



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**SUSCEPTIBILIDAD DE CULTIVOS
CELULARES DE FIBROBLASTOS Y
MACRÓFAGOS DE MURCIÉLAGOS
(*Artibeus sp.*) AL VIRUS DENGUE**



T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A :

BE. HAYDE NALLELY MORENO SANDOVAL

DIRECTORES DE TESIS: Dr. ÁLVARO AGUILAR SETIÉN
Dr. RICARDO LÓPEZ WILCHIS

ASESORA: M. en M. MARIA MARTHA GARCÍA FLORES

México DF. Febrero de 2010

Con la aprobación del los miembros del Comité Tutorial

Co-director externo

Dr. Álvaro Aguilar Setién

Investigador Titular

Unidad de Investigación Médica en
Inmunología, Hospital de pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Co- director interno

Dr. Ricardo López Wilchis

Investigador Titular

Departamento de Biología
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa.

Asesora

M en M. María Martha García Flores

Químico Clínico

Unidad de Investigación Médica en
Inmunología, Hospital de pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, con número de registro 309-0, pertenece al Posgrado en Biología Experimental y forma parte de los programas de PIFOP-CONACYT con clave C/PFPN-2002-35-32.

Éste trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmuno-virología, de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, bajo la co-dirección del Dr. Álvaro Aguilar Setién y el Dr. Ricardo López Wilchis y la asesoría de la M en M. María Martha García Flores. El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por medio del proyecto con número de control del IMSS asignado por el Fondo de Investigación en Salud: FIS/IMSS/PROT/198.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa recibí una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, bajo el número de registro 228731 en el periodo 2007-2009.

Los miembros del jurado, abajo firmantes aprobaron la tesis titulada: **“Susceptibilidad de cultivos celulares de fibroblastos y macrófagos de murciélagos (*Artibeus sp.*) al Virus Dengue”**, con fecha de examen del 25 de Febrero de 2010.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE

Dr. Edmundo Bonilla González

Profesor titular. Departamento Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

SECRETARIO

Dr. Miguel Ángel León Galván

Profesor titular. Departamento de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

VOCAL

M en C. Mónica Salas Rojas

Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

VOCAL

M en M. María Martha García Flores

Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Álvaro Aguilar Setién por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, por la guía, por su paciencia y consejos otorgados durante la maestría.

Al Dr. Ricardo López Wilchis por la confianza y apoyo.

A la M en M. Martha García Flores por sus aportaciones a este trabajo.

Al M en C. Leonardo Perea Martínez por toda la ayuda y dirección que me brindo para poder concluir.

A todos mis compañeros del laboratorio de Inmuno – virología: Mónica, Leo, Lety, Nidia, Memo y Marissa por su amistad y apoyo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Iztapalapa por haberme permitido tener una formación profesional.

Dedicatoria

Con todo mi amor y agradecimiento a:

Mi mamá Avelina por todo el apoyo que me ha dado siempre, por estar a mi lado dándome ánimos para seguir creciendo y por creer en mí. Gracias por todo mami eres todo para mí.

Christian, el amor de mi vida e inspiración, gracias por darme tanto amor, por creer en mí y por estar siempre dispuesto a escucharme.

Mis tías Carmen y Sandy porque nada sería igual sin ustedes, gracias por la confianza y el amor que me han dado, por preocuparse y estar a mi lado en los momentos buenos y malos.

Mis hermanas Suge y Eli por siempre estar conmigo haciendo más feliz mi vida y por la gran amistad. Agradezco a Dios por haberme dado unas hermanas tan lindas como ustedes.

A mi abuelito Joaquin y todas mis tías, tíos, primos y primas, los amo mucho.

A mis amigas Claudia, Hilda y Paulina que gracias al gran equipo de trabajo y gran amistad que formamos llegamos hasta el final de este ciclo. Son excelentes amigas malditonas, gracias por todo.

A las nubes del cielo y al viento que mueve las hojas de los árboles.

RESUMEN

El dengue es la enfermedad viral re-emergente transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial y constituye uno de los mayores retos de la salud pública. En México, la Secretaría de Salud encontró que el número de casos de dengue incrementa año con año y durante el 2009 se reportaron 31836 casos, de los cuales 25929 son casos confirmados de Fiebre por Dengue (FD) y 5907 son casos confirmados de Dengue Hemorrágico (DH). A pesar de la morbilidad mundial causada por la infección con Virus Dengue (VD), ni la patogenia, ni el ciclo de transmisión de este virus han sido comprendidas completamente. Hasta el momento se sabe que los humanos, así como los primates y los mosquitos son las únicas especies susceptibles de manera natural al virus; además, únicamente los humanos desarrollan las manifestaciones clínicas propias de la infección. Se ha visto que los pacientes con dengue muestran una variedad de tipos celulares como las células dendríticas, monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales que son infectadas a diferentes tiempos en el curso de la enfermedad, además, cultivos de líneas celulares de fibroblastos, macrófagos, epiteliales y endoteliales han mostrado poder replicar al virus de manera *in vitro*.

En estudios previos realizados por nuestro grupo se encontró anticuerpos contra el VD y la presencia de la proteína no estructural NS1 y del VD2 en algunas especies de murciélagos, entre los que también se encuentran murciélagos *Artibeus sp.*, siendo esta la primera evidencia que demuestra la presencia del VD en murciélagos de México. El objetivo del presente estudio es determinar si los cultivos de fibroblastos y macrófagos de murciélagos del *Artibeus sp.* son susceptibles a la infección por VD2.

En este estudio se encontró que los cultivos primarios de fibroblastos procedentes de biopsias de la oreja de *Artibeus sp.* son refractarios a la infección.

En cuanto a los cultivos primarios de macrófagos derivados de sangre periférica y bazo se encontró por citometría de flujo que existen dos poblaciones de monocitos/macrófagos que presentan el receptor de superficie CD14. Se detectó que las células CD14 positivas son permisivas al VD2 y además estas células se infectan con mayor velocidad que los macrófagos de humano. Como se sabe, el humano es el único reservorio que se ha descrito en el continente americano que puede replicar al VD de manera natural, el hecho de haber encontrado valores mayores de producción de proteína NS1 en los macrófagos de murciélago que en los de humano podría indicar una mayor o similar susceptibilidad a la infección. Este resultado resalta la posibilidad de que el VD pueda infectar a los murciélagos además de al ser humano en nuestro medio.

Es necesario señalar que en nuestro país poco se sabe de las enfermedades transmitidas a través de la fauna silvestre, en especial los murciélagos, siendo este trabajo pionero en ese aspecto.

