



Universidad Veracruzana

**UNIVERSIDAD VERACRUZANA**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROCESOS BIOLÓGICOS**



Maestría en Ciencias en  
Procesos Biológicos

**TESIS**

**“EFECTO DE LAS PROTEÍNAS GST-NS3 DERIVADAS  
DEL VIRUS DENGUE SOBRE UN CULTIVO PRIMARIO DE  
CÉLULAS NK Y DE LA LÍNEA CELULAR NK-92 DE  
HUMANO”**

**PRESENTA**

**Q.F.B. Denisse Placier Sosa**

**DIRECTOR**

**Dra. Aracely López Monteon**

**ORIZABA, VER.**

**OCTUBRE, 2017**

**Número de Becario CONACYT 326047**



Universidad Veracruzana  
Maestría en Ciencias en Procesos Biológicos

A LA C.

**DENISSE PLACIER SOSA**

ALUMNA DEL PROGRAMA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROCESOS BIOLÓGICOS

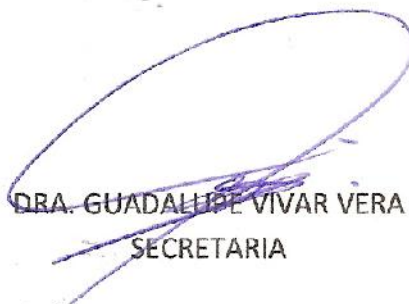
P R E S E N T E

Habiendo sido debidamente revisado y aceptado el trabajo de TESIS titulado: "Efecto de las proteínas GST-NS3 derivadas del virus dengue sobre un cultivo primario de células nk y de la línea celular NK-92 de humano" y estando de acuerdo el Comité Revisor de que el contenido es y cumple con los requisitos establecidos por el programa para el Examen final, **SE AUTORIZA** a usted para que proceda con la impresión del citado Trabajo.

ATENTAMENTE

**"LIS DE VERACRUZ: ARTE, CIENCIA, LUZ"**

Orizaba, Ver. a 17 de octubre de 2017



DRA. GUADALUPE VIVAR VERA  
SECRETARIA



Vo Bo



COORDINADORA DE LA MCPB  
DRA. MARTHA PAOLA RASCÓN DÍAZ

Vo Bo



DIRECTOR  
M. EN C. LUIS ALBERTO SÁNCHEZ BAZÁN

El presente trabajo de investigación fue realizado en el LADISER Inmunología y Biología Molecular, adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana en la ciudad de Orizaba, Ver., bajo la dirección de la Dra. Aracely López Monteon. Durante la realización de este proyecto recibí apoyo del programa de becas para estudios de posgrado otorgado por el CONACyT No. de Becario: 326047

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES GENERALES	2
1.1. Enfermedad del dengue	2
1.2. Agente etiológico	2
1.3. Proteínas virales	3
1.3.1. Proteínas estructurales	3
1.3.1.1. Proteína de cápside (C)	3
1.3.1.2. Proteína precursora de membrana (prM) y proteína de membrana (M)	4
1.3.1.3. Proteína de envoltura (E)	4
1.3.2. Proteínas no estructurales	5
1.3.2.1. Proteína NS1	5
1.3.2.2. Proteína NS2	5
1.3.2.3. Proteína NS3	6
1.3.2.4. Proteína NS4	6
1.3.2.5. Proteína NS5	7
1.4. Replicación del DENV	7
1.5. Manifestaciones clínicas de la infección por DENV	9
1.5.1. Dengue sin signos de alarma (Grupo A)	9
1.5.2. Dengue con signos de alarma (Grupo B)	9
1.5.3. Dengue severo (Grupo C)	10
1.6. Diagnóstico del DENV	10
1.6.1. Diagnóstico serológico	10
1.6.1.1. Inhibición indirecta de la hemaglutinación	11

1.6.1.2. Fijación del complemento	11
1.6.1.3. Prueba de neutralización	11
1.6.1.4. MAC-ELISA para detección de IgM	12
1.6.1.5. ELISA indirecto para IgG	12
1.6.2. Diagnóstico molecular	12
1.6.2.1. Transcriptasa inversa seguida de PCR (RT-PCR)	13
1.6.2.2. PCR en tiempo real (qRT-PCR)	13
1.7. Tratamiento	13
1.8. Epidemiología	14
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	16
2.1. Respuesta inmune innata contra el DENV	16
2.2. Natural Killer	18
2.2.1. Moléculas de diferenciación	20
2.2.1.1 CD56	21
2.2.1.2 CD16	22
2.2.2 Otras moléculas de diferenciación	24
2.2.2.1 CD25	24
2.2.2.2 CD28	24
2.2.2.3 CD57	25
2.2.2.4 CD69	25
2.2.2.5 CD95/CD95L	26
2.3 Línea celular NK-92	27
2.4 Respuesta de las células NK frente al DENV	27
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
4.1. Hipótesis	31
4.2. Objetivo general	31
4.3. Objetivos específicos	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1. Ensayos de transformación bacteriana	32
5.1.1. Preparación de células competentes DH5 $\alpha$	32

5.1.2. Transformación de células competentes DH5 $\alpha$	32
5.1.3. Preparación de DNA plasmídico a mediana escala	33
5.2. Expresión y purificación de la proteína fusionada a GST	34
5.2.1. Preparación de la resina glutatión	34
5.2.2. Expresión de las proteínas recombinantes GST-NS3-DEN1, GST-NS3-DEN2, GST-NS3-DEN3 y GST-NS3-DEN4	34
5.2.3. Solubilización de los cuerpos de inclusión y eliminación de la urea por medio de diálisis	35
5.2.4. Purificación de las proteínas recombinantes GST-NS3-DEN1, GST- NS3-DEN2, GST-NS3-DEN3 y GST-NS3-DEN4	35
5.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	36
5.4. Cuantificación de proteínas	36
5.4.1. Tinción con negro de amido	36
5.4.2. Cuantificación de proteína por Micro Bradford	36
5.5. Propagación y mantenimiento “ <i>in vitro</i> ” de cultivos de NK-92	37
5.6 Aislamiento y purificación de células NK mediante DYNABEADS <sup>®</sup>	37
5.6.1 Purificación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante el sistema HISTOPAQUE <sup>®</sup>	37
5.6.2 Aislamiento de células NK de humano por DYNABEADS <sup>®</sup>	37
5.6.2.1 Lavado de DYNABEADS <sup>®</sup>	37
5.6.2.2 Preparación de células	38
5.6.2.3 Aislamiento de células NK	38
5.7 Ensayo de citometría de flujo para la caracterización de las células NK de humano y de la línea celular NK-92	39
5.8. Estimulación <i>in vitro</i> de la línea celular NK-92 y las células NK de humano con las proteínas recombinantes GST-NS3-DEN1, GST-NS3-DEN2, GST-NS3- DEN3 y GST-NS3-DEN4	40
5.9 Determinación de la expresión intracelular de IFN- $\gamma$ , granzima b, y perforina	40
5.10 Determinación de la expresión de citocinas	41
5.10.1. ELISA	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43

7. CONCLUSIONES	62
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estructura del DENV	3
<b>Figura 2.</b> Genoma del DENV	7
<b>Figura 3.</b> Replicación del DENV	8
<b>Figura 4.</b> Incidencia y serotipos aislados de dengue, por entidad federativa, Mexico 2016	15
<b>Figura 5.</b> Teorías sobre la patogénesis inmune del DENV	18
<b>Figura 6.</b> Purificación de la proteína recombinante GST-NS3	43
<b>Figura 7.</b> Precipitación de la proteína recombinante GST-NS3 DEN1-4 y GST	44
<b>Figura 8.</b> Microscopia de células NK de humano y cultivo “in vitro” de células NK-92 en medio alfa-MEM completo	46
<b>Figura 9.</b> Dot-plots e histogramas correspondientes a la caracterización de las células de cultivo primario y de la línea celular NK-92	47
<b>Figura 10.</b> Caracterización de las células NK	48
<b>Figura 11.</b> Histogramas correspondientes a la expresión de IFN- $\gamma$ , perforina y granzima b	50
<b>Figura 12.</b> Intensidad media de fluorescencia de IFN- $\gamma$	51
<b>Figura 13.</b> Intensidad media de fluorescencia de perforina	52
<b>Figura 14.</b> Intensidad media de fluorescencia de granzima b	53
<b>Figura 15.</b> Determinación de TNF- $\alpha$ en células NK de cultivo primario y en la línea celular NK-92 por ELISA	55
<b>Figura 16.</b> Determinación de CCL3 en células NK de cultivo primario y en la línea celular NK-92 por ELISA	57



**Figura 17.** Determinación de CCL4 en células NK de cultivo primario y en la línea celular NK-92 por ELISA 58

**Figura 18.** Determinación de CCL5 en células NK de cultivo primario y en la línea celular NK-92 por ELISA 59

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

**Tabla I.** Marcaje de células con anticuerpos para ensayos de citometría de flujo 39

**Tabla II.** Marcaje de células con anticuerpos para ensayos de citometría de flujo41

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
ADA	Amplificación dependiente de anticuerpos
ADC	Citotoxicidad dependiente de anticuerpos
APC	Célula presentadora de antígeno
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Célula dendrítica
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DENV	Virus dengue
DH	Dengue hemorrágico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	Ácido ribonucleico de doble cadena
ELISA	Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas
FD	Fiebre por dengue
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue
G-CSF	Factor estimulador de colonia del granulocito
GM-CSF	Factor estimulador de colonia del macrófago y granulocito
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IFN	Interferón
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
M	Molar
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MIP1-α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1-α
MIP1-β	Proteína inflamatoria de macrófagos 1-β
mL	Mililitro

mM	Milimolar
NK	Célula asesina natural
NKT	Linfocito T asesino natural
NRNP	Neutralización por reducción del número de placas
NS	No estructural
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
prM	Precursor de membrana
PRRS	Receptores de reconocimiento de patrones
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa en tiempo real
RANTES	Células T normales, expresadas y secretadas reguladas en la activación
RE	Reticulo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
RNAv	Acido ribonucleico viral
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
SCD	Síndrome de choque por dengue
TGN	Red trans-Golgi
TLR	Receptores tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento celular endotelial vascular

## RESUMEN

El dengue es causado por cualquiera de los cuatro serotipos descritos del virus dengue (DENV) y es considerada una de las enfermedades virales transmitidas por vectores más importante a nivel mundial. El DENV promueve la producción de citocinas a través de diversas células, las cuales tienen una actividad biológica antiviral al reclutar a otras estirpes celulares como las células asesinas naturales (NK) cuya finalidad es eliminar a las células infectadas por partículas virales. El dominio de proteasa de la proteína NS3 del DENV está asociado a la inducción de respuestas celulares necesarias para el aclaramiento viral, por lo cual en el presente trabajo el objetivo fue evaluar el efecto de las proteínas recombinantes GST-NS3 de los cuatro serotipos del DENV sobre células NK para así poder comprender el papel de éstas células durante la infección. Con este fin, se purificaron las proteínas recombinantes GST-NS3-DEN1-DEN4 mediante cromatografía de afinidad a glutatión-agarosa. A la par se realizó el aislamiento de las células NK de sangre periférica mediante selección negativa y se propagaron de manera “*in vitro*” cultivos de la línea celular NK-92 para posteriormente caracterizarlos por citometría de flujo utilizando los marcadores CD56+, CD16+ y CD3-. Posterior a la caracterización, los cultivos se estimularon “*in vitro*” con las proteínas recombinantes GST-NS3-DEN1-DEN4, con las células se realizó la determinación de IFN- $\gamma$ , granzima b y perforina por citometría de flujo y con los sobrenadantes se realizó la determinación de TNF- $\alpha$ , CCL3, CCL4 y CCL5 mediante ELISA. Los resultados mostraron que el fenotipo encontrado en las células aisladas de sangre periférica fue CD56<sup>dim</sup>, debido a que se presentó una alta reactividad de CD16 y una baja producción de citocinas como IFN- $\gamma$ , no se lograron observar diferencias significativas en la expresión de IFN- $\gamma$ , perforina y granzima b en las NK de humano y de la línea celular, probablemente debido al cultivo suplementado con IL-2, pero se logró observar la expresión de TNF- $\alpha$  y CCL3 en las células NK de cultivo primario y en la línea celular se logró observar la expresión de TNF- $\alpha$ , CCL3, CCL4 y CCL5 lo que sugiere que se aislaron también células CD56<sup>bright</sup>. Estos resultados permiten sugerir que las células NK tienen un papel dual en la enfermedad del dengue tanto en protección y patogénesis.

## **ABSTRACT**

Dengue is caused by any of the four described serotypes of DENV and is considered one of the most important vector-transmitted viral diseases worldwide. DENV promotes the production of cytokines through various cells, which have a biological antiviral activity by recruiting other cell lines such as natural killer (NK) cells, whose purpose is to eliminate infected cells by viral particles. The protease domain of the NS3 protein of DENV is associated with the induction of cellular responses necessary for viral clearance, so in this work the objective was evaluate the effect of the recombinant proteins GST-NS3 of the four serotypes of DENV on NK cells in order to understand the role of these cells during infection. To this end, the recombinant proteins GST-NS3DEN1-DEN4 were purified by glutathione-agarose affinity chromatography. At the same time, NK cells were isolated from peripheral blood by negative selection and cultures of the NK-92 cell line were propagated “in vitro” to characterize them by flow cytometry using the markers CD56+, CD16+ and CD3-. After characterization, the cultures were stimulated “in vitro” with the recombinant proteins GST-NS3-DEN1-DEN4, with the cells the determination of IFN- $\gamma$ , granzyme b and perforina was performed by flow cytometry and with the supernatants the determination of TNF- $\alpha$ , CCL3, CCL4 and CCL5 was performed by ELISA. The results showed that the phenotype found in cells isolated from peripheral blood was CD56<sup>dim</sup>, because they showed a high reactivity of CD16 and a low production of cytokines such as IFN- $\gamma$ , no significant differences were observed in the expression of IFN-  $\gamma$ , perforin and granzyme b in human NK and of the cell line, probably due to the culture supplemented with IL-2, but it was possible to observe the expression of TNF- $\alpha$  and CCL3 in the NK cells of primary culture and in the cell line the expression of TNF- $\alpha$ , CCL3, CCL4 and CCL5 was observed, suggesting that CD56<sup>bright</sup> cells were also isolated. These results suggest that NK cells have dual role in dengue disease in both protection and pathogenesis.

## INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad aguda causada por el DENV, el cual es transmitido a los humanos por la picadura de la hembra del mosquito *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*, siendo *Aedes aegypti* el principal vector en el hemisferio occidental.

El DENV es un arbovirus de la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, especie Dengue y cuatro subespecies o serotipos que van del DENV1 al DENV4, los cuales tienen características antigénicas y serología diferentes.

El genoma del DENV está constituido por una cadena de RNA de sentido positivo con una longitud aproximada de 11 kb el cual codifica para 3 proteínas estructurales (C, M y E) localizadas en el extremo amino terminal y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) que se encuentran hacia el extremo carboxilo de la poliproteína.

La respuesta inmune innata desempeña un papel fundamental ya que activa las células inmunes innatas que pueden eliminar el virus en las primeras etapas de la enfermedad. Las células NK son las primeras células que se enfrentan al DENV por lo tanto pueden jugar un papel primordial durante la infección, ya sea en protección y/o en la patogénesis, sin embargo existen pocos estudios de la interacción de éste tipo celular con proteínas específicas del DENV.

En el presente trabajo se determinó la producción de citocinas y quimiocinas en células NK de cultivo primario y de la línea NK-92 de humano estimuladas con las diferentes proteínas recombinantes derivadas del DENV con la finalidad de estudiar el efecto de la proteína NS3 sobre estas células y conocer el papel de las células NK durante la infección.

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

### 1.1 Enfermedad del dengue

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por el DENV transmitida por mosquitos, consta de cuatro serotipos (DENV 1-4) que son miembros de la familia Flaviviridae, género Flavivirus (Soroy *et al*, 2014), los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV1-4) causan la enfermedad viral transmitida por artrópodos más común de los seres humanos (Schmid and Harris., 2014). El dengue se ha convertido gradualmente en una de las principales causas de morbilidad en las regiones tropicales y subtropicales (Alm *et al.*, 2014). La falta de vacunas altamente eficaces, terapias antivirales, intervenciones terapéuticas y estrategias eficientes de reducción del vector eficientes obstaculizan los esfuerzos de control del virus (Semenza *et al.*, 2014). Aunque el dengue normalmente no es mortal, sus complicaciones pueden ser letales. Además, el dengue inflige enormes cargas económicas y sociales. El dengue es transmitido principalmente por el mosquito *Aedes aegypti* que está muy adaptado a los hábitats humanos. Actualmente y debido a una combinación de condiciones ecológicas y antropológicas, tanto la prevalencia, la distribución y los impactos de dengue están aumentando (Segoli *et al.*, 2014).

La forma clásica de la fiebre por dengue (FD) se caracteriza por fiebre alta, dolor de cabeza, dolor de estómago, erupción, mialgia y artralgia, las formas graves del dengue, fiebre hemorrágica por dengue (FHD), y el síndrome de choque por dengue (SCD) se acompañan de la trombocitopenia, la permeabilidad vascular e hipotensión (Soroy *et al.*, 2014).

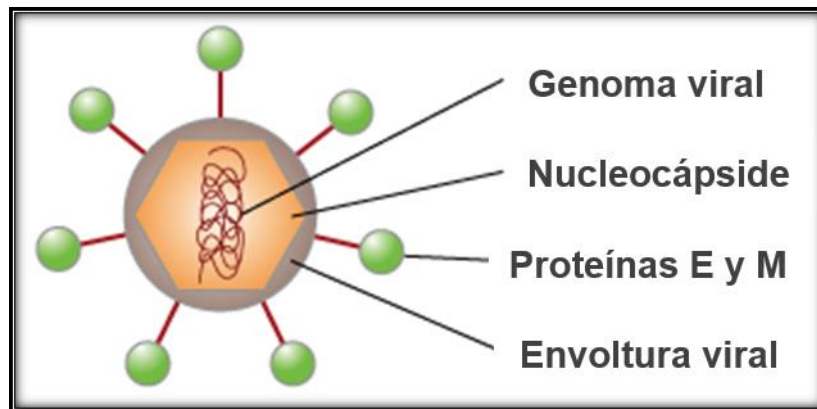
### 1.2 Agente etiológico

El DENV es un virus envuelto con genoma de RNA de sentido positivo con un máximo de 11 kb que codifica para una lipoproteína, tiene un coeficiente de sedimentación de 42S y un peso molecular de 4.2 kDa. El RNA funciona como RNA mensajero al traducirse directamente en los ribosomas durante el proceso de replicación. Presenta un “capping” tipo I, con una estructura Gppp Amp cubriendo



el extremo 5' terminal, seguido por una secuencia dinucleotídica conservada AG. El extremo 3' terminal carece de cola poliadenilada y termina con una secuencia dinucleotídica conservada CU (Junjhon *et al.*, 2014).

El virión maduro tiene tres proteínas estructurales: la proteína C de la nucleocápside, la proteína M asociada a la membrana y la proteína E de la envoltura y otras proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (**Figura 1**). Todas estas proteínas se forman a partir de una gran poliproteína (5' C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 3'), para la cual codifica el genoma del virus (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).



**Figura 1. Estructura del DENV.** El DENV tiene una cubierta esférica, dentro se encuentra la nucleocápside que contiene el genoma viral y la proteína C, la nucleocápside está rodeada por una membrana llamada envoltura viral que contiene las proteínas E y M, estas proteínas forman una capa externa que controla la entrada de los virus en las células humanas (Tomado de: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>).

### 1.3 Proteínas virales

#### 1.3.1 Proteínas estructurales

##### 1.3.1.1 Proteína de cápside (C)

La proteína de la cápside, también conocida como proteína “core” o de cubierta, pesa 11 kDa, aproximadamente. Su estructura secundaria consiste en cuatro

hélices alfa que cumplen diferentes funciones: las hélices 3 y 4 son hidrofóbicas y anclan la proteína a la membrana del retículo endoplásmico (RE).

La hélice 1, ubicada en el extremo N-terminal de la proteína y orientada hacia el citoplasma, posee aminoácidos de carácter básico que se asocian y unen fuertemente al RNA genómico recién sintetizado; de esta manera, se forma el complejo riboproteico o nucleocápside que protege al RNA viral de la degradación y promueve la organización del RNA en el interior de la partícula viral en formación. La hélice 2 posee una naturaleza muy hidrofóbica que interviene durante el ensamblaje de la ribonucleoproteína y de la partícula viral. En el primer caso, actúa como una bisagra que favorece el acercamiento del ARN viral al resto de la proteína C anclada en la membrana del retículo endoplásmico.

