J Virol*. 2006;80:2976–2986.
125. Muñoz Jordan J, Sanchez-Burgos G, Laurent-Rolle M, García-Sastre A; Inhibition of interferón signaling by dengue virus. *PNAS* 2003; 100 14333–14338.
126. Simmons CP, Popper S, Dolocsek C, Chau TN, Griffiths M, Dung NT, et al. (2007). Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2007 Apr 15;195(8):1097–107.
127. Clyde K, Kyle J, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J virol* 2006, 80 (23) 11418–11431
128. Ho, L.J.; Hung, L.F.; Weng, C.Y.; Wu, W.L.; Chou, P.; Lin, Y.L.; Chang, D.M.; Tai, T.Y.; Lai, J.H. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J. Immunol*. 2005, 174, 8163–8172.
129. Gubler D J, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A. Viremia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull W H O*. 1981;59:623–630.
130. Guzman M G, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996;3:621–627.
131. Halstead S B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med*. 1970;42:350–362.
132. Halstead S B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988;239:476–481.
133. Halstead S B, O'Rourke E J. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature (London)* 1977;265:739–741.
134. Innis B L. Dengue and dengue hemorrhagic fever. In: Porterfield J S, editor. *Exotic viral infections—1995*. London, United Kingdom: Chapman & Hall; 1995. pp. 103–146.
135. Bethell D.B., Flobbe K., et al. (1998). Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 177, 778–782.
136. Agarwal R., Elbishbishi E.A., Chaturvedi U.C., Nagar R., Mustafa A.S. (1999) Profile of transforming growth factor- $\beta$ 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. *Int. J. Exp. Pathol*. 80, 143–149.
137. Agarwal R., Chaturvedi U.C., Misra A., Kapoor S., Nagar R., Tandon R. (1998) CD4 positive T cells produce cytotoxic factor in cases of dengue haemorrhagic fever. *Curr. Sci*. 74, 237–239.
138. Avirutnan P., Malasit P., Seliger B., Bhakdi S., Husmann M. (1998). Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J. Immunol*. 161, 6338–6346.
139. Green S., Vaughn D.W., Kalayanarooj S., Nimmannitya S., Suntayakorn S., Nisalak A., Rothman A.L., Ennis F.A. (1999). Elevated plasma interleukin levels in acute dengue correlate with disease severity. *J. Med. Virol*. 59,329–334.
140. Rothman A.L. (1997). Viral pathogenesis of dengue infection. In: *Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever* (Gubler D.J., Kuno G., Eds.), pp. 245–271. CAB International, Wallingford.
141. Mondotte, J.A., Lozach, P.Y., Amara, A., Gamarnik, A.V., 2007. Essential role of dengue virus envelope protein N-glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J. Virol*. 81, 7136–7148.
142. Chen, Y., T. Maguire, R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. D. Esko, R. J. Linhardt, and R. M. Marks. 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med*. 3:866–871.
143. Davis, C. W., L. M. Mattei, H. Y. Nguyen, C. Ansarah-Sobrinho, R. W. Doms, and T. C. Pierson. 2006. The location of asparagine-linked glycans on West Nile virions controls their interactions with CD209 (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin). *J. Biol. Chem*. 281:37183–37194.
144. Hung, J. J., M. T. Hsieh, M. J. Young, C. L. Kao, C. C. King, and W. Chang. 2004. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J. Virol*. 78:378–388.
145. Lozach, P. Y., L. Burleigh, I. Staropoli, E. Navarro-Sanchez, J. Harriague, J. L. Virelizier, F. A. Rey, P. Despres, F. Arenzana-Seisdedos, and A. Amara. 2005. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J. Biol. Chem*. 280:23698–23708.
146. Modis, Y., S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison. 2003. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:6986–6991.