ABREVIATURAS

ACAV	Comité Americano de Virus en Artrópodos
ADA	Amplificación dependiente de Anticuerpos
RNA+	Ácido Ribonucleico de polaridad positiva
DH	Dengue Hemorrágico
FD	Fiebre por Dengue
FITC	isotiocianato de fluoresceína
JEV	Encephalitis Japanese Virus
kDa	kilo Daltons
mL	mililitros
MOI	Índice de Multiplicidad de la Infección
msnm	metros sobre el nivel del mar
NS1	Proteína viral no estructural 1
NS2	Proteína viral no estructural 2
NS3	Proteína viral no estructural 3
NS4	Proteína viral no estructural 4
NS5	Proteína viral no estructural 5
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
p-i	post-inoculación
Proteína C	Proteína viral de la cápside
Proteína E	Proteína viral estructural
Proteína M	Proteína de la membrana viral
Proteína PrM	Precursor de la proteína de la membrana viral
RE	Retículo Endoplásmico
RT	rojo Texas
SALS	Subcomité de Seguridad de Arbovirus en Laboratorios
SCD	Síndrome de Choque por Dengue
SEMARNAT	Secretaria de Medio ambiente y Recursos Naturales
SFB	Suero Fetal Bovino
TGN	Trans Golgi Network
VD	Virus Dengue
VD2	Virus Dengue serotipo 2
WNV	West Nile Virus
x g	gravedades
YFV	Yellow Fever Virus
μL	micro litros

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.	Organización del genoma del VD.....	1
Figura 2.	Estructura de la proteína E.....	4
Figura 3.	Mecanismo propuesto para la fusión mediada por la proteína E.....	5
Figura 4.	Ciclo de replicación del VD.....	8
Figura 5	Casos confirmados de dengue por grupos de edad en México durante el 2009.....	9
Figura 6.	Modelo de la Amplificación Dependiente de anticuerpos para la replicación viral.....	11
Figura 7.	Distribución mundial de <i>Aedes aegypti</i> y áreas con actividad epidémica del VD.....	12
Figura 8.	Nivel del riesgo de transmisión del dengue en México.....	13
Figura 9.	Fotografía de murciélagos <i>Artibeus sp.</i>	17
Figura 10.	Fibroblastos de murciélagos <i>Artibeus sp.</i>	32
Figura 11.	Controles del ensayo de infección de macrófagos de murciélago con VD2.....	33
Figura 12.	Infección de macrófagos con VD2.....	34
Figura 13.	Cinética de producción de la proteína viral NS1 por macrófagos de distintas especies <i>in vitro</i>	36
Figura 14.	Identificación de las poblaciones celulares (leucocitos de sangre periférica) de murciélagos y de humano por tamaño y granularidad.....	36
Figura 15.	Detección de CD14 en monocitos/macrófagos.....	37
Figura 16.	Promedio del porcentaje de expresión de CD14 por regiones de monocitos.....	38
Figura 17.	Inmunofluorescencia para detectar CD14.....	39
Figura 18.	Inmunofluorescencia para identificar al VD2 y CD14 en células de murciélago.....	39
Tabla 1.	Número de especies de quirópteros, por suborden, Familias y género.....	16
Tabla 2.	Intensidad de fluorescenciencia en macrófagos de diferentes especies infectados con virus dengue.....	35

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	
I.1.	Características del Virus Dengue.....	1
I.2.	Tipos celulares susceptibles al Virus Dengue.....	2
I.3.	Ciclo replicativo del Virus Dengue.....	
I.3.a.	Entrada y desensamble.....	3
I.3.b.	Receptores celulares al Virus Dengue.....	5
I.3.c.	Traducción y procesamiento de la poliproteína.....	7
I.3.d.	Ensamble y maduración.....	7
I.4.	Manifestaciones clínicas.....	8
I.5.	Susceptibilidad y severidad de la infección.....	9
I.6.	Respuesta inmunológica.....	10
I.7.	Epidemiología.....	11
I.8.	Reservorios y modelos de estudio del dengue.....	13
I.9.	Quirópteros.....	15
I.10.	Relación de los quirópteros y enfermedades emergentes.....	18
I.11.	Los quirópteros y el Virus Dengue.....	21
II.	JUSTIFICACIÓN	23
III.	OBJETIVO GENERAL	24
IV.	OBJETIVOS PARTICULARES	24
V.	HIPÓTESIS	24
VI.	MATERIALES Y MÉTODO	
VI.1	Virus Dengue.....	25
VI.2	Anticuerpos.....	25
VI.3	Captura de los murciélagos y muestreo.....	25
VI.4	Infección <i>in vitro</i> de cultivos con VD2	
VI.4.1	Cultivos e infección de macrófagos derivados de monocitos de bazo y sangre periférica de <i>Artibeus sp.</i>	26

VI.4.2	Cultivos e infección de fibroblastos de oreja de <i>Artibeus sp.</i>	29
VI.4.3	Identificación de los monocitos de bazo y sangre periférica mediante citometría de flujo.....	30
VII.	RESULTADOS	
VII.1	Infección de los fibroblastos de oreja de murciélagos <i>Artibeus sp.</i> y detección del virus con inmunofluorescencia indirecta.....	32
VII.2	Infección de los macrófagos derivados de monocitos de bazo y sangre periférica de <i>Artibeus sp.</i>	32
VII.3	Cuantificación de la proteína NS1 para determinar la cinética de replicación viral.....	35
VII.4	Identificación de los monocitos de bazo y sangre periférica mediante citometría de flujo.....	36
VII.5	Identificación del CD14 y del VD2 en los macrófagos de murciélagos....	38
VIII.	DISCUSIÓN	40
IX.	CONCLUSIONES	45
X.	PERSPECTIVAS	46
XI.	REFERENCIAS	47
XII.	ANEXOS	
ANEXO I.	Precaución del personal de laboratorio para trabajar con arbovirus.....	54
ANEXO II.	Virus aislados de quirópteros infectados naturalmente.....	57
ANEXO III.	Aspectos de bioseguridad para el manejo de quirópteros.....	59

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Características del Virus Dengue

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante, ya que produce la fiebre hemorrágica de mayor incidencia a nivel mundial y constituye uno de los mayores retos de la salud pública (Martínez, 2006). El Virus Dengue (VD) es un arbovirus icosaédrico envuelto, que consta de una sola cadena de RNA con polaridad positiva (RNA+) de 10.7 kb, cuyo único marco de lectura abierto codifica para las tres proteínas estructurales: C de cápside, E de envoltura y M de membrana (misma que es sintetizada inicialmente como un precursor PrM) y para siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (fig. 1). Existen evidencias experimentales que sugieren que NS1, NS3-NS2b y NS5 tienen un papel relevante en el proceso de replicación viral (Perera y Kuhn, 2008). Este virus pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (Henchal *et al.*, 1990).

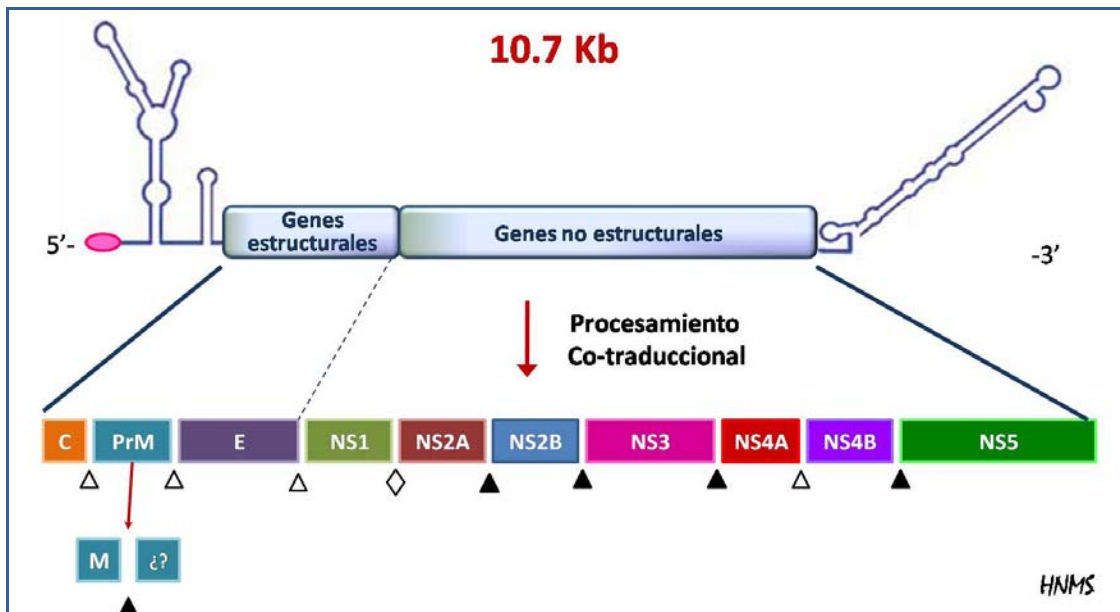


Figura 1. Organización de genoma del VD. El marco de lectura del VD, está flanqueado por dos regiones no traducidas, codifica para tres proteínas estructurales: C, M y E, y siete proteínas no estructurales: NS1 a NS5. Los triángulos en blanco indican posibles sitios de cortes enzimáticos. Los triángulos en negro indican posibles sitios de cortes proteolíticos después de dos aminoácidos básicos. El rombo indica un sitio de corte por una proteasa no identificada (Modificado de: Del Ángel, 2006).