#### **1.3.1.2 Proteína precursora de membrana (prM) y proteína de membrana (M)**

La proteína precursora de membrana (prM) tiene un peso molecular de 26 kDa y está presente en los viriones inmaduros y, junto con la proteína M participa fundamentalmente en el proceso de maduración de la partícula viral. La proteína precursora de membrana es procesada después de la transducción por la proteasa celular furina, que la divide en dos y genera, por un lado, el péptido pr, y por otro, la proteína M, que queda con un peso molecular de 8 kDa. La proteína tiene dos dominios transmembrana y un ectodominio de 40 aminoácidos, aproximadamente.

#### **1.3.1.3 Proteína de envoltura (E)**

La proteína de envoltura tiene un peso molecular de 50 kDa, posee tres dominios denominados I, II y III, y se distribuye sobre la superficie del virus, formando complejos homodiméricos de tipo cabeza-cola. Los dominios II y III de cada uno de las proteínas del homodímero son determinantes para las interacciones entre el virus y los receptores de las células vulnerables. Por otra parte, la glucoproteína E es el principal inmunógeno del virus, por lo tanto estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos neutralizadores.

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

### **1.3.2 Proteínas no estructurales**

#### **1.3.2.1 Proteína NS1**

Es una glicoproteína de 48 kDa; que contiene 2 señales del tipo Asn-X-Ser/Thr, utilizada para la adición de carbohidratos, estos sitios parecen estar conservados en todos los flavivirus. Puede estar en forma secretada y no secretada. Es sintetizada en el RE rugoso como una proteína monomérica y en un período corto se une formando un homodímero. Esta forma es más hidrofóbica y se desconoce si el incremento de la hidrofobicidad es un resultado de la dimerización o alguna modificación postraduccional. Una vez formado este dímero, la glicoproteína es transportada al aparato de Golgi donde sufre modificaciones y de aquí pasa a la superficie celular, liberándose al medio extracelular.

La función de la NS1 en la replicación viral no ha sido bien dilucidada. Se ha planteado que posee un papel en la replicación temprana. Basada en un análisis mutacional se ha relacionado con la morfogénesis viral. A su vez, mutaciones de esta proteína afectan la virulencia de la partícula viral. También se relaciona con la respuesta inmune específica de serotipo (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).

#### **1.3.2.2 Proteína NS2**

La proteína NS2 se divide en dos: NS2a y NS2b, la proteína NS2a es hidrofóbica con un peso molecular de 20 kDa, NS2b es una proteína hidrofóbica con un peso molecular de 14.5 kDa; hasta el momento no se le conoce ninguna función en la

replicación viral. Sin embargo, se conoce que la NS2b junto con la NS3 forman un complejo esencial para el procesamiento de todos los sitios de corte de las proteínas no estructurales y las estructurales (Modis *et al.*, 2004).

### **1.3.2.3 Proteína NS3**

La proteína NS3 es la segunda proteína en tamaño, con un peso molecular entre 68 y 70 kDa, asociada a la membrana. Es altamente conservada en los flavivirus y se piensa que es un componente de la maquinaria enzimática de la replicación del RNA viral (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).

NS3 es una proteína bipartita que posee en el extremo N-terminal un dominio proteasa similar a la tripsina (NS3pro) y en el extremo C-terminal posee un dominio con diferentes actividades enzimáticas que actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por RNA (NTPasa) y como helicasa del RNA (NS3Hel); ambas funciones son indispensables en la replicación viral. El dominio NS3Pro actúa hidrolizando los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 del polipéptido. Como se comentó anteriormente, la función del dominio NS3Pro depende de su asociación con la proteína NS2B, que le confiere estabilidad durante su actividad proteolítica, mientras que la función helicasa permanece inhibida.

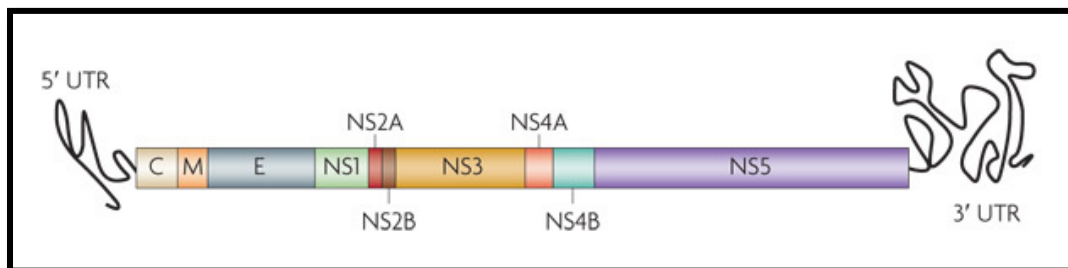
Más recientemente, se encontró que la proteína NS3 es la encargada de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del RE, al reclutar enzimas celulares de la vía de síntesis de lípidos, lo cual garantiza el inicio del ensamblaje. Por otra parte, se ha sugerido que la proteína NS3 puede participar durante los procesos de ensamblaje y de transporte intracelular de los flavivirus (Velandia and Castellanos, 2011).

### **1.3.2.4 Proteína NS4**

La NS4 da lugar a dos proteínas, la NS4a y la NS4b, ambas son hidrofóbicas y tienen un peso molecular de 16 kDa respectivamente. Su papel en el DENV se desconoce (Clyde *et al.*, 2006).

### 1.3.2.5 Proteína NS5

La última proteína codificada es la NS5, que es la más grande de 103 a 104 kDa, bifuncional y una de las más conservadas en los flavivirus. Es una proteína básica y se cree que funciona como una RNA polimerasa dependiente del RNA. Esto se basa en la presencia de una región altamente conservada (YF NS5 666- 668) característica de este tipo de enzima presente en los virus de RNA con polaridad positiva. Se ha sugerido que puede estar involucrada en la metilación de la estructura del “capping” 5´ terminal (**Figura 2**) (Acosta-Bas y Gómez-Cordero, 2005).

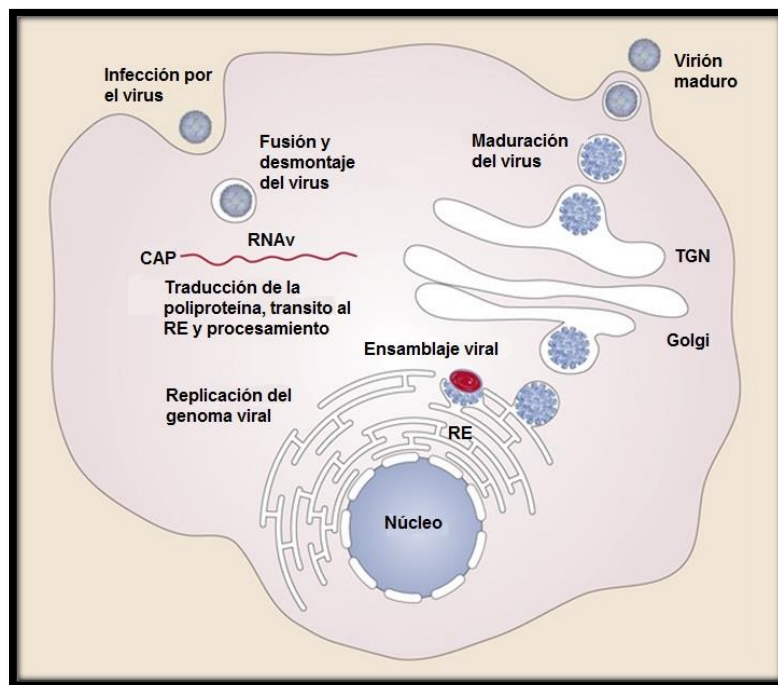


**Figura 2. Genoma del DENV.** El genoma viral codifica para tres proteínas estructurales: Proteína de la cápside (C), proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Tomado de: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>)

### 1.4 Replicación del DENV

La adsorción del virus a la célula comienza con la unión de la glicoproteína E de la envoltura viral con un receptor de la membrana plasmática celular, seguida de la entrada de la partícula viral que conduce al desnudamiento y liberación del genoma viral en el citoplasma. Allí, el genoma es inmediatamente traducido a la poliproteína, que es procesada por proteasas virales y celulares para producir simultáneamente todas las proteínas virales que cumplen diversas funciones en el ciclo. La RNA polimerasa dependiente del RNA viral (NS5), asociada a otras proteínas NS, replica el RNA genómico produciendo una molécula complementaria de RNA de polaridad negativa, la que a su vez actúa como templado para la síntesis de nuevas cadenas

de RNA de polaridad positiva. Las réplicas de genoma viral son encapsidadas por la proteína C y luego, las nucleocápsides adquieren su envoltura por brotación a partir de la membrana del RE hacia el espacio luminal. A partir de allí, las partículas virales son transportadas por el sistema exocítico secretorio hacia la superficie en tanto que las glicoproteínas virales adquieren su forma madura por procesamiento de los residuos hidrocarbonados en el sistema de Golgi y, finalmente, los viriones son liberadas al medio extracelular por fusión de la vesícula de transporte con la membrana plasmática (**Figura 3**) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).



**Figura 3. Replicación del DENV.** El virus dengue entra a la célula por un proceso de endocitosis. Una vez adentro los virus que se encuentran envueltos por la membrana endosomal son liberados en el citoplasma, la partícula viral libera el genoma (vRNA) el cual es traducido en una sola poliproteína que es cortada en 10 proteínas y el genoma viral es replicado. Los virus se ensamblan en la superficie del retículo endoplásmico (RE). Las partículas virales inmaduras son transportadas a través de la red trans-Golgi (TGN) donde maduran y se vuelven infecciosos. Los virus maduros son liberados de las células y pueden ir a infectar otras células (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Los blancos celulares del DENV incluyen a los monocitos/macrófagos, células dendríticas, células B, células T, basófilos/mastocitos, células endoteliales, células epiteliales y hepatocitos. El DENV infecta y/o interacciona con las células a través de una variedad de moléculas de la superficie celular, incluyendo el sulfato de heparán, integrinas y las proteínas de choque térmico (Tsai *et al.*, 2014).

## **1.5 Manifestaciones clínicas del DENV**

Recientemente la enfermedad fue reclasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en dengue con y sin signos de alarma y dengue severo (Green *et al.*, 2014).

### **1.5.1 Dengue sin signos de alarma (Grupo A)**

Se considera dengue probable cuando el paciente vive o viaja a áreas endémicas del dengue, puede presentar fiebre y dos o más de los siguientes criterios:

- Cefalea
- Dolor retro-ocular
- Mialgias, artralgias
- Náuseas, vómito
- Erupción cutánea
- Molestias y dolores
- Prueba de torniquete positiva
- Leucopenia
- Cualquier signo de alarma.

### **1.5.2 Dengue con signos de alarma (Grupo B)**

- Dolor abdominal intenso o abdomen doloroso a la palpación
- Vómito persistente o incoercible (mayor de 5)
- Acumulación clínica de líquidos
- Sangrado de mucosas
- Alteraciones neurológicas o de alerta (letargia, inquietud)
- Letargia, agitación

- Hepatomegalia >2 cm (insuficiencia hepática)
- Laboratoriales: aumento del hematocrito concurrente con rápida disminución del número de plaquetas.

### **1.5.3 Dengue severo (Grupo C)**

En este nivel existe extravasación grave de plasma que conduce a:

- Síndrome de choque por dengue (SCD)
- Acumulación de líquidos con insuficiencia respiratoria
- Sangrado intenso: según la evaluación del médico tratante
- Compromiso orgánico grave
- Hígado: AST o ALT 1000
- Sistema Nervioso Central: Alteración de la conciencia (OMS, 2009).

## **1.6 Diagnóstico del DENV**

### **1.6.1 Diagnóstico serológico**

El diagnóstico de la infección por dengue se puede realizar utilizando cinco pruebas básicas serológicas:

- Inhibición indirecta de la hemaglutinación
- Fijación del complemento
- Prueba de neutralización
- MAC-ELISA para detección de IgM
- ELISA indirecto para IgG.

El diagnóstico serológico depende del aumento en el título de anticuerpos específicos en muestras de suero en la fase aguda y de convalecencia (Roopashri *et al.*, 2015).

Reacciones inespecíficas son también un tema importante a considerar en el diagnóstico serológico del dengue. Comercialmente se ha demostrado que las pruebas disponibles para la detección rápida de anticuerpos IgM pueden producir



resultados falsos positivos en sueros positivos para anti-IgG DENV, malaria y el factor reumatoide (Hunsperger *et al.*, 2009).

#### **1.6.1.1 Inhibición indirecta de la hemaglutinación**

La prueba de inhibición de la hemaglutinación se basa en la capacidad de los antígenos del dengue de aglutinar eritrocitos de gansos o eritrocitos humanos tipo O con tripsina. Los anticuerpos anti-dengue en suero pueden inhibir esta aglutinación y la prueba de inhibición de la hemaglutinación mide la potencia de esta inhibición (WHO, 2015).

#### **1.6.1.2 Fijación del complemento**

La fijación de complemento permite la detección de anticuerpos específicos contra el virus. Esta técnica se realiza en dos etapas; en la primera se mezcla el suero del paciente sospechoso de tener anticuerpos contra el virus, lo que generará un inmunocomplejo, y en la segunda se adiciona el complemento, una hemolisina dependiente de complemento y glóbulos rojos. Si en la primera etapa se forman inmunocomplejos, en la segunda el complemento se fijará a éstos y no se producirá la lisis de los glóbulos rojos. Por el contrario, si no hubo formación de complejos antígeno-anticuerpo, no se fijará el complemento y la hemolisina inducirá la lisis de los glóbulos rojos.

#### **1.6.1.3 Prueba de neutralización**

La técnica de neutralización por reducción del número de placas (NRNP) se considera la técnica de referencia para la detección de anticuerpos neutralizantes en pacientes que han sufrido infección por el virus dengue. Además, es la prueba más específica para detectar anticuerpos contra cada serotipo viral y su principal utilidad es la evaluación de la protección ofrecida por los candidatos vacunales disponibles. Sin embargo, su aplicación en el diagnóstico temprano es poca, pues los anticuerpos de tipo neutralizante empiezan a aparecer a partir del día 10 después del inicio de los síntomas (Gutiérrez *et al.*, 2012).

#### **1.6.1.4 MAC-ELISA para detección de IgM**

Este ensayo utiliza antígenos específicos de dengue de los cuatro serotipos (DEN 1-4) para la captura de anticuerpos específicos IgM anti-dengue en muestras de suero. La mayoría de los antígenos utilizados para este ensayo se derivan de la proteína de la envoltura del virus del dengue. Las limitaciones de esta prueba incluyen la especificidad de estos antígenos y la reactividad cruzada con otros flavivirus circulantes. Estas limitaciones tienen que ser tomadas en cuenta cuando se trabaja en las regiones donde co-circulan múltiples flavivirus.

#### **1.6.1.5 ELISA indirecto para IgG**

Se utiliza para la detección de una infección previa por dengue, utiliza los mismos antígenos como el MAC-ELISA. El ensayo se realiza generalmente con múltiples diluciones de los sueros probados para determinar una dilución de punto final. Este ensayo se correlaciona con el ensayo de hemaglutinación utilizado en el pasado. Cuanto mayor es la dilución de punto final, más robusta es la respuesta obtenida después de la infección. En general, el ELISA para IgG carece de especificidad dentro de los grupos sero-complejos de flavivirus. Aunque la detección de IgG específica ha sido reemplazada en el diagnóstico de infección aguda, estudios seroepidemiológicos se llevan mejor a cabo usando el ELISA para detectar IgG específica. Se puede usar para determinar si una infección es primaria o secundaria, y puede ser más útil que la prueba de inhibición de la hemaglutinación para este propósito (Buchy *et al.*, 2006).

#### **1.6.2 Diagnóstico molecular**

Debido a las limitaciones de los ensayos convencionales, el uso de métodos moleculares para la detección de genomas virales para el diagnóstico temprano del dengue ha aumentado (Alm *et al.*, 2014), la transcripción inversa seguida de PCR (RT-PCR) y la PCR en tiempo real (qRT-PCR) son los dos métodos más comúnmente utilizados (Teoh *et al.*, 2015).

### **1.6.2.1 Transcriptasa inversa seguida de PCR (RT-PCR)**

Muchos ensayos de RT-PCR de dengue se han descrito en los últimos 10 años. Estos ensayos “*in-house*” dirigen a diferentes genes y utilizan diferentes procedimientos de amplificación. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos más comúnmente utilizadas se basan en un único ensayo RT-PCR, RT-PCR anidada o RT-PCR multiplex. La reacción de PCR anidada implica oligonucleótidos de transcripción inversa y para la amplificación utiliza oligonucleótidos que se dirigen a una región conservada del genoma del virus seguido por una segunda etapa de amplificación que es específica de cada serotipo. Los productos de esta reacción se separan por electroforesis en gel de agarosa, que permite a los serotipos del dengue ser diferenciados sobre la base de su tamaño. La sensibilidad de los ensayos de RT-PCR en comparación con el aislamiento del virus en cultivo celular varía entre 25 y 79% (Teoh *et al.*, 2015).

### **1.6.2.2 PCR en tiempo real (qRT-PCR)**

La qRT-PCR es un ensayo de una etapa que cuantifica el título del virus en aproximadamente 1.5 horas. Una vez extraído el genoma viral, la detección del blanco amplificado por sondas fluorescentes reemplaza la necesidad de la electroforesis post-amplificación. Muchos ensayos de qRT-PCR han sido desarrollados 'singleplex', detectando un solo serotipo por reacción, o 'multiplex', la identificación de los cuatro serotipos en una sola muestra. Una ventaja de este ensayo es la capacidad de determinar el título vírico temprano en la enfermedad del dengue, que se cree que es un importante predictor de gravedad de la enfermedad (Guzman *et al.*, 2010).

## **1.7 Tratamiento**

Actualmente no hay medicamentos disponibles o vacunas anti-DENV específicos. El tratamiento actual para los pacientes infectados con DENV consiste solamente en la atención médica de apoyo dirigida a reducir los síntomas y mejorar la supervivencia en las formas graves de la enfermedad (Mazzucco *et al.*, 2015). No existe ninguna vacuna para el DENV disponible comercialmente, la formulación más

adecuada debe ser una vacuna tetravalente para los cuatro serotipos del virus y así no se favorezca el fenómeno ADA, la cual a su vez debe ser de bajo costo y dar una protección inmune por un tiempo prolongado. El control del vector es en estos momentos representa la única alternativa para detener la propagación de la enfermedad (Seijo, 2001).

## 1.8 Epidemiología

Las áreas geográficas en las que circula el DENV se han expandido en los últimos años, y los cuatro serotipos se encuentran en Asia, África y las Américas (Alm *et al.*, 2014). El dengue se ha convertido en un importante problema de salud internacional. En los últimos 3 años, la incidencia de FD, FHD y SCD se ha incrementado dramáticamente. El promedio anual de casos de dengue/dengue hemorrágico reportados a la OMS ha crecido cada 10 años. De 1990 a 1999, hubo 479 848 casos notificados, y de 2000 a 2008, creció a 1,656,870 casos, un aumento de 3.5 veces. Actualmente se estima que cerca de 50-100 millones de casos son reportados anualmente de una población total de 2.5 mil millones (Soroy *et al.*, 2014).

El año 2016 se caracterizó por grandes brotes de dengue en todo el mundo. La región de las Américas notificó más de 2 380 000 casos ese año, y solo en Brasil hubo poco menos de 1 500 000 casos, es decir, cerca de tres veces más que en 2014. En la región se notificaron asimismo 1032 muertes por dengue.

De acuerdo con la información publicada por el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) de la Secretaría de Salud el año 2016 cerró con 53% de casos confirmados, los cuales corresponden a los estados de Guerrero, Veracruz, Jalisco, Nuevo León y Michoacán (**Figura 4**) (CENAPRECE, 2017).