147. Modis, Y., S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427:313-319.
148. Navarro-Sanchez, E., R. Altmeyer, A. Amara, O. Schwartz, F. Fieschi, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and P. Despres. 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.
149. Parodi, A. J. 2000. Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 69:69-93.
150. Pokidysheva, E., Y. Zhang, A. J. Battisti, C. M. Bator-Kelly, P. R. Chipman, C. Xiao, G. G. Gregorio, W. A. Hendrickson, R. J. Kuhn, and M. G. Rossmann. 2006. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell* 124:485-493.
151. Yun-Chi, C., Sheng-Yuan W., Chwan-Chuen K., (1999). Bacterial Lipopolysaccharide Inhibits Dengue Virus Infection of Primary Human Monocytes/Macrophages by Blockade of Virus Entry via a CD14-Dependent Mechanism. *J. Virol.* April 1999 vol. 73 no. 42650-2657.
152. G. Vargas-Alarcón, G. Hernández-Pacheco, R. Gamboa, J. Zuñiga, C. Flores, E. Gómez-Casado, J. Martínez-Laso, J. Granados, A. Arnaiz-Villena. (2000). Polymorphism and distribution of HLA-DR2 alleles in Mexican populations. *Hum Immunol*, 62, p. 286
153. P. Chiewsilp. (1981). Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 30, p. 1100
154. La Fleur C. 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. *Human Immunology* 63, 1039–1044.
155. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, Rothman AL, Ennis FA. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol.* 1999;59:329–334.
156. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63:71–75.
157. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:14333–14338.
158. Butthep P, Chunhakan S, Yoksan S, Tangnararatchakit K, Chuansumrit A. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(12):e232–e238.
159. Brasier AR, Ju H, Garcia J, Spratt HM, Victor SS, Forshey BM, Halsey ES, Comach G, Sierra G, Blair PJ. et al. A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:341–348. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0469.
160. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.*2008;226:205–218.
161. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.*2010;10:170–181.
162. Houghton-Trivino N, Salgado DM, Rodriguez JA, Bosch I, Castellanos JE. Levels of soluble ST2 in serum associated with severity of dengue due to tumour necrosis factor alpha stimulation. *J Gen Virol.*2010;91:697–706.
163. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:454–465.
164. Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V., Banchereau, J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 41-52.
165. Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B. (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity.* 26, 605-616.
166. Cao, S., X. Zhang, J. P. Edwards, and D. M. Mosser. (2006). NF-κB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* 281: 26041-26050.
167. Courtois, G., Gilmore, T.D. (2006). Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene.* 25, 6831-43.
168. Hayden, M.S., Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195-224.
169. Hayden, M.S., Ghosh, S. (2011). NF-κB in immunobiology. *Cell Res.* 21, 223-44
170. Wilflingsleder D, Banki Z, Dierich MP, Stoiber H. Mechanisms promoting dendritic cell-mediated transmission of HIV. *Mol Immunol* 2005; 42: 229-37.

171. Burleigh L, Lozach PY, Schiffer C et al. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol* 2006; 80: 2949-57.
172. Laskus T, Radkowski M, Piasek A, et al. Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes. *J Infect Dis* 2000; 181: 442-8.
173. Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, et al. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003; 278: 20358-66.
174. Schaeffer E. et al. (2015). Dermal CD14(+) Dendritic Cell and Macrophage Infection by Dengue Virus Is Stimulated by Interleukin-4. *J Invest Dermatol.* 2015 Jul;135(7):1743-51.
175. Miller JL, de Wet BJM, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, et al. (2008) Correction: The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathog* 4(3): 10.
176. Feinberg, H., et al., (2005). Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Biol Chem.* 280(2): p. 1327-35.
177. Sakuntabhai, A., et al., (2005) A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet.* 37(5): p. 507-13.

## 6 APÉNDICE



**Figura 1. Monocitos diferenciados a células dendríticas: día 1, 3 y 5 de diferenciación.** Se evaluaron 3 concentraciones de GM-CSF e IL-4 en en ng/ml A) observamos células sin citocinas, B) la concentración de 50 y 25 ng/mL, en C) 100 y 50 ng/mL, D) 200 y 100 ng/mL, respectivamente.