Se pueden distinguir 4 serotipos de VD (VD1, VD2, VD3 y VD4) que co-circulan en México desde 1978. Dichos serotipos son transmitidos al ser humano por la picadura de los mosquitos del género *Aedes* (*A. aegypti*, *A. albopictus*, y *A. polynesiensis*) (Malavige *et al.*, 2004).

La infección de la hembra del mosquito con VD ocurre durante la alimentación con sangre infectada del hospedero. Durante los 10 días siguientes a la ingesta de la sangre, la replicación del virus sucede en diferentes tejidos del mosquito y finalmente se infectan las glándulas salivares. La infección dichas glándulas y la posterior inyección de la saliva infectada en otro humano, es el evento clave en el ciclo de transmisión del VD. (Cao-Lormeau, 2009).

1.2. Tipos celulares susceptibles al Virus Dengue

La patogénesis del Dengue Hemorrágico (DH) y Síndrome de Choque por Dengue (SCD) requiere la identificación precisa de las células permisivas al VD. Líneas celulares de mamíferos como las células de riñón de mono verde africano (Vero), las de riñón de hámster lactante (BHK-21), así como también el cerebro de ratones lactantes se han empleado para la propagación del VD (Imbert *et al.*, 1994), sin embargo la línea celular de mosquito C6/36 procedente de intestino de *A. albopictus* es la más usada hoy en día para aislar, propagar y mantener el virus (Pandey *et al.*, 1998). Los tipos celulares antes mencionados, además de ser empleados para la propagación viral, también se usan para el análisis de diagnóstico, estudios antivirales, búsqueda del receptor viral y estudios de replicación (Bente *et al.*, 2006). Los monocitos/macrófagos constituyen una célula blanco para el VD el cual es capaz de replicarse *in vivo* e *in vitro*, también puede infectar a las líneas celulares de monocitos/macrófagos humanos U937 y TPH-1 (Brant *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1997). Los macrófagos son parte importante de la inmunidad innata y se derivan de los monocitos presentes en la médula ósea (Chaturvedi *et al.*, 2006) y en el bazo (Swirski *et al.*, 2009). Los monocitos circulantes experimentan diferenciación y migran a través de las paredes de los bazos sanguíneos a varios tejidos, donde maduran

en macrófagos residentes de tejido específicos. Se ha identificado que las células dendríticas derivadas de monocitos también pueden ser activadas e infectadas por el VD. (Chen y Wang, 2002).

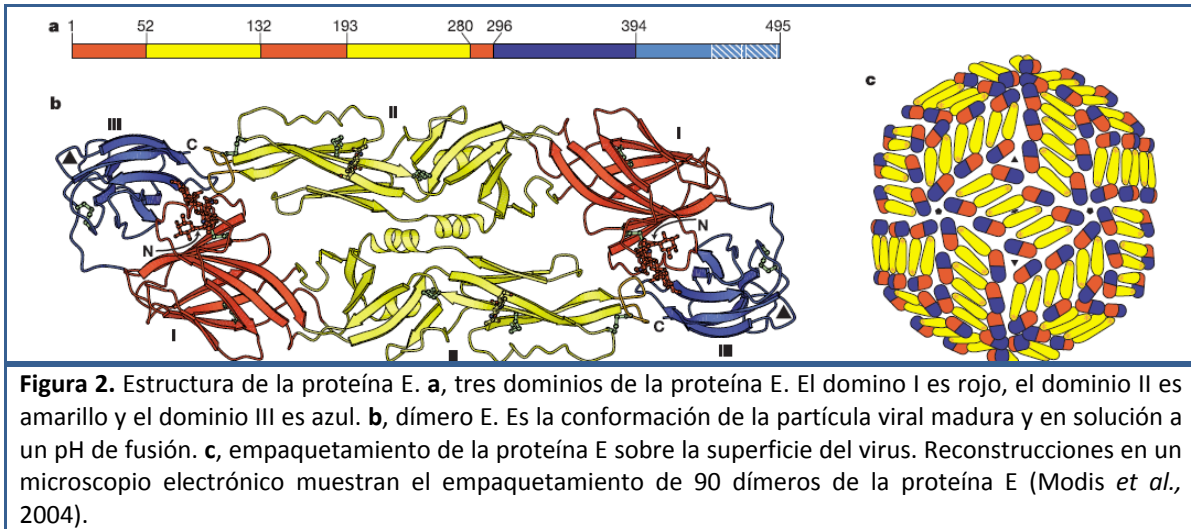
La presencia de antígeno viral ha sido reportada en tejido hepático y neuronal de pacientes que padecieron una severa infección por VD, sugiriendo la posible replicación del virus en estas células (Chaturvedi *et al.*, 1991; Marianneau *et al.*, 1997).

El solo contacto de un virus con un individuo susceptible puede ser insuficiente si barreras como la piel no pueden ser traspasadas. Los ectoparásitos que se alimentan de sangre pueden ser jeringas hipodérmicas efectivas, permitiendo que el patógeno atraviese la piel, pero si este no se adapta al nuevo hospedero, entonces no ocurre una infección productiva (Kunz, 1982). Para el caso del VD, los mosquitos del género *Aedes* son los encargados de inocularlo hipodérmicamente.

I.3. Ciclo de replicación del Virus Dengue

I.3. a. Entrada y desensamble

De la misma forma como ocurre con otros virus, el paso inicial en la infección por VD requiere la interacción entre la partícula viral y el receptor presente en la superficie de la célula hospedera, este último juega un papel importante en el tropismo viral. Una clase de proteína de fusión arquitectónica y evolutivamente distintiva es encontrada en los flavivirus, como Yellow Fever Virus (YFV), West Nile Virus (WNV) y VD. En el VD la molécula de fusión es la proteína de envoltura viral E, que en solución se encuentra formando dímeros (fig. 2) (Modis *et al.*, 2004). La proteína E es la proteína viral más expuesta y es la que interacciona con el receptor (Crill *et al.*, 2001).



El mecanismo de fusión del VD con la célula huésped se describe a continuación.