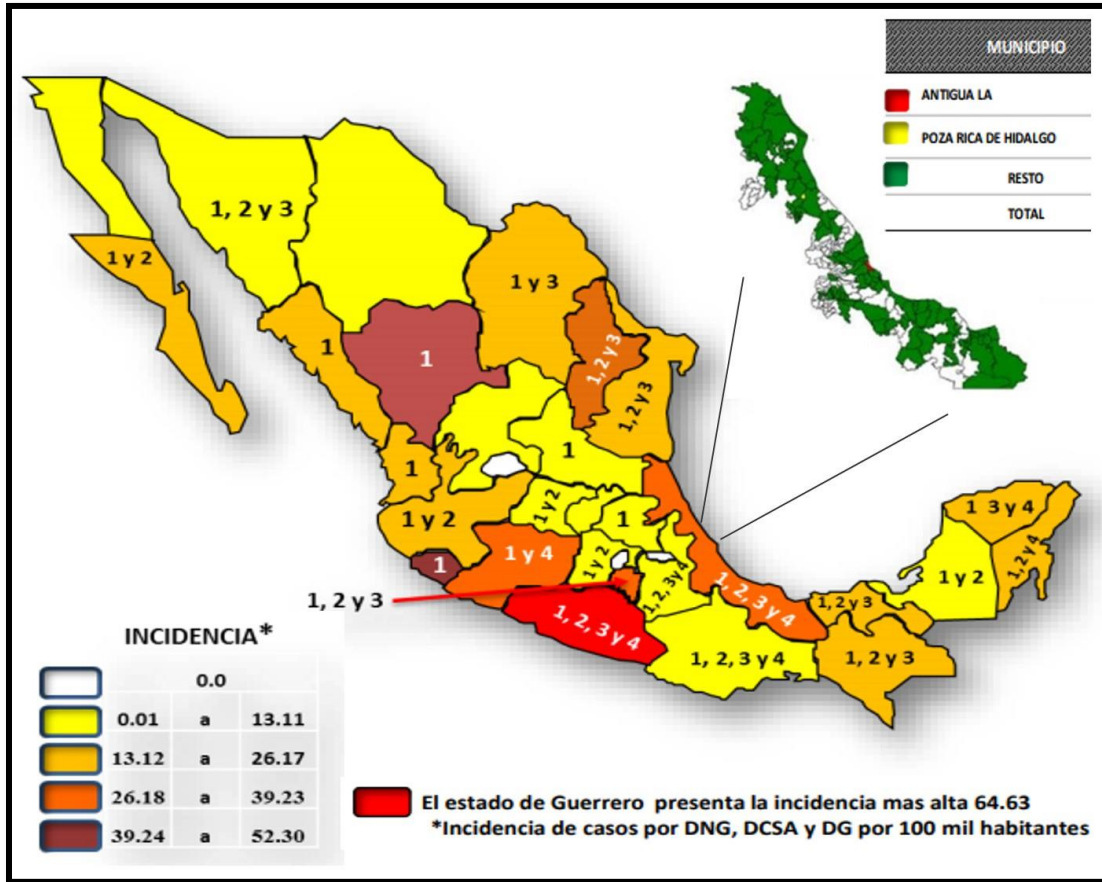


Figura 4. Incidencia y serotipos aislados de dengue, por entidad federativa. México, 2016.

Tomado de: [http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/178952/Pano\\_dengue\\_sem\\_52\\_2016.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/178952/Pano_dengue_sem_52_2016.pdf)

## **2. ANTECEDENTES DIRECTOS**

### **2.1 Respuesta inmune innata contra el DENV**

La respuesta inmune innata desempeña un papel intrínseco a nivel de la célula infectada, pero también recluta y activa las células inmunes innatas que pueden eliminar el virus en las primeras etapas e inducir el desarrollo de la respuesta adaptativa (Beltrán and López-Vergés, 2014).

Una rápida iniciación de la defensa innata del huésped puede ser el paso limitante fundamental en la infección debido a que el virus del dengue debe superar todas las barreras mediadas por la inmunidad innata antes de llegar a los tejidos linfoides regionales.

Una de las preguntas más intrigantes sobre el dengue es la identidad de las células no hematopoyéticas que pueden desempeñar un papel crucial en la respuesta inmune antiviral innata para el DENV en las primeras etapas de la infección. Dado el hecho de que los mosquitos inoculan el DENV en la piel humana, mientras se están alimentando, las células blanco potenciales para la infección del dengue deben ser localizadas en la dermis y la epidermis, que constituyen el primer nivel de defensa.

La piel no es sólo una barrera de protección física; también participa en el rápido inicio de las defensas innatas del huésped que podrían representar un paso limitante a la infección por el DENV. En la piel, tanto las células infiltrantes (tales como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos) y las células residentes, tales como los queratinocitos y fibroblastos que están abundantemente localizados en los epitelios, participan en la producción de diversos tipos de citocinas, el establecimiento de un microambiente proinflamatorio con actividad antimicrobiana frente a patógenos transmitidos por artrópodos, como los virus con envoltura.

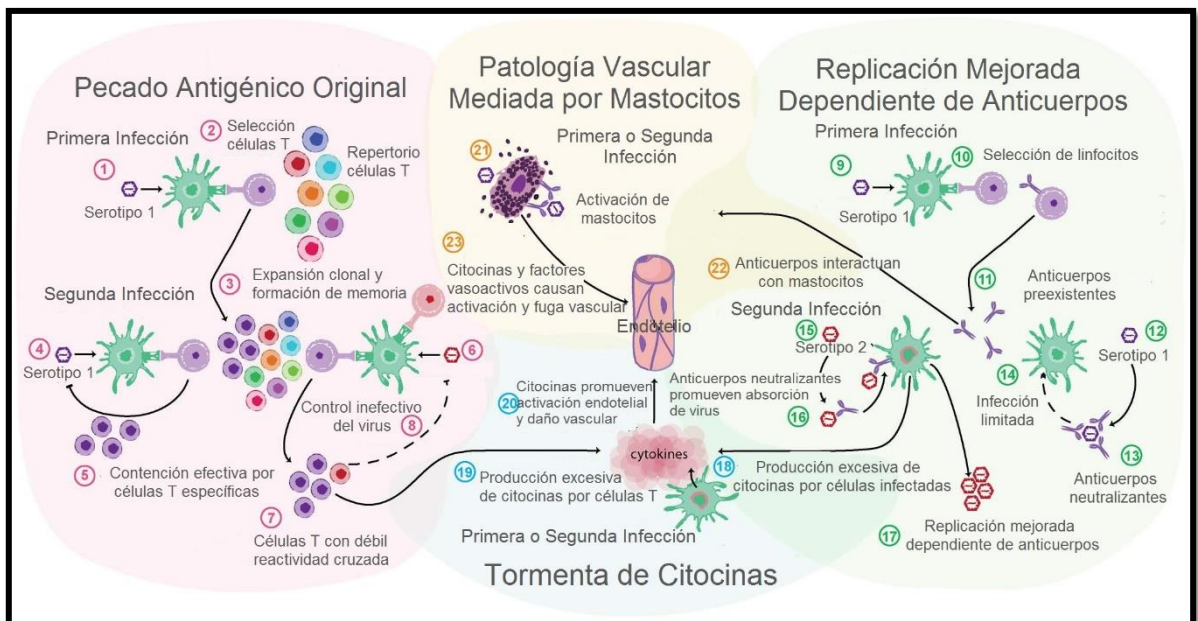
Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRS), como los receptores tipo toll (TLR), en particular sensores intracelulares TLR-3, TLR-7, y TLR-8, (por ejemplo,

las helicasas Dexe/HRNA) son algunas de las primeras líneas de defensa en el reconocimiento inmune innato de RNA de doble cadena (dsRNA), RNA de cadena simple o RNA modificado. El TLR primario involucrado en el reconocimiento del DENV es el TLR-3, reconoce RNA del DENV después de la acidificación endosomal y se ha demostrado "*in vitro*" que induce la producción de IL-8 e interferón IFN- $\alpha/\beta$  (Green *et al.*, 2014). La respuesta de IFN es uno de los primeros mecanismos de defensa del huésped que contribuyen significativamente a la inmunidad innata. El sistema de IFN incluye células que sintetizan IFN en respuesta a la infección viral. La inducción de IFN- $\beta$  es uno de los primeros eventos que sigue a la infección viral, y es ampliamente aceptado como la respuesta del huésped antiviral más inmediata e importante para muchas infecciones virales (Bustos-Arriaga *et al.*, 2011).

La inmunopatogénesis de la infección por el DENV es producida por las respuestas inmunes específicas del huésped, incluyendo la activación de células inmunes (células T CD4 positivas), citocinas (interleucina (IL) -1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18, factor inhibidor de la migración de macrófagos, factor de crecimiento tumoral- $\beta$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$  y el interferón [IFN]), quimiocinas (IL-8, proteína quimiotáctica de monocitos-1), activación del complemento (C5a y C5b-C9), los mediadores inflamatorios y la autoinmunidad, todos los cuales han sido identificados en el FHD y SCD (Tsai *et al.*, 2014).

Particularmente en lugares donde el DENV es endémico, el riesgo de la adquisición de una infección secundaria con otro serotipo de virus es alto. Tres principales teorías sobre la patogénesis del dengue que han encontrado apoyo experimental son relevantes en el contexto de la infección secundaria: el pecado antigénico original (Original Antigenic Sin) producido por una baja especificidad de las células T a un desafío heterólogo secundario, la replicación aumentada dependiente de anticuerpos ó fenómeno ADA (Antibody-Dependent Enhanced Replication-ADA-), donde la unión de complejos DENV/anticuerpos no neutralizantes por las células promueven la captación por las células existiendo una entrada masiva de virus y por ende una replicación del DENV y finalmente la patología vascular mediada por

mastocitos que se encuentra ligada al proceso conocido como tormenta de citocinas (Cytokine Storm), la cual puede ocurrir tanto en una respuesta primaria como secundaria por una producción exacerbada de citocinas. Estas citocinas actúan directamente sobre la vasculatura y promueven la extravasación del plasma, en este contexto los mastocitos pueden liberar citocinas y factores vasoactivos en respuesta al DENV (**Figura 5**). Sin embargo, durante una infección primaria por el DENV las moléculas producidas por los mastocitos promueven el ingreso de leucocitos al endotelio activado, una de éstas células son los linfocitos NK, lo cual dará lugar al aclaramiento viral (St. John, 2013).



**Figura 5. Teorías sobre la patogénesis inmune del DENV.** Actualmente existen tres teorías sobre la patogénesis observada durante la infección por el DENV, asociadas en su mayoría a infecciones secundarias: Teoría del pecado antigénico original, teoría de la patología vascular mediada por mastocitos asociada a la tormenta de citocinas (Cytokine storm) y la teoría del aumento de la replicación mediada por anticuerpos o fenómeno ADA (St. John, 2013).

## 2.2 Natural Killer

Los linfocitos citolíticos naturales (NK, del inglés "*natural killer*") son linfocitos distintos de los linfocitos T y B que desempeñan funciones importantes en las



respuestas inmunes innatas, sobre todo contra virus y bacterias intracelulares (Abbas *et al.*, 2012), desempeñan un papel activo en el rechazo de trasplantes y en diversas condiciones patológicas. Los mecanismos efectores principales de las células NK son la linfocitotoxicidad y producción de citocinas proinflamatorias (Tallerico *et al.*, 2016). El término citolítico natural deriva del hecho de que éstas células son capaces de realizar su función citolítica sin necesidad de diferenciación y expansión clonal, lo que es necesario en las respuestas efectoras de las otras células citolíticas del sistema inmune, los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Sharma *et al.*, 2017). Los linfocitos NK constituyen del 5 al 15% de las células mononucleares de la sangre y el bazo. Son raros en otros órganos linfáticos, pero se concentran en ciertos órganos como el hígado y el útero grávido (Paul & Lal, 2017).

Los linfocitos NK surgen de precursores de la médula ósea y aparecen como linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplásmicos. Los linfocitos NK no expresan los receptores para antígenos diversos y distribuidos de forma clonal típicos de los linfocitos B y T. En cambio, usan receptores codificados por DNA en línea germinal, para distinguir las células infectadas por microorganismos patógenos de las células sanas. Pueden identificarse en la sangre por la expresión de CD56 y la falta de CD3, dos proteínas de membrana que, a menudo, se encuentran juntas en el CTL activado (Abbas *et al.*, 2012).

Las células asesinas naturales tienen varios mecanismos directos de citotoxicidad, incluyendo gránulos citoplásmicos que contienen perforina, granulisina y granzimas, así como varios receptores de muerte que pueden iniciar la apoptosis (Allen *et al.*, 2015).

La perforina pertenece a la familia de proteínas de complejo de ataque a la membrana y se inserta en las membranas celulares con el objetivo de funcionar como un poro similar al del complejo de ataque de membrana C5-C9 del sistema del complemento. Los poros de perforina se utilizan para facilitar el transporte de granulisina y granzima en el citoplasma de la célula diana. Además, la perforina

puede servir para otras funciones citolíticas en la célula diana después del transporte de moléculas citolíticas (Duggal *et al*, 2015).

Las granzimas son una familia de serina proteasas con muchos miembros, el componente principal en las células NK es la granzima B. Esta enzima puede iniciar la apoptosis de la célula diana a través de la activación directa de las caspasas 3 y 7 o por medio de la proteólisis de la proteína Bid, también puede mediar la destrucción nuclear en presencia de perforina, granzimas y otros puede ser capaz de mediar en vías de muerte celular independiente de caspasas. La producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por las células NK aumenta la capacidad citolítica de las mismas por medio de la regulación de moléculas de adhesión como ICAM-1 en las células diana a través de la activación de la vía NF- $\kappa$  B. La expresión de ICAM-1 permite una mayor adhesión de las células blanco a las células NK (Allen *et al.*, 2015).

Otra función importante de las células NK es la producción de citocinas, tales como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ; estas citocinas también actúan como agentes promotores de la apoptosis en las células tumorales, o reclutar y activar otras células de la respuesta inmune, como monocitos/macrófagos, células dendríticas, células T y células B. La producción de estas citocinas por las células NK promueve la inmunidad innata y adaptativa (Gómez-Lomelí *et al.*, 2014).

### **2.2.1 Moléculas de diferenciación**

Las células NK son definidas como linfocitos CD3<sup>-</sup> que expresan CD56 o CD16 o ambas moléculas. Las células NK son células citotóxicas capaces de eliminar células blanco sin sensibilización previa o de restricción de MHC. Cuando se estimulan también producen citocinas que juegan un papel central no sólo en la respuesta inmune innata contra los patógenos, sino también en la iniciación de respuestas inmune Th1 adaptativas. Fenotípica y funcionalmente se pueden distinguir diferentes subconjuntos de células NK sobre la base de la densidad de expresión y de la superficie celular de los receptores NK (Tarazona *et al.*, 2002). En los seres humanos, CD56<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD94<sup>+</sup> y CD57<sup>+</sup> representan

marcadores de células NK prototípicos, a pesar de que también se encuentran en un subconjunto de células T CD8+ que se denominan células NKT (Pita-Lopez *et al.*, 2014).

### 2.2.1.1 CD56

CD56 es una molécula estrechamente relacionada con la adhesión celular, es un marcador inmunofenotípico para varias poblaciones únicas de linfocitos de sangre periférica (PBLs). Aunque las células CD56+ derivan de múltiples linajes de linfocitos comparten un papel en la vigilancia inmunológica y las respuestas antitumorales. Hay 2 subconjuntos distintos de células NK humanas identificadas por la densidad de la superficie celular de CD56 (CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>) (Campbell *et al.*, 2001).

Las células NK CD56<sup>bright</sup> expresan constitutivamente los receptores de afinidad alta e intermedia de IL-2 y son capaces de proliferar *in vitro* e *in vivo* en respuesta a dosis bajas (picomolar) de IL-2, estas células también expresan la molécula c-kit el receptor para tirosina quinasa cuyo ligando mejora la proliferación inducida por IL-2. Por el contrario, las células NK CD56<sup>dim</sup> expresan sólo el receptor de afinidad intermedia de IL-2, son c-kit<sup>neg</sup> y proliferan *in vitro* débilmente en respuesta a altas dosis de IL-2 (1 a 10 nM), incluso después de la inducción del receptor de alta afinidad de IL-2. Las células NK CD56<sup>dim</sup> son más citotóxicas contra objetivos NK-sensibles que las células NK CD56<sup>bright</sup>. Sin embargo, después de la activación con IL-2 o IL-12, las células CD56<sup>bright</sup> exhiben similar o aumentada citotoxicidad contra objetivos NK en comparación con las células CD56<sup>dim</sup> (Cooper *et al.*, 2001).

Las células NK CD56<sup>bright</sup> predominan en los ganglios linfáticos y los sitios de inflamación y producen abundantes citocinas (por ejemplo, IFN- $\gamma$ ) y tienen función inmunorreguladora, mientras que las células NK CD56<sup>dim</sup> juegan un papel clave en la citotoxicidad celular natural y mediada por anticuerpos (Chan *et al.*, 2007).

En cuanto a las moléculas de adhesión, las células NK CD56<sup>bright</sup> muestran una expresión más fuerte de CD2, CD11c, CD44, CD49e, CD54 y CD62L, mientras que las células NK CD56<sup>dim</sup> expresan más CD11a. La consecuencia de estos diferentes repertorios de receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión son sus propiedades migratorias divergentes: el subconjunto CD56<sup>bright</sup> migra preferentemente a los órganos linfoides secundarios, mientras que las células CD56<sup>dim</sup> migran a los sitios inflamatorios agudos. La actividad citotóxica de las células NK CD56<sup>dim</sup> es significativamente mayor que la de las células CD56<sup>bright</sup> y contienen mucha más perforina, granzimas y gránulos citolíticos.

En cuanto a la producción de citocinas, la situación se invierte. De hecho, las células NK CD56<sup>bright</sup> son las productoras más eficientes de citocinas. Las principales citocinas liberadas son IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , factor estimulante de colonia del macrófago y granulocito, IL-10 e IL-13, dependiendo de las condiciones precisas de la estimulación (por ejemplo, la combinación de IL-12 e IL-18 es la mejor para inducir una fuerte producción de IFN- $\gamma$ , que es 20-30 veces mayor en las células CD56<sup>bright</sup> que en las células CD56<sup>dim</sup> (Poli *et al.*, 2009).

#### **2.2.1.2 CD16**

El receptor de Fc de IgG humana III (Fc $\gamma$ RIII, FCGR3, o CD16) se compone de dos isoformas (CD16a y CD16b) que están codificadas por dos genes altamente homólogos. CD16b está anclada a la membrana celular por glicosilfosfatidilinositol (GPI) y se expresa principalmente en neutrófilos, es un receptor de baja afinidad que se une a la IgG agregada y es importante para la eliminación de complejo inmune e inmovilizar la unión de los neutrófilos a los complejos inmunes en las superficies endoteliales. Por el contrario, CD16a es una proteína transmembranal y únicamente es expresada por las células NK. Este receptor se une a la IgG monomérica unida a las células blanco para facilitar la citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos (ADCC), un mecanismo efector clave de las células NK (Jing *et al.*, 2015).

CD16 es probablemente el mejor ejemplo de un receptor de células NK que une la respuesta inmune innata y adaptativa. De hecho, es la existencia de este receptor en las células NK lo que sugiere que las funciones de dichas células no se limitan a atacar a las células inmediatamente peligrosas (Tsukerman *et al.*, 2014). Las consecuencias funcionales de la estimulación de CD16 mediada por las células NK incluyen la activación de la ADCC, la activación y expresión de antígenos y la secreción de varias citocinas y quimiocinas (Srivastava *et al.*, 2013).

Las moléculas CD56 y CD16 han sido utilizadas más ampliamente como marcadores de células NK. Con referencia a la intensidad de las señales obtenidas por el análisis de citometría de flujo, se han definido una serie de subtipos de células NK (Øren *et al.*, 2005). En la sangre periférica humana, se han identificado cinco subpoblaciones de células NK las cuales pueden ser definidas sobre la base de la expresión relativa de los marcadores CD16 y CD56:

1. CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> (50-70% de CD56<sup>bright</sup>)
2. CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> (30-50% de CD56<sup>bright</sup>)
3. CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-</sup>
4. CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup>
5. CD56<sup>-</sup> CD16<sup>bright</sup>

En individuos sanos, las poblaciones 3 y 5 son numéricamente una minoría, mientras que el papel de las células CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-</sup> es en gran parte desconocida las células CD56<sup>-</sup> CD16<sup>bright</sup> son células NK funcionales las cuales a menudo se expanden de manera espectacular en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Las células NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> representan al menos el 90% de todas las células NK de sangre periférica y por lo tanto son el principal subconjunto en la circulación, un máximo del 10% de células NK son CD56<sup>bright</sup>. (Poli *et al.*, 2009). Además, el análisis combinado de la expresión de CD56 y CD16 durante el desarrollo de las células NK indica que sus perfiles cambian de la siguiente manera: CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> → CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> → CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>dim</sup> → CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (Krzywinska *et al.*, 2016).

En los procedimientos de clasificación positiva, las células blanco se seleccionan mediante la expresión del marcador CD56, mientras que las células NK obtenidas por selección negativa son los que permanecen después de las etapas para eliminar todas las poblaciones de leucocitos que no sean células NK (Øren *et al.*, 2005)

## **2.2.2 Otras moléculas de diferenciación**

### **2.2.2.1 CD25**

La molécula CD25 es un componente clave necesario para formar el heterotrímero IL-2R $\alpha\beta\gamma$  de alta afinidad en las células NK humanas activadas brevemente con combinaciones de IL-12, IL-15 e IL-18. Las células NK expresan constitutivamente dos componentes de alta afinidad de IL-2R: la IL-2/15R $\beta$  y  $\gamma_c$ , que forman un heterodímero de afinidad intermedia que transduce señales en presencia de concentraciones nanomolares de IL-2 o IL-15. En contraste, el heterotrímero IL-2R $\alpha\beta\gamma$  de alta afinidad (incluyendo IL-2R $\alpha$ , CD25) se liga por concentraciones picomolares de IL-2, y por lo tanto la expresión de CD25 dicta alta afinidad de unión a IL-2 en las células NK. Además, diversos estudios han demostrado que el resultado de la expresión de CD25 con la estimulación de IL-2 o IL-15 por sí solo es transitorio (horas o días) en la mayoría de las células NK. A corto plazo (16 h) la activación de citocinas por parte de las células NK de humano combinadas con IL-12, IL-15 e IL-18 inducen amplia y prolongada expresión de CD25 que persiste durante al menos 7 días (Leong *et al.*, 2014).

### **2.2.2.2 CD28**

CD28 es un importante receptor de co-estimulación, es responsable de la óptima activación, proliferación y supervivencia de las células T mediada por antígeno (Pita-López *et al.*, 2014). Sus funciones son activación de linfocitos T vírgenes, promueve la producción de IL-2, supervivencia de las células T y favorece la entrada en el ciclo celular, incrementado así la proliferación de las células T (Saavedra-Hernández, 2013). Se ha demostrado que CD28, está presente en la superficie de las células NK humanas usando un único anticuerpo monoclonal (Goodier and Londei, 2004)

### **2.2.2.3 CD57**

CD57 es un epítipo sulfatado terminal de hidratos de carbono (ácido 3-sulfato glucurónico), el cual puede ser un marcador de las células NK con escasa capacidad proliferativa y, tal vez, un grado de inmunosenescencia. De hecho, la adquisición de CD57 en las células NK (después de la estimulación con IL-2 o el cocultivo con las células diana) se correlaciona con la maduración del subconjunto de células NK CD56<sup>dim</sup>, con menor expresión de NKp46, NKp30, NKG2D, y NKG2A, y una mayor expresión de CD16, LIR-1, y receptores de las células asesinas similares a las inmunoglobulinas (KIR)

En comparación con células NK CD57-, las células NK CD57+ proliferan menos en respuesta a IL-2 e IL-15 y producen menos IFN- $\gamma$  en respuesta a IL-12 e IL-18, de acuerdo con sus niveles más bajos de RNAm de IL-12R $\beta$  y la expresión de superficie reducida de IL-2R $\beta$  e IL-18R $\alpha$ . Por otra parte, las células NK CD57+ conservan su potencial citolítico y una proporción de células NK CD57+ son capaces de producir IFN- $\gamma$  después de la reticulación de CD16 que indica que las células NK CD57+ son intrínsecamente capaces de producir IFN- $\gamma$ , pero que pueden tener diferentes requisitos de activación.

La adquisición de CD57 representa un cambio hacia una mayor capacidad citotóxica, una mayor capacidad de respuesta a la señalización a través de CD16 y receptores de citotoxicidad naturales (NCR) y la disminución de la capacidad de respuesta a las citocinas (Nielsen *et al.*, 2013).

### **2.2.2.4 CD69**

El gen *CD69* se encuentra dentro del complejo de genes NK. CD69 se expresa después de la activación en todas las células derivadas de la médula ósea, excepto en los eritrocitos (Sancho *et al.*, 2005). El CD69 actúa como una molécula coestimuladora para las células T y las células NK (Mihaylova *et al.*, 2007).

La ausencia de CD69 conduce a una respuesta inmune mejorada en dos modelos experimentales independientes: aumento de la gravedad en un modelo de artritis impulsado por células T y en el aumento al rechazo a tumores sensibles a NK, en donde CD69 podría afectar en diferentes pasos de los distintos mecanismos responsables de la limitación de la respuesta inmune. En primer lugar, CD69 podría tener un papel en la supresión de los linfocitos por apoptosis después de la activación. En segundo lugar, durante la presentación de antígenos, las señales de activación parcial podrían ser capaces de inducir simultáneamente la expresión de CD69 (Sancho *et al.*, 2005).

Uno de los mecanismos implicados en la residencia de las células NK en los tejidos se atribuye al marcador CD69, que está ausente en las células NK derivadas de sangre periférica. Originalmente, CD69 fue identificado como un marcador de activación temprana, pero hoy en día CD69 se sabe que está asociado con la residencia en el tejido mediante la supresión de la expresión del receptor de superficie de esfingosina-1-fosfato 1 (S1PR1) (Melsen *et al.*, 2016).

#### **2.2.2.5 CD95/CD95L**

CD95 (Fas / APO-1) y su ligando, CD95L, han sido considerados como un receptor de muerte que median la inducción de apoptosis para mantener la homeostasis inmune. Además, estas moléculas son importantes en la eliminación inmune de las células infectadas por virus y células cancerosas. CD95L fue, por lo tanto, considerada como útil para la terapia del cáncer. Sin embargo, los principales efectos secundarios han impedido su uso sistémico. Durante los últimos 10 años, se ha reconocido que CD95 y CD95L tienen múltiples actividades no apoptóticas y promotores de tumores de cáncer relevante. CD95 y CD95L se descubrió que son factores de supervivencia críticos para las células cancerosas, y se encontró que protegen y promueven las células madre cancerosas (Peter *et al.*, 2015).

CD95 inducido por la apoptosis está involucrado en la actividad citotóxica de las células T y las células NK y desempeña un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia inmune (Bieñ *et al.*, 2015)



### **2.3 Línea celular NK-92**

La inmunofenotipificación de blastos de médula ósea y linfocitos periféricos fue positiva para CD56, CD2 y CD7 y negativa para CD3. Para establecer la línea, las células de la sangre periférica se colocaron en medio alfa enriquecido que contenía 12.5% de suero fetal de ternera, 12.5% de suero de caballo,  $10^4$  M de beta-mercaptoetanol y  $10^6$  M hidrocortisona. El crecimiento de la línea (denominada NK-92) depende de la presencia de IL-2 recombinante y una dosis tan baja como 10 U/ml es suficiente para mantener la proliferación. Por el contrario, las células mueren dentro de las 72 h cuando se les priva de IL-2; IL-7 e IL-12 no mantienen el crecimiento a largo plazo, aunque la IL-7 induce proliferación a corto plazo medida por incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina, tiene las siguientes características: marcador de superficie positivo para CD2, CD7, CD11a, CD28, CD45, CD54, CD56<sup>bright</sup>; marcador de superficie negativo para CD1, CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD14, CD16, CD19, CD20, CD23, CD34, HLA-DR. La línea celular descrita aquí muestra características de células NK activadas y podría ser una valiosa herramienta para estudiar su biología (Gong *et al.*, 1994). Las células NK-92 no expresan el receptor de FcR11a (CD16), por lo tanto, no pueden mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Klingemann *et al.*, 2016).

### **2.4 Respuesta de las células NK frente al DENV**

Las células asesinas naturales son linfocitos innatos especializados en la defensa contra infecciones y tumores (bacterianas y virales intracelulares). Las células NK comparten algunas características con el sistema inmune adaptativo y pueden poseer características de memoria específicas contra algunos virus y antígenos. Ellos pueden ser reclutados rápidamente en órganos y tejidos infectados por factores quimioatrayentes producidos por las células infectadas por virus, macrófagos residentes activados y células dendríticas (CD), que son una fuente importante de IFN $\beta$  que induce la activación y la proliferación de las células NK. Recíprocamente, las células NK pueden dar forma a la activación de las CD y, posteriormente a la respuesta adaptativa. Una vez activadas, las células NK combaten las infecciones mediante la producción de quimiocinas y citocinas anti-

virales, principalmente IFN y MIP1- $\beta$ , y reconocen y eliminan células infectadas por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o por reconocimiento directo a través de sus receptores activadores. Las células NK tienen receptores, activadores e inhibidores que les permiten reconocer células estresadas, tumores y células infectadas por patógenos y las diferencian de las células sanas. La mayoría de los receptores inhibitorios reconocen moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clásico y no clásico I (MHC I), y muchos virus disminuyen la expresión de moléculas de MHC I en las células infectadas para escapar de la respuesta de las células T CD8<sup>+</sup>, convirtiéndose así en más vulnerable al reconocimiento de células NK.

Muchos estudios sugieren que las células NK desempeñan un papel en la respuesta contra la infección por el DENV, principalmente en las etapas tempranas de la infección mediante la limitación de la replicación del DENV.

El papel protector de las células NK en la respuesta contra el DENV se apoya en modelos de ratones con la enfermedad. En ratones A/J inmunocompetentes, la activación temprana de las células NK y de las células B se asoció con el control de la carga viral y la prevención de la enfermedad. En ratones C57BL/6, el reclutamiento de células NK y NKT por los mastocitos al sitio de infección también fue crucial para la eliminación del virus, lo que subraya la importancia de estas células durante la respuesta temprana del huésped contra el DENV.

Los virus tratan de escapar de la respuesta inmune del huésped. Como las células NK son actores cruciales en la respuesta antiviral, muchos virus inducen la regulación de MHC I, que sirven como ligandos para receptores inhibitorios de las células NK, con el fin de amortiguar la respuesta de las células NK, el aumento de la expresión del MHC I podría aumentar el reconocimiento por células T CD8<sup>+</sup>.

Curiosamente, las células NK también pueden eliminar las células infectadas con el DENV en ausencia de anticuerpos, lo que implica un reconocimiento directo por

receptores activadores de células NK. Se ha informado que el receptor de activación NKp44 puede interactuar con la proteína de envoltura del DENV (Beltrán and López-Vergés, 2014).

Tras la activación, las células NK pueden producir citocinas que favorecen la eliminación completa de la enfermedad y el agente infeccioso durante la respuesta adaptativa, tales como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , G-CSF y GM-CSF, así como quimiocinas, tales como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , y RANTES. Numerosas investigaciones han demostrado que los pacientes infectados con el DENV presentaron significativamente niveles elevados de IFN- $\gamma$ , G-CSF y GM-CSF, mientras que otros reportes sugieren que el aumento de TNF- $\alpha$  podría estar asociado con la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, los resultados fueron obtenidos mediante la medición de los niveles de citocinas en el suero de pacientes infectados con el DENV, y no revelan que las células específicas se activan e involucran en su producción. Hasta la fecha, el papel de las células NK en la producción de estos factores solubles se desconoce. Por lo que son necesarias investigaciones más profundas para determinar con precisión la implicación de la regulación inmune de las células NK durante la infección aguda por el DENV (Petitdemange *et al.*, 2014).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Durante la infección con el DENV las células NK juegan un papel fundamental, ya sea durante la protección y/o en la patogénesis, estas células son muy importantes en la respuesta inmune innata, sin embargo, existen pocos estudios de la interacción de este tipo celular con el DENV y todos han sido realizados utilizando el virus completo, es decir, se desconoce específicamente las proteínas que interaccionan con las células o pueden traer inconvenientes en el riesgo de infección. La utilización de proteínas recombinantes tiene la ventaja de eliminar los riesgos de infección al evitar trabajar con el virus completo. La proteína NS3 del DENV es una proteína necesaria para la replicación viral y se sabe que puede inducir anticuerpos primarios y secundarios, así como apoptosis en diferentes tipos celulares. El dominio de proteasa de esta proteína ha sido asociado a la inducción de respuestas celulares necesarias para el aclaramiento viral, por lo cual en el presente trabajo se estudiará la respuesta inmune de este tipo celular ante el estímulo “*in vitro*” de la proteína recombinante NS3 del DENV, con la finalidad de estudiar la respuesta generada y comprobar el papel de las células NK durante la infección.

## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 HIPÓTESIS**

La interacción de las proteínas recombinantes GST-NS3 de los 4 serotipos del DENV con las células del cultivo primario de NK y con la línea celular NK-92 es capaz de inducir la producción de citocinas y quimiocinas del mismo perfil inducido (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CCL3, CCL4 y CCL5) por el DENV.

### **4.2 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de las proteínas recombinantes GST-NS3 del DENV sobre la citotoxicidad de las células NK de sangre periférica y de la línea celular NK-92 de humano.

### **4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Expresar y purificar las proteínas recombinantes GST-NS3 de los cuatro serotipos del DENV por cromatografía de afinidad a glutatión
2. Aislar y purificar células NK a partir de monocitos de sangre periférica humana mediante selección negativa.
3. Caracterizar las células NK de humano y de la línea celular NK-92 mediante la expresión de CD16 y CD56 por citometría de flujo.
4. Estimular las células NK-92, así como las células NK de humano con las proteínas recombinantes GST-NS3 de los cuatro serotipos del DENV.
5. Determinar mediante citometría de flujo la expresión de IFN- $\gamma$ , granzima b y perforina en las células estimuladas "*in vitro*" con las proteínas recombinantes GST-NS3 de los cuatro serotipos del DENV.
6. Determinar mediante ELISA la expresión y producción de citocinas y quimiocinas en células NK estimuladas "*in vitro*" con las proteínas recombinantes GST-NS3 de los cuatro serotipos del DENV.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Ensayos de transformación bacteriana

#### 5.1.1 Preparación de células competentes DH5 $\alpha$

Las células DH5 $\alpha$  se crecieron en 5 mL de medio LB (Tryptona 1%, Extracto de Levadura 0.5%, NaCl 0.5% y Glucosa 0.2%) sin ampicilina durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente las células se inocularon en 50 mL de medio LB fresco. Las células se incubaron a 37° C con aireación constante hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.5 (600 nm). El cultivo se enfrió en hielo durante 3 min (0-5° C) y las bacterias se recuperaron por centrifugación a 3046  $\times g$  por 20 min. La pastilla se resuspendió suavemente en 12.5 mL de MgCl<sub>2</sub> 0.1 M en frío por un periodo de 5-10 min. Las células se centrifugaron durante 25 min a 3046  $\times g$  a 4° C. Se retiró el sobrenadante (SN) y la pastilla se resuspendió en 12.5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M en frío y posteriormente se incubaron a 0° C por 20 min. Las células se centrifugaron a 3046  $\times g$  por 40 min y fueron resuspendidas con 4.3 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M mezclado con 700  $\mu$ L de glicerol estéril y se almacenaron a -70° C hasta su uso.

#### 5.1.2 Transformación de células competentes DH5 $\alpha$

Las células competentes DH5 $\alpha$  (GIBCO BRL) se colocaron en un tubo por 10 min sobre hielo hasta descongelar. La reacción de ligación de cada uno de los fragmentos de NS3pro185 de cada serotipo del DENV en pGEX-5X-1 (pGEX-NS3-DEN1, pGEX-NS3-DEN2, pGEX-NS3-DEN3 y pGEX-NS3-DEN4) o el plásmido vacío (pGEX-5X-1) se colocaron en hielo durante 5 min y posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de las células competentes. Se colocó un tubo sin plásmido como control, los tubos se colocaron en hielo durante 20 min y se sometieron a choque térmico por 5 min a 37° C. Los tubos se colocaron nuevamente en hielo durante 2 min y se les agregó 1 mL de medio LB sin antibiótico. Los tubos fueron mezclados por inversión y se incubaron a 37° C durante 35 a 40 min. Finalmente, los tubos se centrifugaron aproximadamente 3 min en la microcentrífuga a 511  $\times g$ . Se descartó el SN por inversión suave y se resuspendió la pastilla en el SN remanente, las células se espatularon en placas de LB-ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37° C toda la noche.

### **5.1.3 Preparación de DNA plasmídico a mediana escala**

Se inocularon 25 mL de medio LB con la concentración deseada de ampicilina (100 µg/mL) y con la clona bacteriana seleccionada por ensayos de restricción. El cultivo se incubó toda la noche a 37° C, y posteriormente se alicuotaron 20 mL en un tubo de centrifuga de 50 mL y se centrifugaron a 3,046 x g por 20 min. La pastilla se resuspendió en 1.5 mL de Sol. I o STE (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM Sacarosa 50 mM) y se adicionó lisozima a una concentración de 100 µg/mL, la mezcla se incubo a TA por 15 min. Los tubos se colocaron en hielo por 15 min y posteriormente se adicionaron 3 mL de la Sol. II (NaOH 0.2 N/SDS 1%) preparada en fresco. Los tubos se mezclaron por inversión, se incubaron en hielo por 15 min y se adicionaron 2.25 mL de acetato de potasio 3 M (pH 4.8) y se mezclaron por inversión nuevamente. Los tubos se incubaron en hielo por 15 min y se centrifugaron por 1 h a 3,046 x g a 4° C. El sobrenadante se transfirió a un tubo COREX de 15 mL y se adicionaron 3 mL de Isopropanol (2-propanol). Los tubos se incubaron durante 15 min o más a TA y se centrifugaron a 3,046 g por 30 min. La pastilla se resuspendió en 270 µL de agua estéril. Se incubaron además con una solución de RNAsa [200 µL de amortiguador de RNAsa 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 15 mM), conteniendo RNAsa A 10 mg /mL (10 µL) y RNAsa T 100 µg/mL (1 µL)]. La muestra se pasó a un tubo eppendorf y se adicionaron 10 µL de la mezcla anterior y se incubaron por 1 h a 37° C. Para extraer el DNA se adicionaron 300 µL de fenol a los tubos con las muestras y se centrifugaron por 1 min a 11,773 x g, este paso se repitió durante dos veces más. La capa acuosa se transfirió a tubos Eppendorf y se adicionaron 300 µL de cloroformo, se centrifugaron a 12,775 x g por 1 min. La capa superior de los tubos se transfirió a tubos Eppendorf y se adicionó un décimo de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y tres volúmenes de etanol absoluto, los tubos se centrifugaron a TA por 1 h. Las pastillas de cada plásmido se lavaron con etanol al 70% y se centrifugaron durante 5 min a 12,775 x g, finalmente, las pastillas se resuspendieron en 80 µL de agua estéril. Los plásmidos purificados se almacenaron a 4 ó a -20 °C hasta su uso.

## **5.2 Expresión y purificación de la proteína recombinante fusionada a GST**

### **5.2.1 Preparación de la resina Glutación**

La resina acoplada a glutación (Sigma) se preparó pesando 0.204 g de sólido (700 mg sólido/10 mL) para una columna de aproximadamente 3 mL. La resina se hidrató con 48 mL de amortiguador de equilibrio PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.3 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM, pH 7.4) ó agua destilada estéril en una proporción de 200 mL de agua por gramo de resina y se mantuvo toda la noche a 4° C o por lo menos 2 h antes de proceder a la purificación de la proteína.

### **5.2.2 Expresión de las proteínas recombinantes GST-NS3-DEN1, GST-NS3-DEN2, GST-NS3-DEN3 y GST-NS3-DEN4**

Las células de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ , transformadas tanto con el vector parental (pGEX.5X-1) como con los vectores recombinantes (pGEX-NS3-DEN1, 2, 3 ó 4) se inocularon en medio LB que contenía 100  $\mu$ g/L de ampicilina (Sigma) y se incubaron a 37° C durante toda la noche. Al día siguiente los cultivos se diluyeron (1:10) con medio fresco y se incubaron a 37° C durante 2 h o hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. La producción de la proteína fue inducida adicionando IPTG (isopropil-tio- $\beta$ -galactósido) a una concentración final de 0.1 mM durante 2 h a 30° C. Después de 2 h de incubación las células se colectaron al centrifugar a 3,046  $\times$  g por 20 min. a 4° C. Brevemente, las células empastilladas fueron resuspendidas en amortiguador de fosfatos (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.3 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM, pH 7.4), se adicionó lisozima a una concentración final de 200  $\mu$ g/mL y se incubó a 37° C durante 15 min, posteriormente la suspensión celular se sometió a varios ciclos de sonicación (aproximadamente a 80% de amplitud) para lisar las células (6 ciclos de 1 min con pausas de 2 min sobre hielo). Se adicionaron inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM y EDTA 5 mM), así como DNAsa 5  $\mu$ g/mL y RNAsa 10  $\mu$ g/mL y se incubaron a 37° C durante 15 min. Posteriormente se adicionó Tritón X-100 a una concentración de 1% con agitación suave sobre hielo durante 15 min. El lisado fue centrifugado a 3,046  $\times$  g por 45 min. Los sobrenadantes y pastillas se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes para analizar la presencia de la proteína recombinante.



### **5.2.3 Solubilización de los cuerpos de inclusión y eliminación de la urea por medio de diálisis**

Las pastillas conteniendo la proteína recombinante en cuerpos de inclusión fueron lavados dos veces con 50 mL de PBS 1X pH 7.4, y luego se resuspendieron aplicando vórtex, posteriormente fueron incubadas a 37° C en agitación constante durante 30 min. La muestra fue centrifugada a  $3,046 \times g$  durante 10 min. Enseguida la pastilla se lavó en tres ocasiones con PBS 1X pH 7.4 conteniendo 2 M de urea, la muestra se agitó vigorosamente por 2 min, en cada ocasión se incubó a 37° C durante 30 min y entre cada lavado las muestras fueron centrifugadas a  $3,046 \times g$  por 10 min. Los sobrenadantes fueron almacenados a -20° C hasta su procesamiento. Una vez solubilizados los cuerpos de inclusión, los sobrenadantes obtenidos se dializaron para eliminar la urea. Para ello, se emplearon membranas de 6000-8000 MWCO (Fisherbrand), las cuales fueron previamente hervidas a 80° en un volumen adecuado de NaHCO<sub>3</sub> 10 mM durante 30 min agitando constantemente, posteriormente se transfirieron a una solución de EDTA 10 mM por 30 min. La membrana fue almacenada en etanol al 50% hasta su uso. Los sobrenadantes obtenidos con los lavados de urea fueron dializados contra PBS 1X pH 7.4 durante toda la noche a 4° C y con agitación constante. El material dializado fue interaccionado con la resina glutatión agarosa para purificar la proteína recombinante.