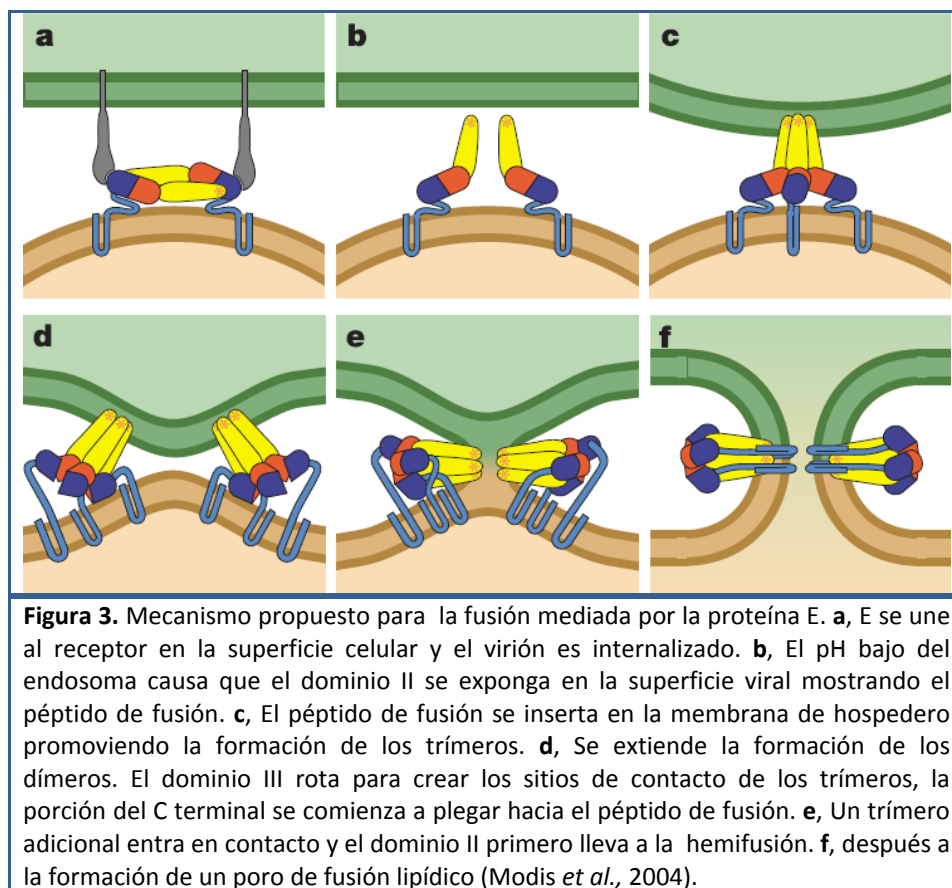
Primero, la asociación de la proteína E con el receptor en la superficie celular, se lleva a cabo a través del dominio III de la proteína viral (fig. 3a). Esta unión al receptor promueve la endocitosis del virus.

Después el pH bajo del endosoma genera la disociación de los dímeros de proteína E para exponer sus péptidos de fusión seguidos de los dominios II y I (fig. 3b).

Las proyecciones hacia afuera del dominio II destruirán la disposición apretada sobre la superficie viral, permitiendo el re-arreglo de los monómeros de proteína E adyacentes, esto da lugar a la formación de trímeros (intermediarios de prefusión). El intermediario de prefusión hace un puente entre la célula hospedera y la membrana viral (fig. 3c).

En la formación de los trímeros se exhibe en un extremo el péptido de fusión y en el otro el dominio I. El dominio III cambia de lugar y gira, plegando su C terminal hacia el péptido de fusión (fig. 3d).

La formación de la estructura de hemifusión junto con los prospectos fusionados distales y los prospectos distales no fusionados, (fig. 3e) parece ser un intermediario esencial en el mecanismo de fusión. Las estructuras de hemifusión pueden flanquear un poro estrecho. La migración de los segmentos transmembranales a lo largo de un poro transitorio puede prevenir su cierre. Así, los segmentos transmembranales rodean a los dominios II de la estructura de fusión conduciendo a la formación de un poro (fig. 3f) (Modis *et al.*, 2004).



I.3.b. Receptores celulares al Virus Dengue

Cualquier componente de la membrana celular, incluyendo carbohidratos, lípidos y proteínas puede ser un receptor viral, dependiendo del virus. Esos componentes de membrana sirven para el funcionamiento normal de la célula y son usados por los virus para unirse y entrar a ella (Muñoz *et al.*, 1998).

Diversos grupos alrededor del mundo han dirigido sus esfuerzos a la búsqueda de los receptores celulares para el VD, y han descrito moléculas como el glicosaminoglicano heparan sulfato (SH), al cual se une el virus a través de la interacción con la proteína E (Chen *et al.*, 1997). Dado que el SH está presente en una gran diversidad de células, su interacción con el virus permite la adsorción viral en la superficie de distintos tipos celulares.

En el caso específico de las células dendríticas, que están presentes en la piel del huésped humano y que son de las primeras que se infectan con dengue, la unión ocurre entre la molécula de adhesión intracelular 3 (ICAM3), molécula intracelular de adhesión molécula-3-Grabbin no integrina específico de células dendríticas (DC-SIGN), y los residuos de manosa de la asparagina 67 de la proteína E viral. DC-SIGN también permite la unión de otros virus (virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), Hepatitis C, Ébola y Citomegalovirus) a las células dendríticas (Navarro *et al.*, 2003; Tassaneetrithep *et al.*, 2003; Lozach *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha identificado a la laminina de 37/67 kDa y a la proteína de 78 kDa regulada por glucosa (GRP78) como moléculas receptoras para VD1 y 2, respectivamente, en células hepáticas Hep G2 (Thepparit y Smith, 2004; Jindadamrongwech *et al.*, 2004). En monocitos y macrófagos, se identificó a las proteínas de choque térmico (HSP) de 70 y 90 kDa (HSP70 y HSP 90) como parte del complejo de receptor viral (Reyes del Valle *et al.*, 2005).

Se han identificado otras proteínas con diferentes pesos moleculares en distintas líneas celulares como posibles receptores para el VD. Por ejemplo, una proteína de 45 kDa en células C6/36 (Salas *et al.*, 1997), una proteína de 74 kDa en células Vero (Martínez – Barragán *et al.*, 2001), una proteína de aproximadamente 40 a 45 kDa en una línea celular de células B y otra de 70 a 75 kDa en una línea de mielomonocitos (Bielefeldt - Ohmann, 1998), una proteína de 105 kDa en células de eritroleucemia (Rothwell *et al.*, 1996) y dos proteínas de 29 y 43 kDa en una línea celular de endotelio (Wei *et al.*, 2003). Usando cromatografía de afinidad, se ha descrito que en los monocitos y macrófagos hay

proteínas de membrana de 27, 45, 67 y 87 kDa que son probables receptores para el VD (Moreno - Altamirano *et al.*, 2002). También se ha determinado que el virus se une a una proteína de 65 kDa en la línea celular de neuroblastoma de ratón N1E-115, así como también en cerebro de ratón y su expresión es diferencial, mostrando en este último incremento a los días 5, 3 y 1 prenatales, así como 1, 3 y 7 pots-natales (García, 2000). Lo anterior concuerda con lo reportado en células de neuroblastoma de ratón N1E-115 y de humano SK-NSH en donde se determinó que el posible receptor es una proteína de membrana de 65 kDa sensible a la tripsina (Ramos – Castañeda *et al.*, 1997).

Después de que ha ocurrido la fusión, la cápside es liberada en el citoplasma, las proteínas de la cápside y el RNA⁺ se disocian y comienza la replicación de éste (fig. 4) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

I.3.c. Traducción y procesamiento de la poliproteína

A partir de las cadenas de RNA⁺ se da la síntesis de la poliproteína viral. Las proteínas estructurales son translocadas y ancladas en el retículo endoplásmico (RE) mediante varias secuencias señal y dominios de anclaje a la membrana (fig. 4) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

I.3.d. Ensamble y maduración

Inicialmente, las partículas inmaduras son formadas en lumen del RE. Esas partículas contienen a las proteínas E, prM, C y membrana lipídica. Posteriormente el prM es cortado en la red del Trans Golgi Network (TGN) dando como resultado una partícula viral madura. Las partículas subvirales también son producidas en el RE, pero sólo contienen a las proteínas E y prM, carecen de cápside y RNA⁺, haciendo de estas partículas no-infecciosas. El virus maduro y las partículas subvirales son liberados del hospedero por exocitosis (Mukhopadhyay *et al.*, 2005) (fig. 4).