### **5.2.4 Purificación de las proteínas recombinantes GST-NS3-DEN1, GST-NS3-DEN2, GST-NS3-DEN3 y GST-NS3-DEN4**

La purificación de las proteínas solubles se realizó de acuerdo a lo descrito por Smith y Johnson en 1988. Brevemente, el sobrenadante (dializado) conteniendo las proteínas de fusión solubilizadas se mezcló con la resina glutatión agarosa (Sigma). Después de la absorción por 30 min, la resina se colectó y se lavó por centrifugación a  $1,713 \times g$  durante 3 min con amortiguador de fosfatos. Tanto la GST como las proteínas de fusión fueron eluidas por competencia con 1 mL de una solución de glutatión libre (Sigma) (15 mM de glutatión en 50 mM de Tris-HCl pH 8.0), y luego fueron precipitadas con acetona para eliminar el amortiguador de elución.

### **5.3 Electroforesis en geles de Poliacrilamida-SDS**

Las proteínas recombinantes fueron analizadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% conteniendo SDS al 0.1% en presencia de amortiguador de muestra (Glicerol 2%, SDS 4%, Tris-HCl 50 mM pH 6.8,  $\beta$ -ME 200 mM, Azul de Bromofenol 0.2%) (Laemmli, 1970), a un voltaje de 200 volts en presencia del amortiguador de corrida 1X (Tris 25 mM, Glicina 190 mM y SDS 0.1%), posteriormente fueron visualizadas por tinción con Azul de Coomassie.

### **5.4 Cuantificación de proteínas**

#### **5.4.1 Tinción con negro de amido**

Se realizó una curva con diluciones seriadas (2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.39 y 0.19  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS, a partir de una solución madre de 5 mg/mL. Se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de cada dilución por duplicado en membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD). Posteriormente la membrana se tiñó con negro de amido (Negro de amido 0.25%, MeOH 45%, ácido acético 10% y agua desionizada 45%) durante 10 min. La membrana se aclaró con solución desteñidora (MeOH 45%, ácido acético 10% y agua desionizada 45%), hasta que el fondo se tornó completamente blanco. Una vez teñidas las proteínas se compararon las gotas de la proteína “problema” con cada uno de los estándares de BSA para obtener una estimación de la concentración de la proteína.

#### **5.4.2 Cuantificación de proteína por Micro Bradford**

Se colocó la curva de albúmina sérica bovina (BSA) con una concentración de 1 mg/mL (0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6 y 8  $\mu\text{L}$ ) en una placa colorimétrica por duplicado. Después se agregaron las muestras a cuantificar, también por duplicado (5 y 10  $\mu\text{L}$ ). Las muestras se llevaron a 160  $\mu\text{L}$  con PBS 1X, y finalmente se adicionó el reactivo de Bradford 5X. Adicionalmente se preparó un blanco, adicionando únicamente PBS 1X y reactivo de Bradford. Posteriormente se realizó la lectura de la absorbencia a una densidad óptica de 595 nm en un lector de placas de ELISA (MULTISKAN EX, Thermo Electro Corporation).

## **5.5 Propagación y mantenimiento *in vitro* de cultivos de células NK-92**

La línea celular NK-92 fue propagada en medio alfa-MEM sin ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos (GIBCO), con 2 mM de L-glutamina y 1.5 g/L de bicarbonato de sodio y suplementado con 0.2 mM de inositol (Sigma), 0.1 mM de 2-mercaptoetanol (BIO-RAD), 0.02 mM de ácido fólico (Sigma), 75 U/ml de IL-2 recombinante humana (R&D Systems), 12.5% de suero de caballo y 12.5% de suero fetal bovino. Las células se incubaron a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa, de acuerdo a las condiciones del distribuidor ATCC.

## **5.6 Aislamiento y purificación de células NK mediante selección negativa (DYNABEADS®)**

### **5.6.1 Purificación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante el sistema HISTOPAQUE®**

Las PBMC se purificaron mediante el sistema HISTOPAQUE (Sigma). Brevemente, a un tubo cónico de 15 mL, se añadieron 3 mL de HISTOPAQUE®-1119, cuidadosamente se añadieron otros 3 mL de HISTOPAQUE®-1077 sobre el HISTOPAQUE®-1119 y se adicionaron 6 mL de sangre de humano con anticoagulante (Citrato de sodio) sobre el gradiente. La muestra se centrifugó a 700 × g durante 30 min a temperatura ambiente (18-26 °C) en una centrífuga 5810 R marca eppendorf. Se retiraron los tubos de la centrífuga y se aspiró la capa de células mononucleares, y se transfirieron a un tubo cónico nuevo. Posteriormente las células se lavaron mediante la adición de 10 mL de PBS y se centrifugaron 10 min a 200 × g, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X pH 7.4 estéril o en medio alfa-MEM (GIBCO).

### **5.6.2 Aislamiento de células NK de humano por DYNABEADS®**

#### **5.6.2.1 Lavado de DYNABEADS®**

Las bolitas magnéticas se lavaron previamente. Se tomaron 500 µL de Dynabeads® y se colocaron en un tubo de ensayo (para 5 × 10<sup>7</sup> PBMC, tomar 500 µL de Dynabeads). Posteriormente se adicionaron 500 µL de amortiguador de aislamiento (PBS sin Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>, 0.1% BSA y 2mM EDTA) o al menos 1 mL y resuspender. Los

tubos conteniendo las Dynabeads® se colocaron en el imán (DynaMag™-5, Life technologies) por 1 min y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se removió el tubo del imán y las Dynabeads® lavadas se resuspendieron en 500 µL de amortiguador de aislamiento.

#### **5.6.2.2 Preparación de células**

A partir de la suspensión celular de PBMC se preparó una suspensión celular de  $1 \times 10^8$  células/mL en amortiguador de aislamiento.

#### **5.6.2.3 Aislamiento de células NK**

A partir de la suspensión celular de PBMC en amortiguador de aislamiento ( $1 \times 10^8$  células/mL) se transfirieron 500 µL ( $5 \times 10^7$  células) a un tubo de ensayo, posteriormente se adicionaron 100 µL de SFB/SFC (suero fetal bovino o suero fetal de ternera) inactivado por calor y 100 µL de la mezcla de anticuerpos (anti-CD3<sup>+</sup>, anti-CD14<sup>+</sup>, anti-CD36<sup>+</sup>, anti-HLA Clase II, anti-CD123 y anti-CD235a). El tubo se mezcló y se incubó durante 20 min a 4 °C, al término de la incubación las células se lavaron adicionando 4 mL del amortiguador de aislamiento. Los tubos se mezclaron utilizando el HulaMixer® (HulaMixer® Sample Mixer, Life technologies), los tubos se centrifugaron a  $350 \times g$  por 8 min a 4° C y se desechó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 500 µL de amortiguador de aislamiento y se añadieron 500 µL de Dynabeads® lavadas previamente, el volumen se llevó a 5 mL (se adicionaron 4 mL de amortiguador de aislamiento) resuspendiendo por pipeteo (sin formar espuma), las células con las Dynabeads® se incubaron por 15 min a temperatura ambiente con agitación y rotación empleando el HulaMixer®. Después del tiempo de incubación, los tubos se colocaron en el imán (DynaMag™-5, Life technologies) durante 2 min y se transfirió el sobrenadante con las células NK, a un tubo cónico y estéril de 15 mL. Al tubo que contenía las Dynabeads® se añadieron otros 4 mL de amortiguador de aislamiento, las células se resuspendieron por pipeteo (evitar la formación de espuma) y se colocaron nuevamente en el imán durante 2 min. Los dos sobrenadantes conteniendo las células NK se combinaron y se contaron en la cámara de Neubauer para las interacciones con las proteínas recombinantes.

## 5.7 Ensayo de citometría de flujo para la caracterización de las células NK de humano y de la línea celular NK-92

Para el ensayo de citometría se utilizaron  $1 \times 10^5$  células/mL por cada tinción, para la caracterización se utilizaron los anticuerpos anti-CD16-Alexa Fluor 700, anti-CD56-Alexa Fluor 488 y anti-CD3-FITC (**Tabla I**). Las células de cada pozo se colocaron en tubos de 1.5 mL de manera independientemente y se centrifugaron a  $327 \times g$  durante 5 min. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ L de amortiguador de aislamiento, los receptores Fc fueron bloqueados adicionando 5  $\mu$ L de SFB, posteriormente se incubó durante 30 min a 4° C. Al término de la incubación los tubos se centrifugaron a  $327 \times g$  durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 100  $\mu$ L de amortiguador de aislamiento y se mezcló, los tubos se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones. Al término del lavado se adicionaron 100  $\mu$ L de amortiguador de aislamiento. Los anticuerpos anti-humano anti-CD16-Alexa Fluor 700, anti-CD56-Alexa Fluor 488 y anti-CD3-FITC (Molecular Probes) se adicionaron a una concentración final de 1  $\mu$ g/100  $\mu$ L de amortiguador de tinción y se incubaron durante 40 min a 4° C, al término de la incubación se llevaron a un volumen de 1 mL con amortiguador de aislamiento, las células se resuspendieron y se centrifugaron en las condiciones antes descritas, finalmente se resuspendieron finalmente en 1 mL de amortiguador de aislamiento. Las células se leyeron de acuerdo al espectro del fluorocromo en el citómetro de flujo, modelo Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems).

**Tabla I. Marcaje de células con anticuerpos para ensayos de citometría de flujo.** Se muestran los anticuerpos y su fluoróforo correspondiente

<b>Anticuerpos</b>	<b>Fluoróforo</b>
<b>Control sin teñir</b>	Sin marcaje
<b><math>\alpha</math>-CD16</b>	Alexa Fluor® 700
<b><math>\alpha</math>-CD56</b>	Alexa Fluor® 488
<b><math>\alpha</math>-CD3</b>	FITC

### **5.8 Estimulación “*in vitro*” de las células NK de humano y la línea celular NK-92 con las proteínas recombinantes GST-NS3-DEN1, GST-NS3-DEN2, GST-NS3-DEN3, GST-NS3-DEN4**

Las células NK de la línea celular NK-92 y las células NK de humano ( $1 \times 10^5$  células por pozo) fueron colocadas en una placa de cultivo de 96 pozos en presencia de medio alfa-MEM libre de ribonucleósidos y deoxinucleósidos y suplementado como se mencionó anteriormente y fueron estimuladas con cada una de las proteínas recombinantes (GST-NS3-DEN1, GST-NS3-DEN2, GST-NS3-DEN3, GST-NS3-DEN4) por separado y utilizando un “*pool*” de las cuatro proteínas a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ , como control se añadió LPS a una concentración de 4  $\mu\text{g/mL}$  para los experimentos de citometría y para la ELISA se utilizó LPS 4  $\mu\text{g/mL}$  más IFN $\gamma$  5  $\mu\text{g/mL}$ , como control negativo se utilizaron células no estimuladas. Las células fueron incubadas a 37° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 72 h.

### **5.9 Determinación de la expresión intracelular de IFN- $\gamma$ , granzima b, y perforina**

A partir de las células NK-92 y NK de humano interaccionados con las proteínas recombinantes se determinó la expresión intracelular de IFN- $\gamma$ , granzima b y perforina por citometría de flujo. Las células de cada pozo se colocaron en tubos de 1.5 mL de manera independientemente y se centrifugaron a  $327 \times g$  durante 10 min. Las células se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de PBS-SFB al 10% para lavarlas y se centrifugaron a  $327 \times g$  durante 10 min, posteriormente las células se permeabilizaron con 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador de permeabilización durante 10 min a temperatura ambiente. Al término de la incubación los tubos se centrifugaron a  $327 \times g$  durante 10 min y se lavaron con 500  $\mu\text{L}$  de PBS-SFB al 10% y se centrifugaron en las mismas condiciones. Los anticuerpos anti-humano  $\alpha$ -IFN- $\gamma$ -FITC,  $\alpha$ -Granzima B-PE y  $\alpha$ -Perforina-PE (Molecular Probes) se adicionaron a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  de amortiguador de tinción (**Tabla II**) y se incubaron durante 40 min a 4° C, al término de la incubación se llevó a volumen de 1 mL con PBS 1X, las células se resuspendieron y se centrifugaron en las condiciones antes descritas, finalmente se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X. Las

células se leyeron de acuerdo a su fluorocromo en el citómetro de flujo, modelo Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems).

**Tabla II. Marcaje de células con anticuerpos para ensayos de citometría de flujo.** Se muestran los anticuerpos y su fluoróforo correspondiente

<b>Anticuerpos</b>	<b>Fluoróforo</b>
<b>Control sin teñir</b>	Sin marcaje
<b><math>\alpha</math>-IFN-<math>\gamma</math></b>	FITC
<b><math>\alpha</math>-Granzima B</b>	PE
<b><math>\alpha</math>-Perforina</b>	PE

## 5.10 Determinación de la expresión de citocinas

### 5.10.1 ELISA

A partir de los sobrenadantes de las células NK-92 y NK de humano interaccionados con las proteínas recombinantes se determinaron las citocinas y quimiocinas por el método de ELISA. Los anticuerpos monoclonales de captura anti-citocinas y anti-quimiocinas fueron para TNF $\alpha$ , CCL3, CCL4 y CCL5 (R&D System) se ajustaron a una concentración de trabajo de 4  $\mu$ g/ml para TNF $\alpha$ , CCL3 y CCL4 y de 2.77  $\mu$ g/ml para CCL5 en PBS 1X pH 7.4 según lo especificado por el fabricante, se plaquearon 50  $\mu$ L de estas soluciones en cajas de ELISA y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas se lavaron 3 veces con 300  $\mu$ L/pozo de PBS-Tween 20 al 0.05% (PBS-T) y 1 vez con PBS 1X. Posteriormente, las placas se bloquearon con 200  $\mu$ L de PBS-Albúmina al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y una vez con PBS 1X. Una vez lavadas las placas, se añadieron 50  $\mu$ L de las muestras a determinar (sobrenadante de cultivo). Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS-T y una vez con PBS 1X y se les adicionaron 50  $\mu$ L de los anticuerpos de detección anti-citocina-biotinilado y anti-quimiocina-biotinilado (R&D System) en una dilución de 10-250 ng/mL las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente.

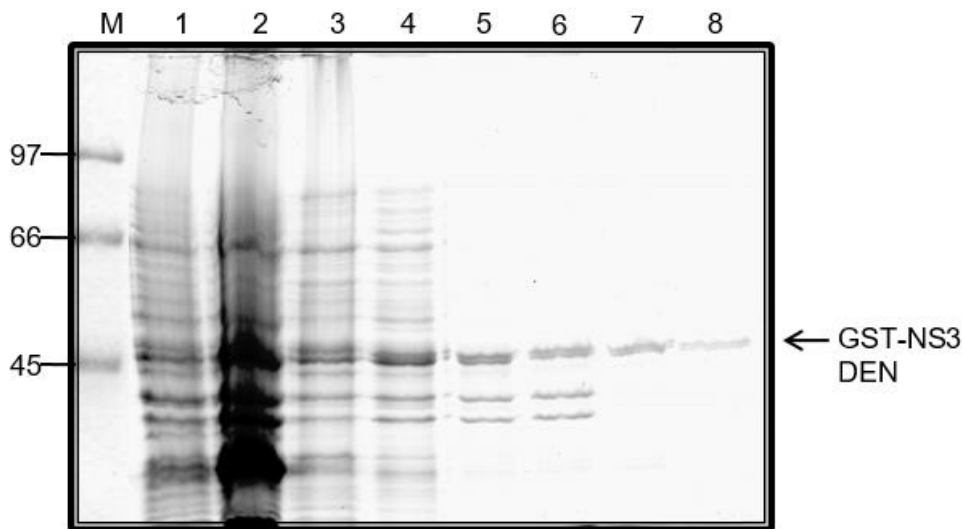
Después de la incubación las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y una vez con PBS 1X, posteriormente se adicionó 50  $\mu$ L de una solución de estreptavidina–HRP (R&D System) a una dilución 1:200 y las placas se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Terminada la incubación, las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y una vez con PBS 1X. Finalmente, a las placas se les añadieron 100  $\mu$ L del reactivo sustrato 2,2'-azino-bis (3-etilbenzoniazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), se incubaron durante 20 min protegidas de la luz y la reacción fue parada por la adición de 50  $\mu$ L de ácido cítrico 1 M. Las placas se leyeron a 415 nm en un lector de ELISA (Multiskan).



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

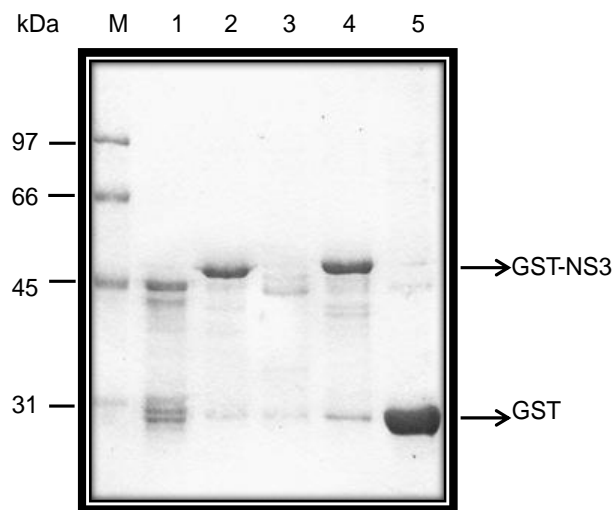
### 6.1 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes GST-NS3-DEN1, GST-NS3-DEN2, GST-NS3-DEN3 y GST-NS3-DEN4

Para cumplir con el primer objetivo, se purificaron las cuatro proteínas de NS3 derivadas de cada uno de los serotipos (DEN1, DEN2, DEN3, DEN4) partiendo de las células de *E.coli* de la cepa DH5 alfa transformadas con el plásmido recombinante pGEX-5x-1. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad a glutatión, sin embargo, las cuatro proteínas formaron cuerpos de inclusión en el sistema procarionte utilizado, por lo que antes de la purificación los cuerpos de inclusión formados se solubilizaron con urea. Una vez solubilizados los cuerpos y eliminada la urea, el extracto se sometió a la columna de glutatión para la purificación de la proteína GST-NS3. Para determinar la homogeneidad de las proteínas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 10% (**Figura 6**).



**Figura 6. Purificación de la proteína recombinante GST-NS3.** La proteína GST-NS3DEN1 fue expresada en bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pGEX-NS3DEN1 y separada en un gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. M) Marcador de peso molecular; carril 1, extracto bacteriano sin inducir; carril 2, extracto bacteriano inducido con IPTG; carril 3, sobrenadante; carril 4, pastilla; carril 5, dializado; carril 6, material no unido y carril 7-9 diferentes eluidos obtenidos de la purificación.

Se observó que las cuatro proteínas recombinantes tienen un peso molecular aproximado de 49 kDa, correspondiente a 27 kDa de la proteína de fusión GST más 22 kDa de la proteína NS3 producto del fragmento con actividad de proteasa que fue clonado en el plásmido pGEX-5X-1. El mismo procedimiento se realizó para la purificación de las cuatro proteínas de NS3 de cada serotipo del DENV. Al término de la purificación cada una de las proteínas recombinantes fueron precipitadas con acetona para eliminar el amortiguador de elución y poder utilizarlas en protocolos posteriores (**Figura 7**).



**Figura 7. Precipitación de la proteína recombinante GST-NS3DEN1-4 y GST.** Las proteínas GST-NS3-DEN1, DEN2, DEN3, DEN4 purificadas fueron precipitadas con acetona y separadas electroforéticamente. Los gels de poliacrilamida-SDS al 10% fueron teñidos con azul de Coomassie. M, marcadores de peso molecular, carril 1; GSTNS3-DEN1, carril 2; GSTNS3-DEN2, carril 3; GSTNS3-DEN3, carril 4; GSTNS3-DEN4 y carril 5; GST.

La *Escherichia coli* es una opción preferida para la producción de proteínas recombinantes y péptidos menores de 30 kDa que no requieran complejas modificaciones post-traduccionales. Esto debido a su rápida tasa de crecimiento, la alta producción de productos y la facilidad de cultivo (Zhao *et al.*,2016). En general, la probabilidad de expresar con éxito una proteína soluble disminuye considerablemente a pesos moleculares por encima de 60 kDa. El alto nivel de

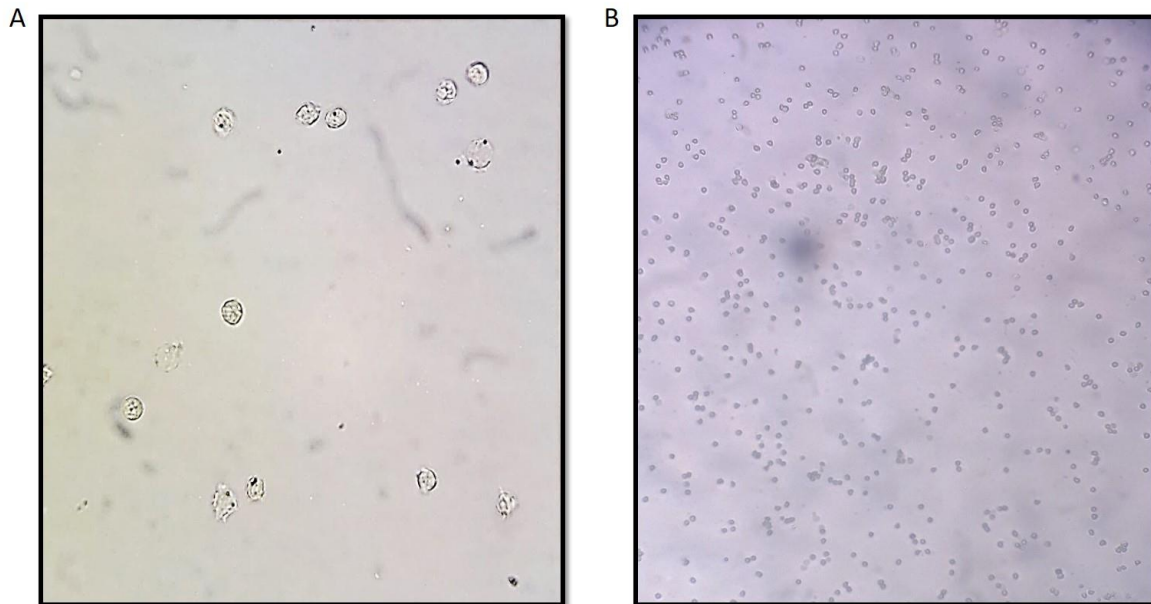
expresión de proteínas de fusión en *E. coli* puede dar lugar a la formación de un producto insoluble, conocido como cuerpo de inclusión (Schein, 1989). Sin embargo, la formación de los cuerpos de inclusión dificulta la purificación de dichas proteínas, ya que las vuelve insolubles. La asociación intermolecular de dominios hidrofóbicos (generalmente con el RNA) se cree que es la razón de la formación de los cuerpos de inclusión (Villaverde y Mar, 2003). Se ha reportado que la formación de cuerpos de inclusión puede ser minimizada si se modifican algunos parámetros del crecimiento bacteriano, tales como bajar la temperatura de crecimiento (20-30° C), inducir por un periodo de tiempo más corto e incrementar la aereación durante el cultivo (Saluta y Bell, 1998). Este mismo efecto se observó con la purificación de otras proteínas recombinantes del DENV, tales como la NS2 (León-Juárez *et al.*, 2016) y NS3 (Álvarez-Rodríguez, *et al.*, 2012).

## **6.2 Aislamiento de células NK a partir de PBMC y purificación por selección negativa y propagación *in vitro* y mantenimiento de cultivo de NK-92**

El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica se realizó mediante el sistema HISTOPAQUE®, para esto se utilizó sangre extraída de una paciente en estado de puerperio quirúrgico inmediato (no mayor a 24 horas), debido a que se sabe que durante el embarazo el número de células NK CD56<sup>dim</sup> periféricas se reducen y muestran disminución de la función citotóxica y la secreción de citocinas (Groer *et al.*, 2014) sin embargo cuando se presenta el puerperio el número de células NK aumenta significativamente esto debido a que durante la placentación, las células NK, constituyen la principal población de células mononucleares de la decidua materna. Debido al contacto directo con el trofoblasto se ha sugerido que desempeñan un papel importante en la gestación (Hayakawa *et al.*, 2006). En estadios tempranos del embarazo las células NK secretan citocinas, factores de crecimiento y angiogénicos, el factor de crecimiento placentario (PIGF), la angiopoyetina 2 y el TGF-β1 que promueven la formación de arterias espirales por el trofoblasto invasor, lo que facilita la placentación e implantación y ejerce un efecto positivo en la circulación de la placenta (Longo *et al.*, 2012), por esto, con este método se obtuvo un mayor rendimiento de células NK después de la selección negativa (**Figura 8**).

La selección negativa consiste en el aislamiento de células NK intactas a partir de PBMC por el agotamiento de las células no NK, esto se logra utilizando un *pool* de anticuerpos con el cual se eliminan de la suspensión celular las células contaminantes, dicho *pool* contiene anti-CD3 que elimina las células T, anti-CD19 que elimina células B, anti-CD14 que elimina monocitos y macrófagos, anti-HLA clase II que elimina células dendríticas, anti-CD123 que elimina plaquetas y granulocitos y anti-CD235a que elimina eritrocitos (Øren *et al*, 2005).

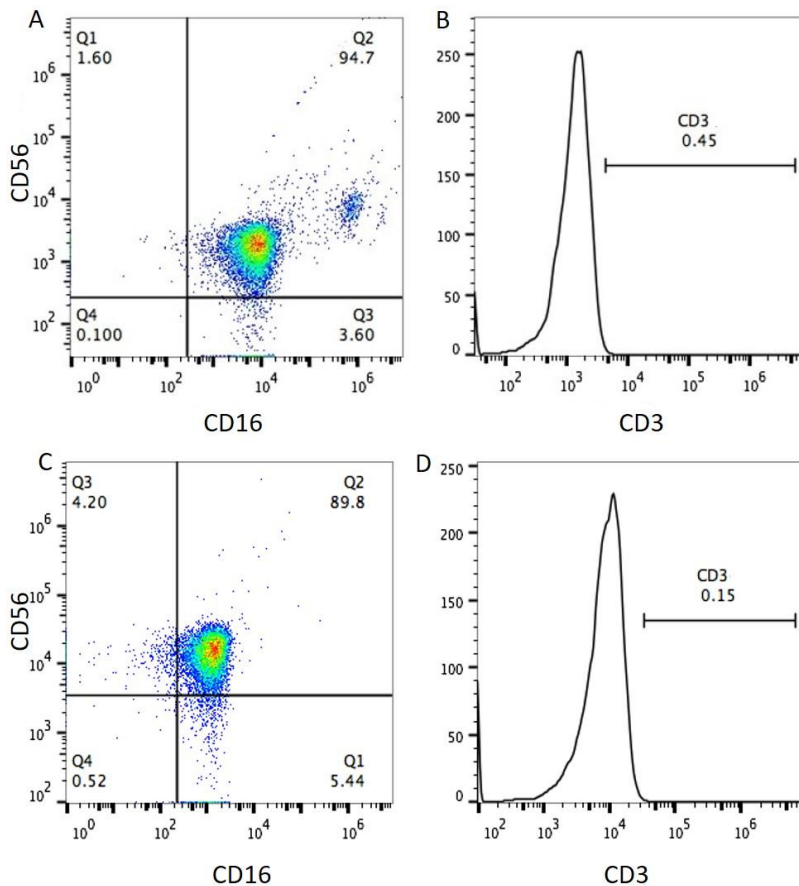
En el caso de la línea celular, las células fueron descongeladas y puestas en cultivo, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (ATCC). Las células de la línea celular NK-92 se monitorearon por microscopia de contraste de fases (**Figura 8**). Estas células fueron utilizadas para los ensayos de interacción con las proteínas recombinantes y así poder determinar las citocinas y quimiocinas expresadas bajo el estímulo específico.



**Figura 8. A. Microscopia de células NK de humano. A.** Las células aisladas y obtenidas después de la selección negativa fueron contadas en la cámara de Neubauer y observadas por microscopía óptica de contraste de fases a un aumento de 40X. **B. Cultivo *in vitro* de células NK-92 en medio alfa-MEM completo.** Las células fueron observadas por microscopía óptica de contraste de fases a un aumento de 25X.

### 6.3 Caracterización de células NK en cultivo primario y NK-92 por citometría de flujo (CD16, CD56 y CD3)

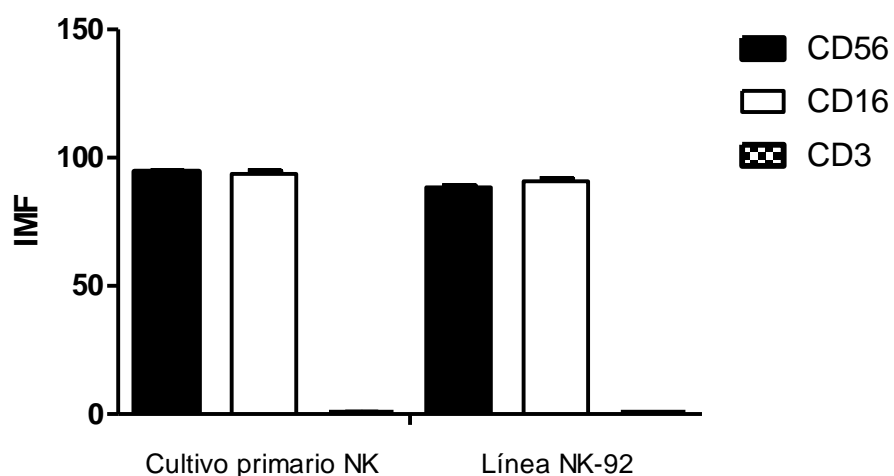
La caracterización de las células NK aisladas de las células mononucleares de sangre periférica se realizó por citometría de flujo. Debido a que existen algunos tipos celulares que pueden confundirse con las células NK, tal es el caso de los linfocitos T y las células NKT ya que comparten algunos marcadores de superficie, para este experimento se utilizaron los marcadores CD16, CD56 y CD3. Se observó que las células fueron capaces de expresar los marcadores de superficie característicos de las células NK, tales como CD56 y CD16 en un 94.7%, el marcaje para CD3 fue bajo, solo de un 0.45%, debido tal vez a una autofluorescencia (**Figura 9**).



**Figura 9. Dot-plots e histogramas correspondientes a la caracterización de las células de cultivo primario y de la línea celular NK-92.** Las células NK de humano (panel A y B) y de la línea celular NK-92 (panel C y D) se analizaron por citometría de flujo para la expresión de CD56, CD16 y CD3.

Así mismo fue necesario realizar una caracterización de la línea celular ya que se sabe que ésta línea se caracteriza por tener el marcador de superficie CD56 y carecer del marcador CD16 y CD3, por lo tanto para este experimento se utilizaron los mismos marcadores que para el cultivo primario. Se observó que las células fueron capaces de expresar los marcadores de superficie CD56 y CD16 en un 89.8% (**Figura 9**).

Con la finalidad de obtener una mejor visualización de los resultados obtenidos mediante la citometría de flujo, los datos se graficaron utilizando la intensidad media de fluorescencia correspondiente a cada histograma. Los resultados mostraron que los marcadores CD56 y CD16 fueron positivos en ambas células y negativas a CD3 (**Figura 10**).



**Figura 10. Caracterización de las células NK.** Se analizaron  $1 \times 10^5$  células por citometría de flujo para la expresión de CD56, CD16 y CD3. Los datos fueron expresados en intensidad media de fluorescencia (IMF).

En cuanto a los marcadores CD56 y CD16 estos resultados permiten sugerir que la población de NK corresponde a la subpoblación  $CD56^{dim}$ , que muestran alta reactividad a CD16 y baja capacidad de producción de citocinas (Coligan *et al.*, 2001) Esta actividad citotóxica, generalmente es dependiente de anticuerpos

(ADCC) debido a la alta expresión del receptor para la porción Fcγ o mejor conocido como CD16, sin embargo se ha reportado que la mayor población de células NK que se encuentran en la periferia son CD56<sup>bright</sup> con baja expresión de CD16 (Poli *et al*, 2009).

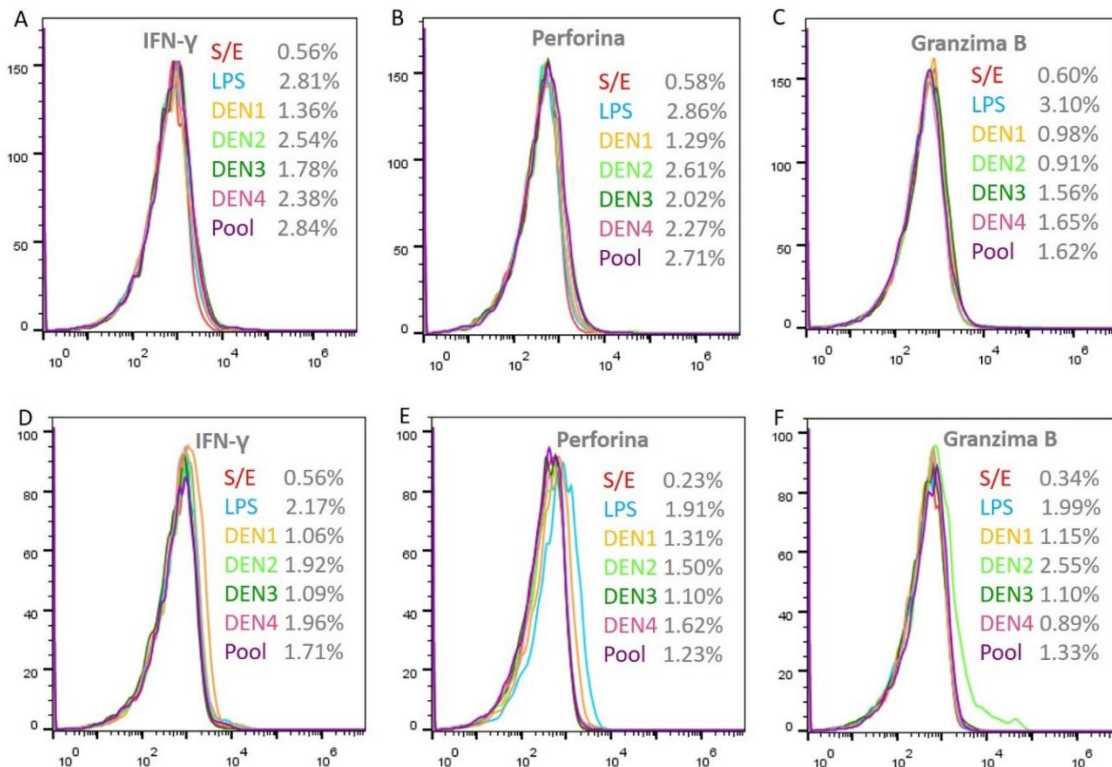
Para el caso de la línea celular, los resultados obtenidos no concuerdan con lo reportado por Klingemann *et al* 2016, ya que las células cultivadas mostraron positividad para el marcador CD16, se sabe que CD16 es un receptor de activación (Sepúlveda & Puente, 2000) y que permite el mecanismo de ADCC mediante el cual destruye a la célula “blanco” cubierta de IgG. Después de ligar a su “blanco”, el CD16 inicia la transducción de señal, ocurriendo un incremento en los niveles de Ca<sup>+2</sup> intracelular y una cascada de eventos similares a la activación de linfocitos T, que resulta en la secreción de TNFα, perforinas, granzimas y granulolisinas, responsables de su capacidad citolítica (Cocom-Góngora *et al.*, 2004). Dicho marcador puede ser activado por la presencia de la IL-2 presente en el medio de cultivo ya que existen reportes que las citocinas proinflamatorias como la IL-2, IL-15 e IL-21 pueden modificar el repertorio periférico de las células NK (De Rham *et al.*, 2007).

#### **6.5 Estimulación *in vitro* de las células NK de humano y de la línea NK-92 con las proteínas recombinantes GST-NS3-DEN1, GST-NS3-DEN2, GST-NS3-DEN3, GST-NS3-DEN4**

Una vez caracterizadas las células NK de humano y de la línea celular NK-92 se interaccionaron con las diferentes proteínas recombinantes, así como con un “pool” de los cuatro serotipos, transcurridas las 72 h las células se recolectaron y fueron utilizadas para los experimentos de citometría de flujo, así como para la detección de citocinas y quimiocinas mediante la técnica de ELISA.

## 6.6 Determinación de la expresión intracelular de IFN- $\gamma$ , granzima b y perforina por citometría de flujo

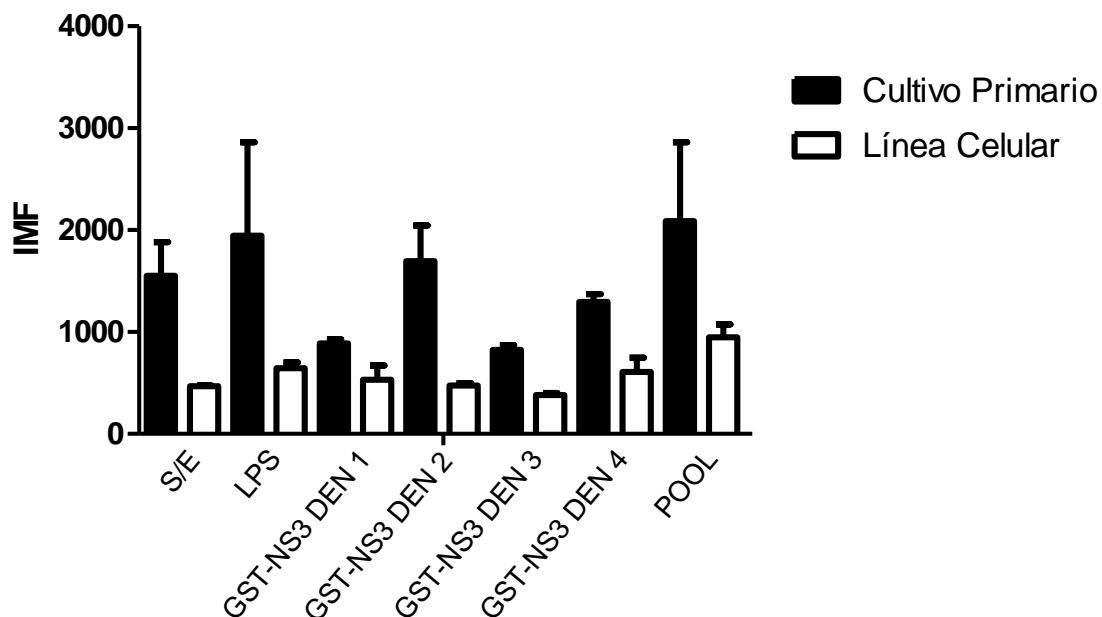
La presencia de IFN- $\gamma$ , granzima b y perforina por citometría de flujo se determinó como una medida de la activación de las células NK del cultivo primario y de la línea celular después de la estimulación con los antígenos. Los resultados mostraron que en el caso del cultivo primario las células fueron capaces de expresar todas las moléculas a determinar, en promedio, se observó una expresión del 1.81% para IFN- $\gamma$ , 1.47% para granzima b y 1.85% para perforina. (**Figura 11, panel A, B y C**), igualmente las células de la línea celular fueron capaces de expresar todas las moléculas a determinar, en promedio, se observó una expresión de 1.49% para IFN- $\gamma$ , 1.33% para granzima b y 1.27% para perforina (**Figura 11, panel D, E y F**).



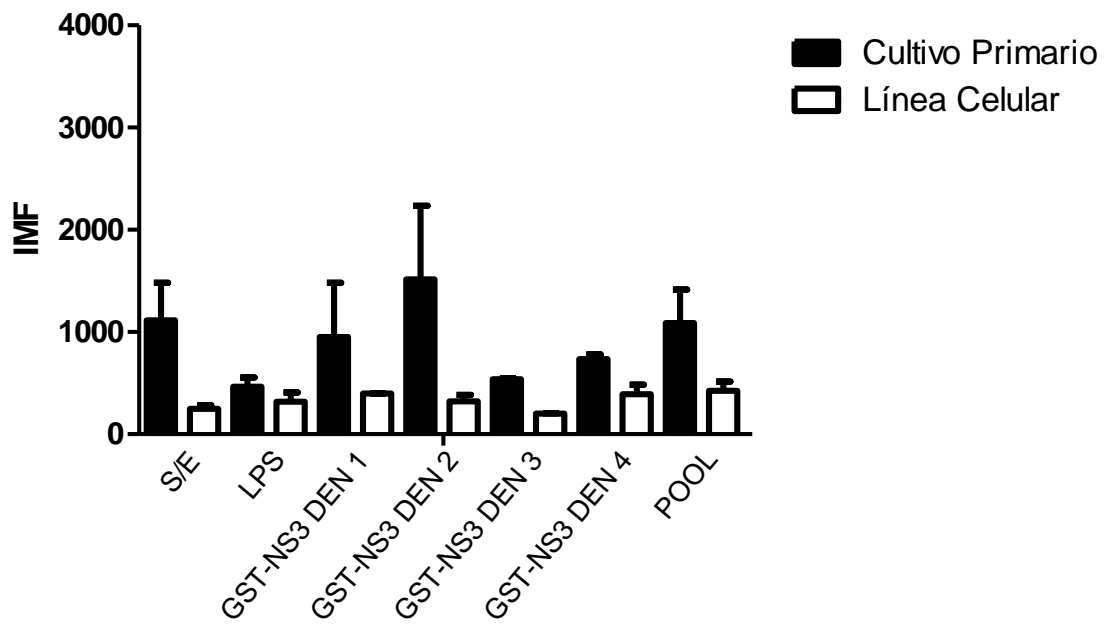
**Figura 11. Histogramas correspondientes a la expresión de IFN- $\gamma$ , perforina y granzima b.** Las células NK de humano  $1 \times 10^5$  células (panel A, B y C) y de la línea celular NK-92  $2 \times 10^5$  células (panel D, E y F) se estimularon con las proteínas recombinantes de los cuatro serotipos del DENV, el pool de las cuatro proteínas, como control positivo LPS  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  y como control negativo células sin estímulo.