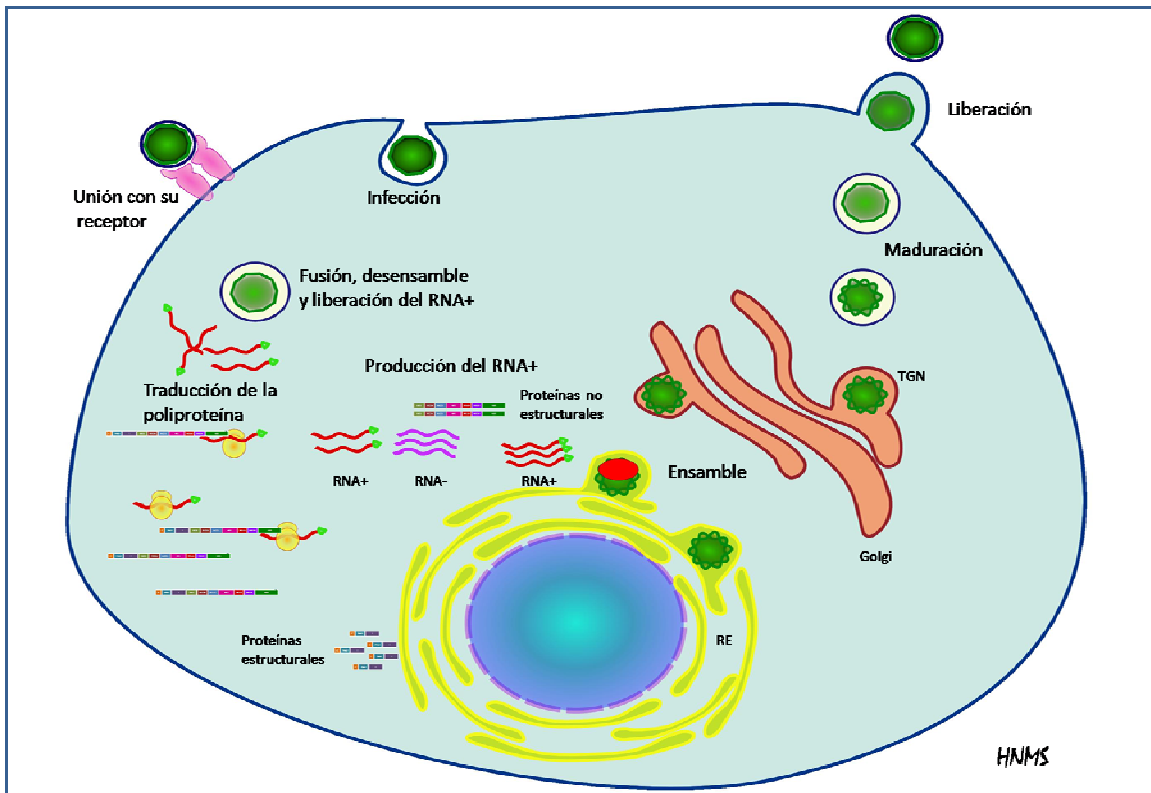


Figura 4. Ciclo de replicación del VD. El virus se une a la superficie de la célula hospedera a través de su receptor y posteriormente entra por endocitosis. La acidificación del endosoma genera cambios conformacionales en el virión, la fusión de la membrana viral con la celular y el desensamble de la partícula viral. El RNA+ es liberado en el citoplasma y es traducido en una sola poliproteína que es procesada co y post traduccionalmente por las proteasas virales y del hospedero para dar lugar a las 3 proteínas estructurales y las 7 proteínas no estructurales. El ensamble de los viriones se realiza en la superficie del RE cuando las proteínas estructurales y el RNA sintetizado de *novo* géman desde el lumen del RE. El resultado es una partícula no infecciosa la cual es transportada al TGN, finalizando en una partícula madura e infecciosa. Los virus maduros y los subviriones son liberados por exocitosis (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

I.4. Manifestaciones clínicas

La infección por VD genera una entidad patológica cuyas manifestaciones clínicas varían en severidad, que pueden ir desde la fiebre del dengue (FD) o dengue clásico donde origina fiebre, leucopenia, cefalea, dolor retro orbital, mialgias, artralgias y exantema hasta la fiebre hemorrágica o dengue hemorrágico (DH) que es caracterizado por un incremento en la permeabilidad vascular, hemorragias, trombocitopenia, coagulopatías, hipovolemia, hipotensión (OMS, 1997), edema cerebral, excreción de productos tóxicos, daño hepático fulminante y alteraciones en el sistema nervioso central (SNC) (Muzaffar *et al.*, 2006). Finalmente, la complicación más grave es el síndrome de choque por dengue

(SCD) donde se presenta frío, hipotensión, pulso rápido, piel húmeda y es potencialmente fatal (OMS, 1997).

Los monocitos/ macrófagos infectados pueden activar mecanismos efectores para producir linfocinas vasoactivas que causa el daño endotelial y eventualmente al DH/SCD (Zihua *et al.*, 2007).

I.5. Susceptibilidad y severidad de la infección

Se ha propuesto que la susceptibilidad y la severidad de la infección por VD varían con respecto a la edad de los individuos; sin embargo, esta relación aun no ha sido cuantificada (Egger *et al.*, 2007). De acuerdo a los reportes epidemiológicos de la Secretaría de Salud de México, los niños y adultos jóvenes tienen mayor incidencia a la infección por VD (fig. 5) (SS de México, 2009). Hay estudios realizados en comunidades infestadas por *A. aegypti*, como el estado de Colima en donde se ha determinado que el riesgo relativo de adquirir la infección es independiente de la edad, el sexo o el nivel socioeconómico (Espinoza *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha propuesto que la edad es un factor importante en la determinación del riesgo relativo para la severidad de la enfermedad después de una infección primaria, encontrándose que los adultos tienen más probabilidad de presentar una segunda infección (Egger *et al.*, 2007).

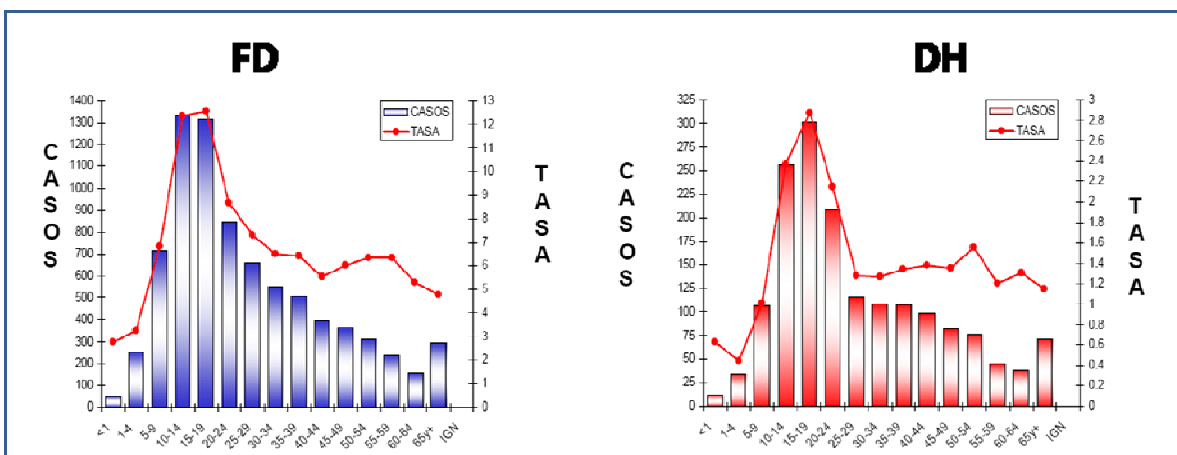


Figura 5. Casos confirmados de dengue por grupos de edad en México durante el 2009 (SS de México, 2009).