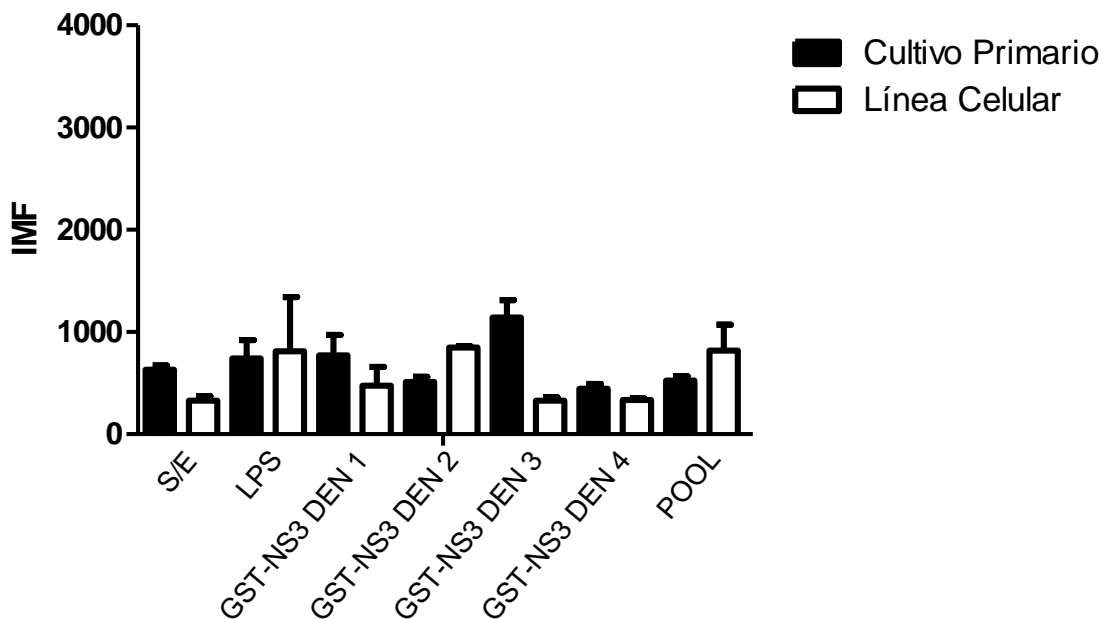
Con la finalidad de aplicar un método estadístico y analizar las diferencias significativas, se graficaron los datos empleando la intensidad media de fluorescencia (IMF). Para el caso de la expresión del IFN- $\gamma$  (**Figura 12**), perforina (**Figura 13**) y granzima b (**Figura 14**) no se observaron diferencias significativas con respecto al control sin estímulo.



**Figura 12. Intensidad Media de Fluorescencia de la expresión de IFN- $\gamma$ .** Las células NK de humano (barra negra) y las células de la línea celular NK-92 (barra blanca) se estimularon con LPS (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y con los diferentes antígenos a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , los resultados se expresaron en intensidad media de fluorescencia. Las diferencias fueron analizadas mediante una ANOVA de una vía comparando las células no estimuladas contra los diferentes estímulos empleando la prueba de Tukey.



**Figura 13. Intensidad Media de Fluorescencia de la expresión de perforina.** Las células NK de humano (barra negra) y las células de la línea celular NK-92 (barra blanca) se estimularon con LPS (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y con los diferentes antígenos a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , los resultados se expresaron en intensidad media de fluorescencia. Las diferencias fueron analizadas mediante una ANOVA de una vía comparando las células no estimuladas contra los diferentes estímulos empleando la prueba de Tukey.



**Figura 14. Intensidad Media de Fluorescencia de la expresión de granzima b.** Las células NK de humano (barra negra) y las células de la línea celular NK-92 (barra blanca) se estimularon con LPS (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y con los diferentes antígenos a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , los resultados se expresaron en intensidad media de fluorescencia. Las diferencias fueron analizadas mediante una ANOVA de una vía comparando las células no estimuladas contra los diferentes estímulos empleando la prueba de Tukey.

Los resultados de la expresión de IFN- $\gamma$ , perforina, granzima b en las células NK indican que hubo una baja expresión de éstas moléculas, aunque se sabe que la infección con el DENV induce la activación de las células NK así como también la producción de grandes cantidades de citocinas proinflamatorias, como el IFN- $\gamma$  y moléculas citotóxicas como son perforina y granzimas (Shuyan *et al.*, 2016), sin embargo estos resultados permiten sugerir que el fenotipo de células aisladas fue CD56<sup>dim</sup>, en donde hay una alta expresión de CD16 y baja producción de citocinas como se demuestra en la baja producción de IFN- $\gamma$  (Tsukerman *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos de la línea celular NK-92 apoyan lo publicado por Allen *et al.*, 2015 y Gómez-Lomelí *et al.*, 2014, ya que se obtuvo una producción de IFN- $\gamma$ ,

perforina y granzima b, aunque en bajas cantidades lo que sugiere una baja citotoxicidad por parte de las células.

Se puede observar que las células no estimuladas mostraron producción de IFN- $\gamma$ , granzima b y perforina de ambos tipos celulares, probablemente debido a la IL-2 utilizada en el medio de cultivo, la célula NK al ser dependiente de IL-2 conduce a la proliferación, liberación de citocinas y a una mayor citotoxicidad (Villasmil *et al.*, 2009).

## **6.7 Determinación de citocinas y quimiocinas mediante ELISA**

La determinación de TNF- $\alpha$ , CCL3, CCL4 y CCL5 se realizó por el método de ELISA después de la interacción con las proteínas recombinantes derivadas del virus.

### **6.7.1 Determinación de TNF- $\alpha$**

Para el caso de la expresión de TNF- $\alpha$ , se observó que los valores obtenidos por la estimulación con las proteínas fue muy similar a los obtenidos por las células sin estímulo tanto para el cultivo primario como para la línea celular, en el caso de las células NK el único estímulo que es estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) es la interacción con la proteína recombinante GST-NS3DEN4 y con el "pool" de proteínas obteniendo una concentración de 7.73  $\mu\text{g/mL}$  y 10.50  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que para la línea celular NK-92 el único estímulo que es estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) es la interacción con la proteína recombinante GST-NS3DEN2 obteniendo un concentración de 7.73  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 15**).



**Figura 15. Determinación de TNF- $\alpha$  en células NK de cultivo primario y en la línea celular NK-92 por ELISA.** Las células NK de cultivo primario (barras negras) y de la línea celular (barras blancas) fueron estimuladas con las proteínas recombinantes y con un *pool* de las mismas a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ , y con LPS + IFN- $\gamma$  (4  $\mu\text{g/mL}$  - 5  $\mu\text{g/mL}$ ) como control positivo, después de 72 h, la citocina se determinó en el sobrenadante de los cultivos por ELISA. Las diferencias fueron analizadas mediante una ANOVA de una vía comparando las células no estimuladas contra los diferentes estímulos empleando la prueba de Tukey. Los \*\*\* muestran la diferencia significativa de  $p < 0.001$ , \*\* muestran diferencia significativa de  $p < 0.01$  y \* muestra diferencia significativa de  $p < 0.05$ .

El TNF- $\alpha$  es un polipéptido de 17 kDa y está involucrada en una variedad de bioactividades, incluyendo la citotoxicidad y la inflamación (Yunga *et al.*, 2016), es una citocina proinflamatoria producida por las células NK, monocitos, macrófagos y trofoblastos (Villasmil *et al.*, 2009). De acuerdo a los resultados se obtuvieron niveles muy bajos de TNF- $\alpha$ , esto podría deberse al hecho de que las células NK podrían estar activadas previamente, ya que se obtuvieron de mujeres que recientemente habían dado a luz, en donde se ha reportado un aumento en la producción de esta citocina (Perdu *et al.*, 2016), aunado a la estimulación *in vitro* con las proteínas y al cultivo en presencia de IL-2 provocó una hiperactivación y por lo tanto una excesiva producción de TNF- $\alpha$  al ocurrir esto, se reinicia la expresión en la traducción del RNAm conduciendo a la célula a un rápido decline en la tasa

de biosíntesis de TNF- $\alpha$ . La regulación post-transcripcional es un sistema de control bastante importante en el sistema inmune y común a muchas citocinas (Wang *et al.*, 2012).

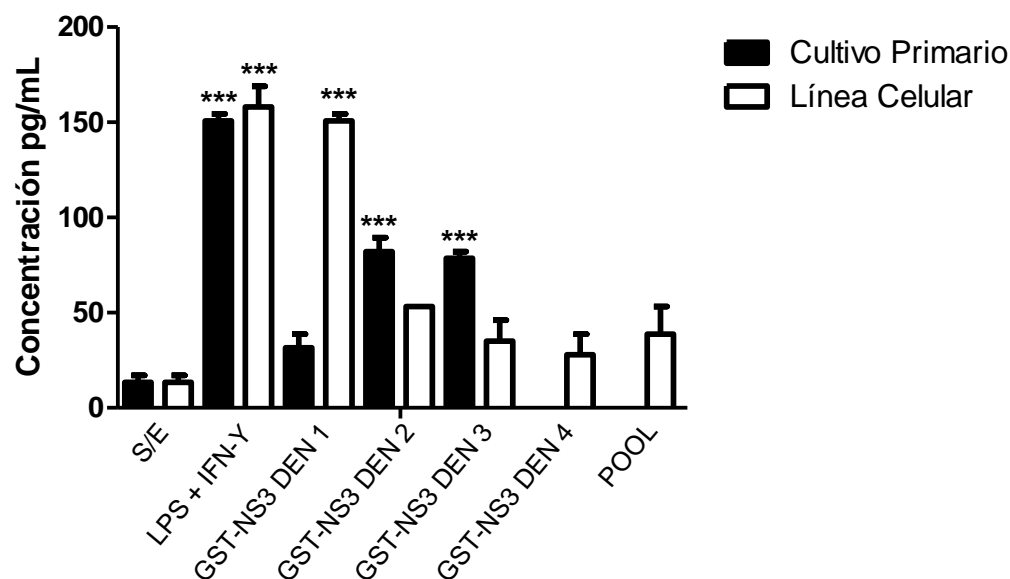
En la línea celular NK-92 se observó una baja concentración en los niveles de la citocina TNF- $\alpha$  en todos los estímulos, existen diversos estudios que han relacionado la presencia de esta citocina pro-inflamatoria con la gravedad de la enfermedad, en la cual se ha reportado relación del TNF- $\alpha$  con la severidad de la infección por el DENV y han descrito el incremento significativo en las concentraciones de TNF- $\alpha$  en pacientes con FDH (Chakravarti and Kumaria, 2006). El aumento de TNF- $\alpha$  se ha documentado ampliamente en infecciones causadas por el DENV tanto en el suero de pacientes infectados en los cuadros de FDH, así como en sobrenadantes de cultivo celular y se ha propuesto como un indicador de la progresión del cuadro clínico, por lo tanto, TNF- $\alpha$  estimula la reacción en la fase aguda de la respuesta inflamatoria (Reis *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que de manera *in vitro* al presentarse una infección primaria del DENV los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  se expresan bajos por lo que se deduce que esta citocina presenta un papel protector en la forma grave de la enfermedad por dengue, al presentarse una infección secundaria se presentan niveles de expresión altos, por lo cual el incremento de TNF- $\alpha$  se encuentra asociado a la patogenia, tal y como se ha explicado en un estudio prospectivo en niños inmunes a DENV, aquellos cuyas células producían *in vitro* altos niveles de TNF, desarrollaron cuadros más severos al sufrir la infección natural (Mangada *et al.*, 2002)

### **6.7.2 Determinación de quimiocinas CCL3, CCL4 y CCL5**

Las células NK participan en la respuesta contra infecciones virales, tal es el caso del DENV, al activarse producen diversas citocinas y quimiocinas anti-virales pero principalmente IFN, CCL3 (Beltrán D and López-Vergés S, 2014), CCL4 y CCL5 (Petitdemange *et al.*, 2014), las cuales ayudan a reclutar otro tipo de células al sitio de inflamación (Beltrán D and López-Vergés S, 2014). Por este motivo, se realizó la

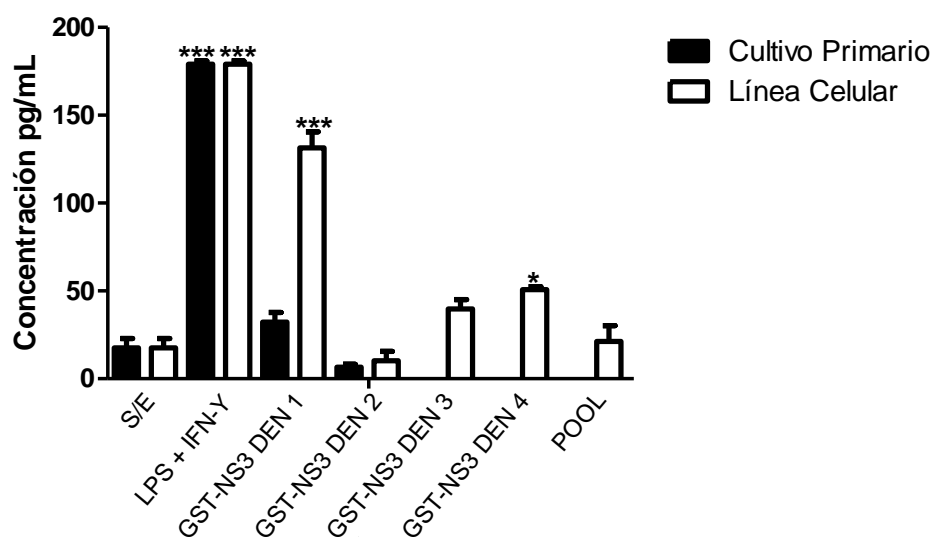
interacción de las células NK del cultivo primario y de la línea celular NK-92 con las proteínas recombinantes y se determinó la expresión de CCL3, CCL4 y CCL5.

Para las células de cultivo primario, los valores obtenidos para CCL3 por la estimulación con las proteínas fueron de 24.32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 154.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sin embargo los únicos estímulos que mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) fueron las interacciones con GST-NS3DEN2 y GST-NS3DEN3 (**Figura 16**), en el caso de la línea celular, los valores obtenidos para CCL3 por la estimulación con las proteínas fueron de 9.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 168.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sin embargo los únicos estímulos que son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) fue el estímulo con el GST-NS3DEN1, *in vivo*, ésta quimiocina es atrayente para células NK y monocitos (Bozza *et al.*, 2008) (**Figura 16**).



**Figurva 16. Determinación de CCL3 en células NK de cultivo primario y de la línea celular NK-92 por ELISA.** Las células NK de cultivo primario (barras negras) y de la línea celular (barras blancas) fueron estimuladas con las proteínas recombinantes y con un *pool* de las mismas a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y con LPS + IFN- $\gamma$  (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  - 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como control positivo, después de 72 h, la quimiocina se determinó en el sobrenadante de los cultivos por ELISA. Las diferencias fueron analizadas mediante una ANOVA de una vía comparando las células no estimuladas contra los diferentes estímulos empleando la prueba de Tukey. Los \*\*\* muestran la diferencia significativa de  $p < 0.001$ , \*\* muestran diferencia significativa de  $p < 0.01$  y \* muestra diferencia significativa de  $p < 0.05$ .

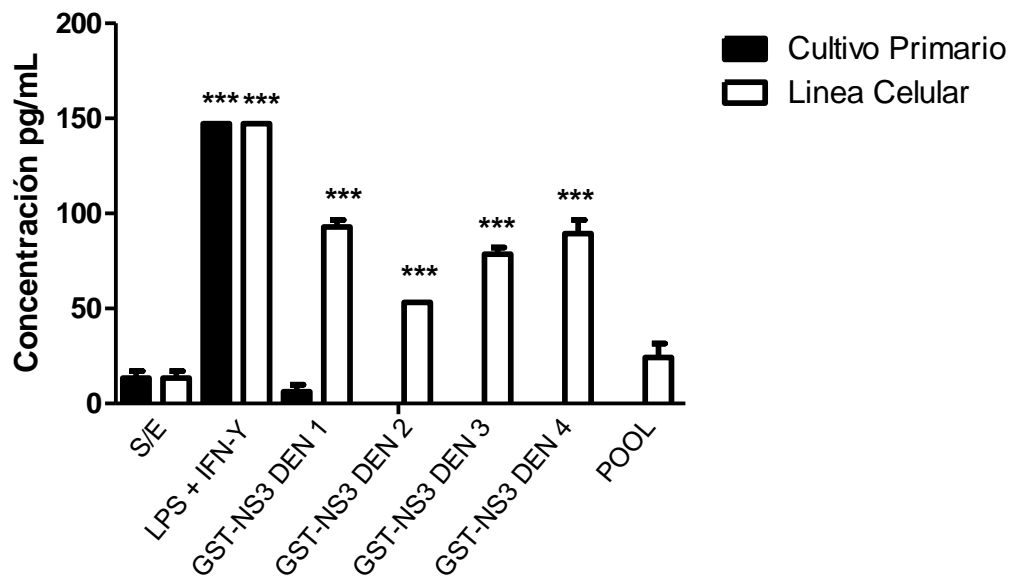
Se realizó también la determinación de la expresión de la quimiocina CCL4, los valores obtenidos por la estimulación con las proteínas para el cultivo primario fueron de 6.72  $\mu\text{g/mL}$  hasta 180.87  $\mu\text{g/mL}$ , para algunas interacciones se obtuvieron valores por debajo del obtenido por las células sin estímulo, ninguno de los estímulos mostró diferencia significativa con respecto al control (**Figura 17**), mientras que los valores obtenidos de la interacción de la línea celular NK-92 con las proteínas recombinantes fueron de 12.32  $\mu\text{g/mL}$  hasta 177.38  $\mu\text{g/mL}$ , los estímulos que son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) fueron las interacciones con GST-NS3DEN1 y GST-NS3DEN4 (**Figura 17**). Con la expresión de esta molécula se sugiere que si la infección se diera *in vivo*, se cumpliría con la función del reclutamiento de células asesinas naturales (NK) y de monocitos al sitio de inflamación fortaleciendo así la respuesta inmune contra el DENV en el hospedero (Bozza *et al.*, 2008).



**Figura 17. Determinación de CCL4 en células NK de cultivo primario y de la línea celular NK-92 por ELISA.** Las células NK de cultivo primario (barras negras) y de la línea celular (barras blancas) fueron estimuladas con las proteínas recombinantes y con un *pool* de las mismas a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ , y con LPS + IFN- $\gamma$  (4  $\mu\text{g/mL}$  - 5  $\mu\text{g/mL}$ ) como control positivo, después de 72 h, la quimiocina se determinó en el sobrenadante de los cultivos por ELISA. Las diferencias fueron analizadas mediante una ANOVA de una vía comparando las células no estimuladas contra los diferentes estímulos empleando la prueba de Tukey. Los \*\*\* muestran la diferencia significativa de  $p < 0.001$ , \*\* muestran diferencia significativa de  $p < 0.01$  y \* muestra diferencia significativa de  $p < 0.05$ .



Para el caso de la determinación de CCL5 en las células de NK de cultivo primario ningún estímulo indujo diferencias significativas (**Figura 18**), mientras que los valores obtenidos para la línea celular NK-92 después de la estimulación fueron desde 9.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 147.18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , todos los estímulos indujeron diferencias estadísticamente significativas a excepción del estímulo realizado con el *pool* de proteínas ( $p < 0.05$ ) (**Figura 18**). CCL5 juega un papel importante en la acumulación de células NK en los sitios de infección por virus, así como durante las infecciones parasitarias (Maghazachi A, 2010).



**Figura 18. Determinación de CCL5 en células NK de cultivo primario y en la línea celular NK-92 por ELISA.** Las células NK de cultivo primario (barras negras) y de la línea celular (barras blancas) fueron estimuladas con las proteínas recombinantes y con un *pool* de las mismas a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y con LPS + IFN- $\gamma$  (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  - 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como control positivo, después de 72 h, la quimiocina se determinó en el sobrenadante de los cultivos por ELISA. Las diferencias fueron analizadas mediante una ANOVA de una vía comparando las células no estimuladas contra los diferentes estímulos empleando la prueba de Tukey. Los \*\*\* muestran la diferencia significativa de  $p < 0.001$ , \*\* muestran diferencia significativa de  $p < 0.01$  y \* muestra diferencia significativa de  $p < 0.05$ .