I.6. Respuesta inmunológica

Los anticuerpos actúan como un arma de importancia inmunológica en la prevención y el control de muchas infecciones. Aquellos que son específicos contra un virus pueden neutralizarlo evitando la infección viral, promoviendo la lisis celular uniéndose a las células infectadas por opsonización y activando la cascada del complemento (Pupo *et al.*, 2004).

Sin embargo, los anticuerpos específicos para un serotipo de VD pueden incrementar o “amplificar” la replicación viral de otro serotipo de VD diferente al de la primera infección, este es un efecto hipotético conocido como *Amplificación de la infección Dependiente de Anticuerpos (ADA)* (fig. 6) mismo que se cree desempeña un papel importante en la patogénesis de DH y del SCD. El DH y el SCD tienen una respuesta inmune secundaria como factor de riesgo. La reemergencia de más de un serotipo y la circulación de éstos simultáneamente, incrementan el riesgo de la infección secuencial. En particular, fenómeno ADA sucede cuando el virus infectante forma un complejo con anticuerpos no neutralizantes, a través de los receptores FcγR en las células fagocíticas mononucleares favoreciendo la infección de estas células. La replicación del virus induce a las células infectadas a liberar mediadores vasoactivos que producen permeabilidad vascular y manifestaciones hemorrágicas y clínicas típicas del DH (Pupo *et al.*, 2004).

Se ha observado que anticuerpos IgM e IgG para el VD pueden presentar reactividad cruzada entre los serotipos del virus dengue y otros flavivirus, generando que se active el complemento, lo que puede contribuir con la disminución del número de plaquetas y la trombocitopenia observada en estos pacientes (Falconar, 1997).

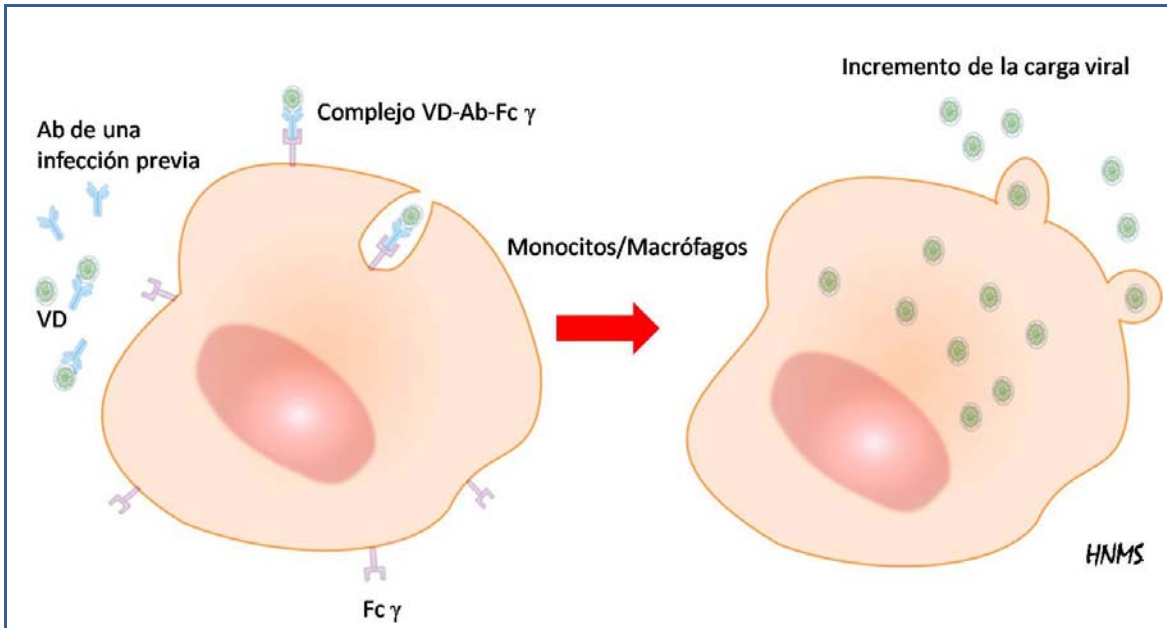


Figura 6. Modelo de la Amplificación Dependiente de Anticuerpos para la replicación viral. El anticuerpo (Ab) requiere ser heterotípico para la replicación del virus. Durante una infección primaria por VD de cierto serotipo se forman Ab neutralizantes en el hospedero. Durante una infección heterotípica subsecuente por VD, estos Ab no pueden neutralizarlo y en su lugar el complejo Ab-VD se une a los receptores Fc ($Fc\gamma R$) de los monocitos y macrófagos que circulan, de tal manera que facilita la entrada de la célula. El resultado final es un aumento en la replicación viral conduciendo a una enfermedad más severa como DH y SCD (Whitehead *et al.*, 2007).

I.7. Epidemiología

El vector del VD es el mosquito *A. aegypti*, pero *A. albopictus* y *A. polynesiensis* pueden ser también vectores importantes dependiendo de la localización geográfica. Por ejemplo, se encontró que *A. albopictus* en ocasiones trasmite el VD en Tailandia, Isla Samoa, India, Singapur y México (Malavige *et al.*, 2004). La extensa distribución geográfica de la infección por VD correlaciona con la distribución del mosquito vector e incluye las zonas tropicales y subtropicales del mundo (fig. 7), en las cuales además se encuentran las naciones con mayores carencias económicas, de salud y con el mayor aumento en la densidad poblacional (Guzmán *et al.*, 2002).