Los estudios clínicos recientes en áreas donde el DENV es endémico describen una correlación entre el FHD/SCD y los niveles de quimiocinas CC, incluyendo CCL3/MIP-1 $\alpha$  y CCL4/MIP-1 $\beta$ , está demostrado que CCL4 podría estar asociado con una vía protectora para el efecto quimioatrayente y activador sobre las células NK (CD56+), que a su vez son células eficientes en la depuración temprana del virus, esta quimiocina es capaz de inducir el reclutamiento de monocitos, linfocitos, células dendríticas entre otros tipos de leucocitos en la infección e inflamación (Guabiraba *et al.*, 2010).

En el presente estudio se observó una elevada producción de la quimiocina CCL3 para ambos casos celulares, esta quimiocina está asociada con una vía protectora para el efecto quimioatrayente y activador sobre las células NK, éstas células son eficientes en el aclaramiento temprano del virus, ya que producen citocinas antivirales y con actividad citotóxica contra las células infectadas (Bozza *et al.*, 2008).

CCL4/MIP-1 $\beta$  es una proteína que reduce las uniones estrechas de las células del endotelio vascular en diferentes enfermedades inflamatorias. Las altas concentraciones de esta proteína han sido reportadas en pacientes con FHD/ SCD y no en una infección primaria. La exposición del endotelio a estas quimiocina puede causar lesión, amplificación de la respuesta inflamatoria y finalmente conducir a las formas graves del dengue (Guabiraba R, & Ryffel B 2014).

El aumento de los niveles de CCL5 se cree que puede contribuir a la aparición de infiltrados celulares, ya que esta quimiocina induce el movimiento celular desde el torrente sanguíneo hasta los tejidos, por lo tanto, se infiere una estrecha relación entre CCL5 y la alteración en la permeabilidad vascular un evento relacionado con el dengue grave. Es una quimiocina expresada tempranamente la cual es inducida por los receptores de reconocimiento de patrones, pero también puede ser inducida por TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$  en las últimas etapas de la infección, que es el caso de una situación terminal de dengue (Póvoa *et al.*, 2016)

Finalmente, la interacción de las proteínas recombinantes GST-NS3 de los cuatro serotipos del DENV inducen en las células NK procesos de activación, tales como la producción de citocinas y quimiocinas y la generación de su actividad efectora o citotóxica.

## 7. CONCLUSIONES

- Los plásmidos recombinantes pGEX-NS3 1-4 fueron capaces de expresar una proteína de 49 kDa correspondiente al fragmento de GST-NS3 derivada del DENV.
- Se logró aislar y purificar células NK a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante selección negativa.
- De acuerdo con la caracterización fenotípica realizada por citometría de flujo se encontró que el fenotipo de las células NK de humano aisladas fueron CD56<sup>dim</sup>, debido a que se presentó una alta reactividad de CD16 y una baja producción de citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$
- Se logró propagar y mantener cultivos “in vitro” de la línea celular NK-92.
- No se lograron observar diferencias significativas en la expresión de IFN- $\gamma$ , perforina y granzima b en las NK de humano probablemente debido a que el fenotipo aislado fue CD56<sup>dim</sup> ni en la línea celular, probablemente debido al cultivo con IL-2.
- Se logró observar la expresión de TNF- $\alpha$  y CCL3 en las células NK de cultivo primario y en la línea celular se logró observar la expresión de TNF- $\alpha$ , CCL3, CCL4 y CCL5 lo que sugiere que se aislaron CD56<sup>bright</sup> y por ende puede haber permeabilidad vascular y dengue hemorrágico

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A.K., Lichtman A.H. y Pillai S. (2012). Inmunidad innata. *En: Inmunología celular y molecular*. Séptima edición. Elsevier Ed. pp. 68.

Acosta-Bas C. y Gómez-Cordero I. (2005). Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev Biomed* 16:113-137.

Allen M., Bailey C., Cahatol I., Dodge L., Yim J., Kassissa C., Luong J., Kasko S., Pandya S. and Venketaraman V. (2015). Mechanisms of control of Mycobacterium tuberculosis by nk cells: role of glutathione. *Front Immunol.* 6:508.

Alm E., Lesko B., Lindegren G., Ahlm C., Söderholm S., Falk K.I. and Lagerqvist N. (2014). Universal single-probe RT-PCR assay for diagnosis of dengue virus infections. *PLoS Negl Trop Dis* 8(12): e3416.

Álvarez-Rodríguez L.M, Ramos-Ligonio A., Rosales-Encina J.L, Martínez-Cázares M, Parissi-Crivelli A. and López-Monteon A. (2012). Expression, purification, and evaluation of diagnostic potential and immunogenicity of a recombinant NS3 protein from all serotypes of dengue virus. *J Trop Med*, 956875.

Beltrán D. and López-Vergés S. (2014). NK cells during dengue disease and their recognition of dengue virus-infected cells. *Front Immunol* 5:192.

Bieñ K., Sokołowska J., Bąska P., Nowak Z., Stankiewicz W., & Krzyzowska M. (2015). Fas/FasL pathway participates in regulation of antiviral and inflammatory response during mousepox infection of lungs. *Mediators Inflamm* 2015, 281613.

Bozza F.A., Cruz O.G., Zagne S.M., Azeredo E.L., Nogueira R.M., Assis E.F., Kubelka C.F. (2008). Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infectious Diseases* 8-86.

Buchy P., Yoksan S., Peeling R.W. and Hunsperger E. (2006). Laboratory test for the diagnosis of dengue virus infection. World Health Organization on behalf of the special programme for research and training in tropical disease. [http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg\\_dengue\\_2.htm](http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_dengue_2.htm)

Bustos-Arriaga J., García-Machorro J., León-Juárez M., García-Cordero J., Santos-Argumedo L., Flores-Romo L., Méndez-Cruz A.R., Juárez-Delgado F.J. and Cedillo-Barrón L. (2011). Activation of the innate immune response against DENV in normal non-transformed human fibroblasts. *PLoS Negl Trop Dis* 5(12):e1420.

Campbell J., Qin S., Unutmaz D., Soler D., Murphy K.E., Hodye M.R., Wu L. and Butcher E.C. (2001). Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* 166(11):6477-6482.

Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades CENAPRECE (2017). Enfermedades transmitidas por vector. Recuperado de <http://www.cenave.gob.mx/Dengue>. Fecha de consulta: 30 mayo de 2017.

Chakravarti A. and Kumaria R. (2006). Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res.* 123(1):25-30.

Chan A., Hong D.L., Atzberger A., Kollnberger S., Filer A.D., Buckley C.D., McMichael A., Enver T. and Bowness P. (2007). CD56<sup>bright</sup> human NK cells differentiate into CD56<sup>dim</sup> cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 79(1):89-84.

Clasificación del dengue, extraído de: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/clasificacion.html> página 12, fecha de consulta 14 de mayo del 2015.

Clyde K., Kyle J.L. and Harris E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80(23):11418-11431.

Cocom-Góngora P.C., Mut-Martín M.C. y García-Miss M.R. (2004). Los receptores de los linfocitos de la inmunidad innata. *Rev Biomed* 15:113-122.

Coligan J., Bierer B., Margulies D., Shevach E. and Strober W. (2001). Unit 7.7 Isolation of Human NK Cells and Generation of LAK Activity. En: *Current Protocols in Immunology* pp. 1214-1226.

Cooper M.A., Fehniger T.A., Turner S.C., Chen K.S., Ghaehri B.A., Ghayur T., Carson W.E. and Caligiuri M.A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset. *Blood* 97(10):3146-3151.

De Rham C., Ferrari-Lacraz S., Jendly S., Schneiter G., Dayer J.M. and Villard J. (2007). The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res Ther* 9(6): R125.

Descripción de la situación epidemiológica actual del dengue en las Américas. Organización Mundial de la Salud. Extraído de: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4494:descripcion-situacion-epidemiologica-actual-dengue-americas&Itemid=40687&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494:descripcion-situacion-epidemiologica-actual-dengue-americas&Itemid=40687&lang=es) fecha de consulta 8 de mayo del 2015.

Diagnóstico de laboratorio y pruebas diagnósticas, extraído de: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44504/1/9789995479213\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44504/1/9789995479213_spa.pdf), página 105, fecha de consulta 16 de mayo del 2015.

Duggal N.A., Upton J., Phillips A.C., Hampson P. & Lord J.M. (2015). NK cell immunosenescence is increased by psychological but not physical stress in older adults associated with raised cortisol and reduced perforin expression. *Age*, 37(1), 11.

Gómez-Lomelí P., Bravo-Cuellar A., Hernández-Flores G., Jave-Suárez L.F, Aguilar-Lemarroy A., Lerma-Díaz J.M., Domínguez-Rodríguez J.R., Sánchez-Reyes K. and Ortiz-Lazareno P.C. (2014). Increase of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  production in CD107a + NK-92 cells co-cultured with cervical cancer cell lines pre-treated with the HO-1 inhibitor. *Cancer Cell Int*, 14(1):100.

Gong J.H., Maki G., Klingemann H.G. (1994). Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8(4):652-658.

Goodier M.R. and Londei M. (2004). CD28 is not directly involved in the response of human CD3-CD56+ natural killer cells to lipopolysaccharide: a role for T cells. *Immunology* 111(4), 384-390.

Green A.M., Beatty P.R., Hadjilaou A. and Harris E. (2014). Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol* 426(6):1148-1160.

Groer M.W., El-Badri N., Djeu J., Williams S.N., Kane B. and Szekeres K. (2014). Suppression of natural killer cell cytotoxicity in postpartum women: time course and potential mechanisms. *Biological Research for Nursing* 16(3):320–326.

Guabiraba R., Marques R.E., Besnard A.G., Fagundes C.T., Souza D.G., Ryffel B. & Teixeira M.M. (2010). Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. *PLoS ONE*, 5(12):e15680.

Guabiraba R. & Ryffel B. (2014). Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology*, 141(2):143–156.

Gutiérrez L., Quintero D. and Martínez M. (2012). Update on dengue diagnosis: techniques evolution and their clinical application. *Medicina & Laboratorio* 18:411-441.

Guzman M.G, Halstead S.B., Artsob H., Buchy P., Farrar J., Gluber D.J., Hunsperger E., Kroeger A., Margolis H.S., Martínez E., Nathan M.B., Pelegriño J.L., Simmons C., Yoksan S. and Peeling R.W. (2010) Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8(12 Supl): S7-S16.

Hayakawa Y., Huntington N.D., Nutt S.L. and Smyth M.J. (2006). Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol Rev* 214:47–55.

Hunsperger E.A., Yoksan S., Buchy P., Nguyen V.C., Sekaran S.D., Enria D.A., Pelegriño J.L., Vázquez S., Artsob H., Drebot M., Gubler D.J., Halstead S.B., Guzmán M.G., Margolis H.S., Nathanson C.M., Rizzo Lic N.R., Bessorff K.E., Killis S. and Peeling R.W. (2009) Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg Infect Dis* 15(3):436–440. doi: 10.3201/eid1503.080923.

Jing Y., Ni Z., Wu J., Higgins L., Morkowski T.W., Kaufman D.S. and Walcheck B. (2015). Identification of an ADAM17 cleavage region in human CD16 (FcγRIII) and



the engineering of a non- cleavable version of the receptor in NK cells. *PLoS One* 10(3):e0121788.

Junjhon J., Pennington J.G., Edwards T.J., Perera R., Lanman J. and Kuhn R.J (2014). Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *J Virol* 88(9):4687-4697.

Klingemann H., Boissel L., and Toneguzzo F. (2016). Natural killer cells for immunotherapy—advantages of the NK-92 cell line over blood NK cells. *Front Immunol* 14;7:91.

Krzywinska E., Cornillon A., Allende-Vega N., Vo D.N., Rene C., Lu Z.Y., Pasero C., Olive D., Fegueux N., Ceballos P., Hicheri Y., Sobecki M., Rossi J.F., Cartron G. and Villalba M. (2016). CD45 isoform profile identifies natural killer (NK) subsets with differential activity. *PLoS One* 11(4)e0150434:.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

León-Juárez M., Martínez-Castillo M., Shrivastava G., García-Cordero J., Villegas-Sepulveda N., Mondragón-Castelán M., Mondragón-Flores R. and Cedillo-Barrón L. (2016). Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models. *Virology* 13, 1. doi: 10.1186/s12985-015-0456-4.

Leong J.W., Chase J.M., Romee R., Schneider S.E., Sullivan R.P., Cooper M.A. and Fehniger T.A. (2014). Pre-activation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Biol blood Marrow Transplant* 20(4): 463-473.

Longo L., Kasper L., Jameson L., Fauci S., Hauser L., and Loscalzo J. (2012). Resistencia a las infecciones virales. En, Harrison: principios de medicina interna (18a. ed.) (pág. 1439). México: Mc Graw Hill.

Mangada M.M., Endy T.P., Nisalak A., Chunsuttiwat S., Vaughn D.W., Libraty D.H., Green S., Ennis D.A. and Rothman A.L. (2002). Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis* 185(12):1697-703.

- Mazzucco M.B, Talarico L.B., Vatansever S., Carro A.C., Fascio M.L., D'Accorso N.B., García C.C. and Damonte E.B. (2015). Antiviral activity of an N-allyl acridone against dengue virus. *J Biomed Sci* 22(1): 29.
- Melsen J.E., Lugthart G., Lankester A.C. and Schilham M.W. (2016). Human circulating and tissue-resident CD56<sup>bright</sup> natural killer cell populations. *Front Immunol* 30; 7:262.
- Mihaylova I., DeRuyter M., Rummens J.L., Bosmans E. and Maes M. (2007). Decreased expression of CD69 in chronic fatigue syndrome in relation to inflammatory markers: evidence for a severe disorder in the early activation of T lymphocytes and natural killer cells. *Neuro Endocrinology Letters* 28(4):477-483.
- Modis Y., Ogata S., Clements D. and Harrison S.C (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427:313-319.
- Mukhopadhyay S., Kuhn R.J. and Rossmann M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3(1):13-22.
- Nielsen C.M, White M.J., Goodier M.R. and Riley E.M. (2013). Functional significance of CD57 expression on human NK cells and relevance to disease. *Front Immunol* 9; 4:422.
- Øren A., Husebø C., Iversen A.C. and Austgulen R. (2005). A comparative study of immunomagnetic methods used for separation of human natural killer cells from peripheral blood. *J Immunol Methods* 303(1-2):1-10.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2009). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Nueva ed., TDR-OMS, Bolivia pp.11-12.
- Paul S. & Lal G. (2017). The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 8, 1124.
- Perdu S., Castellana B., Kim Y., Chan K., DeLuca L. & Beristain A.G. (2016). Maternal obesity drives functional alterations in uterine NK cells. *JCI Insight*, 1(11), e85560.

- Peter M.E., Hadji A., Murmann A.E., Brockway S., Putzbach W., Pattanayak A. and Ceppi P. (2015). The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* 22(5): 885-886.
- Petitdemange C., Wauguier N., Rey J., Hervier B., Leroy E. and Vieillard V. (2014). Control of acute dengue virus infection by natural killer cells. *Front Immunol*; 13; 5:209.
- Pita-Lopez M.L., Ortiz-Lazareno P.C., Navarro-Meza M., Santoyo-Telles F. and Peralta-Zaragoza O. (2014). CD28-, CD45RA<sup>null/dim</sup> and natural killer-like CD8+ T cells are increased in peripheal blood of women with low-grade cervical lesions. *Cancer Cell Int* 14(1):97.
- Poli A., Michel T., Thérésine M., Andrés E., Hentges F. and Zimmer J. (2009). CD56<sup>bright</sup> natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126(4): 458-465.
- Póvoa T.F., Oliveira E.R.A., Basílio-de-Oliveira C.A., Nuovo G.J., Chagas V.L.A., Salomão N.G., Mota E.M. and Paes M.V. (2016). Peripheral organs of dengue fatal cases present strong pro-inflammatory response with participation of IFN-gamma-, TNF-alpha- and RANTES-producing cells. *PLoS ONE*, 11(12), e0168973.
- Reis S.R., Sampaio A.L., Henriques M.D., Gandini M., Azeredo E.L., Kubelka C.F. (2007). An in vitro model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 102 (8): 983-990.
- Roopashri G., Vaishali M., David M.P., Baig M, Navneetham A. and Venkataraghavan K. (2015). Clinical and oral implications of dengue fever: A review. *J Int Oral Health* 7(2):69-73.
- Saavedra-Hernández D. (2013). CD28 and its role in T cell activation. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 29(4):359-367.
- Saluta, M. y Bell, P.A. (1998). Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli*. *Amersham Pharmacia Biotech*, 1-3.

- Sancho D., Gómez M. and Sanchez-Madrid F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 26(3):136-140.
- Schein C.H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology*, 7:1141-1148.
- Schmid M.A. and Harris E. (2014). Monocyte recruitment to the dermis and differentiation to dendritic cells increases the targets for dengue virus replication. *PLoS Pathog* 10(12): e1004541.
- Segoli M., Hoffmann A.A., Lloyd J., Omodei G.J. and Ritchie S.A. (2014). The effect of virus-blocking wolbachia on male competitiveness of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 8(12): e 3294.
- Seijo A. (2001). El dengue como problema de salud pública. *Arch Argent Pediatr* 99 (6): 510-521.
- Semenza J.C., Sudre B., Miniota J., Rossi M., Hu W., Kossowsky D., Suk J.E., Van Bortel W. and Khan K. (2014). International dispersal of dengue through air travel: importation risk for Europe. *PLoS Negl Trop Dis* 8(12): e3278.
- Sepúlveda C. & Puente J. (2000). Células natural killer y el sistema inmune innato en la patología infecciosa. *Rev Med Chile* 128(12):1361-1370.
- Sharma P., Kumar P. & Sharma R. (2017). Natural Killer Cells - Their role in tumour immunosurveillance. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 11(8), BE01–BE05.
- Shuyan L., Lingming C., Ying Z., Lulu S., Xiaolan G., Junmei Z., Danyun F., Gucheng Z. and Lifang J. (2016). Suppressed expression of miR-378 targeting gzmb in NK cells is required to control dengue virus infection. *Cellular & Molecular Immunology* 13(5): 700–708.
- Smith D.B. and Johnson K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67 (1): 31-40.

Soroy L., Bagus S., Purnama Y.I. and Djoko W. (2014). The effect of a unique propolis compound (Propoelix™) on clinical outcomes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Infect Drug Resist* 7:323-329.

Srivastava S., Pelloso D., Feng H., Voiles L., Lewis D., Haskova Z., Whitacre M., Trulli S., Chen Y.J., Toso J., Jonak Z.L., Chang H.C. and Robertson M.J. (2013). Effects of interleukin-18 on natural killer cells: co-stimulation of activation through Fc receptors for immunoglobulin. *Cancer Immunol Immunother* 62(6):1073-1082.

St. John A. (2013). Influence of mast cells on dengue protective immunity and immune pathology. *PLOS Pathogens* 9(12):e1003783.

Tallerico R., Garofalo C. and Carbone E. (2016). A new biological feature of natural killer cells: the recognition of solid tumor-derived cancer stem cells. *Front Immunol* 7:179.

Tarazona R., Casado J.G., Delarosa O., Torre-Cisneros J., Villanueva J.L., Sanchez B., Galiani M.D., Gonzalez R., Solana R. and Peña J. (2002). Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naïve HIV-1-seropositive individuals. *J Clin Immunol* 22(3):176-183.

Teoh B.T., Sam S.S., Tan K.K., Danlami M.B., Shu M.H., Johari J., Hooi P.S., Brooks D., Piepenburg O., Nentwich O., Wilder-Smith A., Franco L., Tenorio A. and AbuBakar S. (2015). Early detection of dengue virus by use of reverse transcription-recombinase polymerase amplification. *J Clin Microbiol* 53(3):830-837.

Tsai T.T., Chuang Y., Lin Y.S., Chang C.P., Wan S.W., Lin S.H., Chen C.L. and Lin C.P. (2014). Antibody-dependent enhancement infection facilitates dengue virus-regulated signaling of IL-10 production in monocytes. *PLoS Negl Trop Dis*. 8(11):e3320.

Tsukerman P., Stern-Ginossar N., Yamin R., Ophir Y., Stanietsky A.M. and Mandelboim O. (2014). Expansion of CD16 positive and negative human NK cells in response to tumor stimulation. *Eur J Immunol* 44(5):1517-1525.

Velandia M.L. and Castellanos J.E (2011). Dengue virus: structure and viral cycle *Infect* 15(1):33-43.

Villasmil R., Briceño C. y Torres D. (2009). Inmunología, inflamación y preclampsia. *Rev. Obstet Ginecol Venez*, 69(2): 97-110.

Villaverde A. y Mar C.M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett*, 25:1385–1395.

Wang R., Jaw J., Stutzman C., Zou Z. and Sun D. (2012). Natural killer cell-produced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *Journal of Leukocyte Biology*, 91(2), 299–309.

Zhao Q., Xu W., Xhing L. and Lin Z. (2016). Recombinant production of medium-to large-sized peptides in *Escherichia coli* using a cleavable self-aggregating tag. *Microb Cell Fact* 15(1):136.