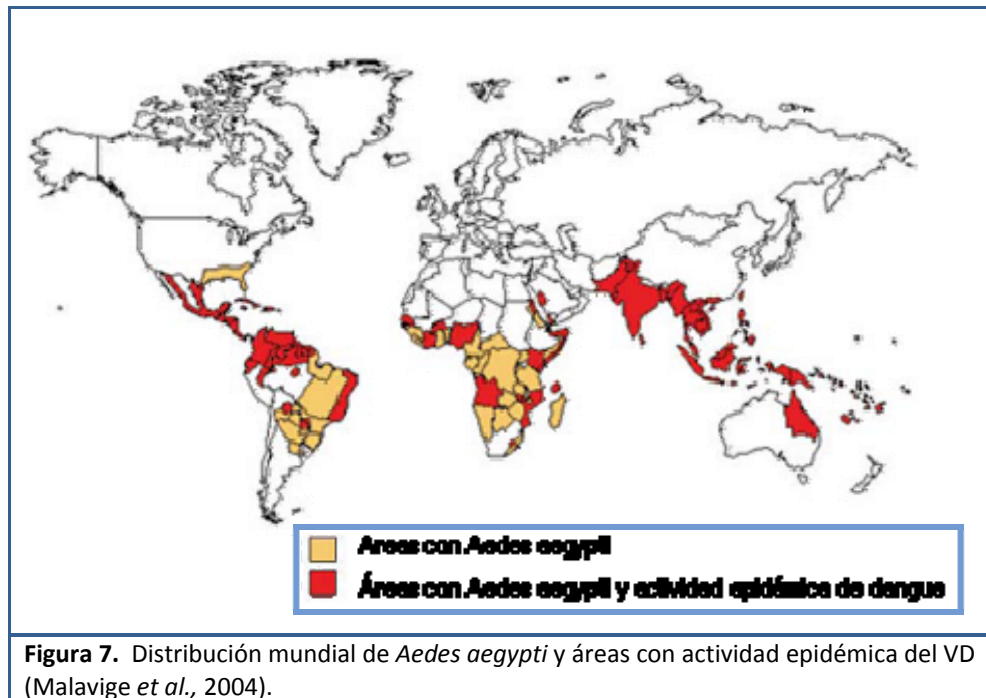
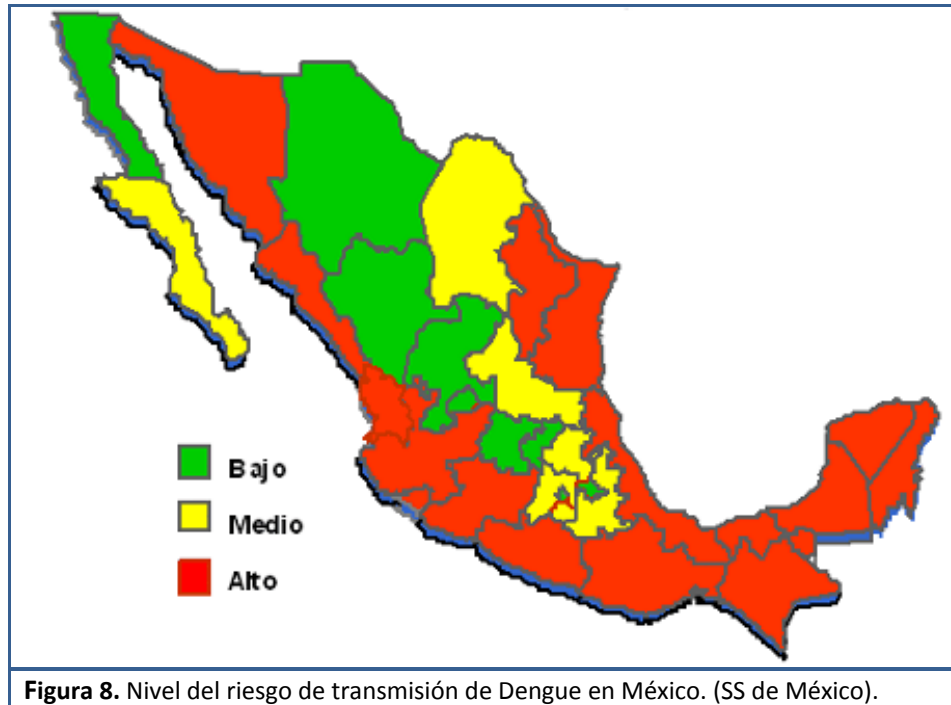


Figura 7. Distribución mundial de *Aedes aegypti* y áreas con actividad epidémica del VD (Malavige *et al.*, 2004).

Se conoce poco acerca del mantenimiento del VD en las poblaciones durante los periodos de interepidemia, los cuales se caracterizan por la sequedad del terreno. Se ha descrito que el virus sobrevive en estos periodos en los huevos de *A. aegypti*, pero la transmisión transovárica es aparentemente ineficiente y no se ha identificado como un reservorio para el VD en áreas urbanas (Platt *et al.*, 2000).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) la transmisión del VD ha aumentado significativamente a nivel mundial (Maguina *et al.*, 2005). En México la Secretaría de Salud encontró que el número de casos incrementa año con año y durante el 2009 se reportaron 31836 casos, de los cuales 25929 son casos confirmados de FD y 5907 son casos confirmados de DH. Los estados con mayor riesgo para la enfermedad son: Veracruz, Colima, Tamaulipas, Guerrero, Nuevo León, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Sinaloa, Nayarit, Campeche, Tabasco, Sonora, Quintana Roo, Michoacán y Jalisco (fig. 8) (SS de México, 2009).



Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Dengue es considerado como la segunda infección re-emergente más importante entre las enfermedades tropicales y subtropicales. Así mismo manifiesta que, más de 100 países reportan casos de Dengue y más de dos quintas partes de la población mundial viven en áreas con riesgo potencial de adquirir la infección; se ha estimado que cada año se presentan de 50 a 100 millones de casos de FD, de 250 a 500 mil casos de DH y alrededor de 25 mil personas fallecen por ésta enfermedad anualmente (PAHO, 2007; Gibbons y Vaughn, 2002).

I.8. Reservorios naturales y modelos de estudio del dengue

A pesar de la morbilidad mundial causada por la infección con VD, ni la patogenia, ni la transmisión de este virus han sido comprendidas a la perfección dado que los humanos, así como los primates no humanos y los mosquitos son los únicos hospederos y reservorios naturales del VD, conocidos hasta el momento (Henchal *et al.*, 1990); además, únicamente los humanos desarrollan las manifestaciones clínicas propias de la infección por VD. (Bente *et al.*, 2006).

El estudio de esta enfermedad ha sido obstaculizado por la carencia de modelos tanto *in vitro* como *in vivo*; aunque tradicionalmente se han utilizado los modelos de: primates no humanos, monos, ratones neonatos, ratones inmunocompetentes, ratones inmunocomprometidos y líneas celulares (Bente *et al.*, 2006). Pese a la cercanía que existe entre los humanos y otros primates, estos últimos no muestran signos de la enfermedad después de la inoculación con el VD. Algunos de los primates no humanos más extensamente usados dan únicamente información acerca de la inocuidad de las vacunas; pero no hay buenos ensayos de eficacia de la vacuna contra el dengue, puesto que la inoculación del virus en monos da una baja y transitoria viremia y no otros signos de los síntomas. Por lo tanto, los modelos de virulencia y enfermedad han tenido que ser más complejos e incluye el uso de los cultivos primarios de células humanas (Rico-Hesse, 2007).

El modelo de ratón inmunocompetente más prometedor es la cepa de ratón A/J; la cual presenta trombocitopenia, incremento del hematocrito, decremento en los leucocitos, parálisis, y es más sensible a la infección con VD que los ratones de la cepa Balb/c o B6 (Bente *et al.*, 2006).

El modelo de ratón inmunocomprometido son los ratones knockout AG129, los cuales carecen de interferón (INF- α/β) y del gen del receptor de IFN γ ; éste modelo fue propuesto por que los ratones deficientes de IFN muestran incremento en la susceptibilidad a la infección con VD y hay evidencia de que los interferones α , β y γ pueden estar involucrados en la patogénesis desarrollada en los humanos. La inoculación de estos ratones con VD2 causa parálisis de las extremidades posteriores, ceguera y posteriormente la muerte (Bente *et al.*, 2006).

La identidad evasiva de los reservorios virales provee una fuente continua de especulaciones y se ha sugerido que los quirópteros pueden ser reservorios naturales de muchas enfermedades (Kunz, 1982).

1.9 Quirópteros

Los quirópteros se dividen en dos grandes grupos: suborden Microchiroptera y suborden Megachiroptera, los cuales después de los roedores son los mamíferos más abundantes, diversos y dispersos geográficamente (Tabla 1) (Calisher *et al.*, 2006).

El suborden Megachiroptera está representado por la familia Pteropodidae con alrededor de 186 especies. A esta familia se le conoce mejor por el sobrenombre de zorros voladores, debido a la semejanza de su rostro con los zorros, además de que se orientan y comunican por medio de la visión y los sonidos, y no mediante la ecolocación. Son especies de tamaño grande, algunas de las cuales pueden pesar más de un kilogramo y tener una envergadura mayor a un metro. Existen numerosas especies que se alimentan de frutos, néctar y polen. Se distribuyen exclusivamente en las regiones tropicales de Australia, Asia y África.

El suborden Microchiroptera, esta representado por aproximadamente 17 familias y 760 especies que se comunican principalmente por medio de ecolocación y por lo general son de tamaño pequeño. Poseen rostro simple u ornamentado con membranas, verrugas o pliegues y los ojos son generalmente pequeños. Dependiendo del tipo de alimentación pueden tener rostro alargado o corto. El pelaje de estos murciélagos muestra una gran variación en cuanto a color y tamaño. Varias de estas especies tienen líneas en el dorso (ej. *Chiroderma villosum*), en el rostro (ej. *Dermanura spp.*), manchas distintivas en el dorso (ej. *Euderma maculatum*) o sobre los hombros (ej. *Sturnira lilium*), mientras que su coloración varía desde el blanco (ej. *Diclidurus albus*) hasta el negro (ej. *Molossus rufus*) pasando por el amarillo oro (ej. *Noctilio leporinus*), anaranjado (ej. *Rhogeessa spp.*), rojo (ej. *Lasiurus blossevilli*) y moreno o gris (ej. *Balantiopteryx plicata*). Ciertas especies muestran coloración discontinua como las líneas faciales de los *Artibeus sp.* o las manchas sobre los hombros o las bases de las orejas de *Sturnira* y *Centurio*, lo que actúa como una coloración disruptiva al romper el entorno de la silueta del

murciélago contra el fondo sobre el cual los rayos de luz reflejan la forma del animal (Romero-Almaraz *et al.*, 2006).

Tabla 1. *Numero de especies de quirópteros, por suborden, familias y género (Calisher et al., 2006).*

Suborden y familia	No. de géneros	No. de especies
Megachiroptera, Pteropodidae	42	186
Microchiroptera		
Craseonycteridae	1	1
Emballonuridae	13	51
Furipteridae	2	2
Hipposideridae	9	81
Megadermatidae	4	5
Molossidae	16	100
Mormoopidae	2	10
Mystacinidae	1	2
Myzopodidae	1	1
Natalidae	3	8
Noctilionidae	1	2
Nycteridae	1	16
Phyllostomidae	56	160
Rhinolophidae	1	77
Rhinopomatidae	1	4
Thyropteridae	1	3
Vespertilionidae	47	407

Si los microquirópteros y los megaquirópteros representan un grupo monofilético natural o si los megaquirópteros representan un vestigio del linaje primate sin relación con el linaje de los microquirópteros es aún desconocido; sin embargo hay características compartidas en las estructuras neurales relacionadas con la visión entre los megaquirópteros y los primates que no han sido encontradas con ningún otro grupo de mamíferos (Mindell *et al.*, 1991).

La familia Phyllostomidae (murciélagos con hoja nasal) es exclusiva de América y la más diversa en las regiones tropicales de este continente. Algunos de sus representantes tienen una distribución altitudinal muy amplia que varía desde el nivel del mar hasta más de 3000 metros sobre el nivel del mar (msnm). En México esta familia representada por cinco subfamilias (Macrotinae, Micronycterinae, Desmodontinae, Vampirinae y

Phyllostominae), 35 géneros (*Macrotus*, *Glyphonycteris*, *Micronycteris*, *Trinycteris*, *Desmodus*, *Diaemus*, *Diphylla*, *Chrotopterus*, *Trachops*, *Vampyrum*, *Lonchorchina*, *Macrophyllum*, *Mimon*, *Phylloderma*, *Phyllostomus*, *Tonatia*, *Anoura*, *Choeroniscus*, *Choeronycteris*, *Glossophaga*, *Hylonycteris*, *Leptonycteris*, *Lichonycteris*, *Musonycteris*, *Carollia*, *Centurio*, *Chiroderma*, *Dermanura*, *Enchisthenes*, *Platyrrhinus*, *Sturnira*, *Uroderma*, *Vampyressa*, *Vampyrodes* y *Artibeus*) y 56 especies.

En el presente estudio empleamos a los murciélagos *Artibeus sp.* (fig. 9). Sus características físicas y de distinción son: orejas amplias, triangulares y separadas, la hoja nasal está bien desarrollada y presenta un racimo de glándulas sebáceas, el labio inferior tiene una verruga central con un cerco más pequeño de verrugas. El labio superior tiene glándulas sebáceas holócrinas, la piel dorsal varía de gris cenizo a marrón cenizo, las alas son amplias y de color gris oscuro, no presentan cola externa, la membrana interfemorales es estrecha y desnuda y presenta un par de franjas blancas en la cara (Ortega y Castro-Arellano, 2001).



Figura 9. Fotografía de murciélagos *Artibeus sp.* Estos murciélagos fueron capturados en Cocoyoc, Morelos en mayo del 2008. Foto Álvaro Aguilar Setién.

Sus hábitos alimenticios están basados en frutas pero en ocasiones consumen algunas partes florales (Ortega y Castro-Arellano, 2001). Su ciclo reproductivo ha sido estrechamente relacionado con la disponibilidad de los frutos que consume. Estos murciélagos pueden vivir en una gran cantidad de comunidades vegetales como son las selvas bajas caducifolias, los bosques de niebla, sabanas y selvas altas perennifolias, entre otras (Flores-Martínez *et al.*, 2000). Se distribuyen geográficamente desde el centro hasta el sur de México, también se localizan en Ecuador, Venezuela, Trinidad y Tobago, Antillas, Florida, Amazonia Brasileña, oeste de Colombia, Costa Rica, Ecuador, noroeste de Perú y suroeste de Argentina (Ortega y Castro-Arellano, 2001; Burton *et al.*, 2004).

La fragmentación del hábitat aunado a los cambios físicos y biológicos que este genera, ha propiciado la dispersión de especies silvestres. Los murciélagos *Artibeus sp.* son un elemento predominante en las comunidades en donde están presentes. Las zonas urbanas son ambientes que pueden ser utilizados ampliamente por dichos animales y aunque no se ha hecho un estudio formal para evaluar este aspecto, se sabe que los murciélagos del género *Artibeus* interactúan indirectamente con las poblaciones humanas, por que se introducen de manera frecuente y en números abundantes a parques, jardines y huertos, donde polinizan las flores y comen los frutos de especies que también pueden ser consumidas por los humanos. (Comunicación personal, López W. Ricardo).

1.10. Relación de los quirópteros y enfermedades emergentes

La mayoría de las enfermedades emergentes del hombre son el resultado de la exposición a patógenos zoonóticos; es decir, a aquellos que se transmiten de forma natural entre el hombre y los animales, con o sin el establecimiento de un nuevo ciclo en el hombre. La fauna silvestre juega un papel fundamental en este tipo de emergencia proporcionando una enorme reserva de agentes zoonóticos desconocidos con anterioridad. En los últimos tiempos, los episodios de emergencia infecciosa o parasitaria en el hombre se han hecho cada vez más frecuentes, implicando en casi todos los casos, a

agentes zoonóticos o patógenos que han dado el salto desde su hospedero habitual afectando al ser humano súbitamente (Goyache-Goñi, 2000).

La deforestación, degradación ambiental y la introducción de especies exóticas, de animales y de plantas, tienen un papel significativo en la emergencia de nuevas enfermedades. Las especies amenazadas por la erosión de sus hábitats pueden ser particularmente sensibles a las enfermedades (Dobson, 2005).

Las infecciones típicas incluyen al hospedero, al agente causal de la enfermedad y al ambiente. Un hospedero es una especie (s) que puede mantener la enfermedad. La especie que es la residencia natural del agente causal de la enfermedad es denominado como “reservorio” (ej. mosquito, ave o mamífero). La transmisión del agente infeccioso desde el hospedero puede ser vertical (transmisión lactogénica o trasplacental) u horizontal (de individuo a individuo en una población). Algunas enfermedades tienen distribución mundial, independientemente de la zoogeografía actual de cualquier posible hospedero o reservorio, mientras que otras están ocultas en nichos aislados, restringidas por la relación hospedero-agente-ambiente. Otras especies animales no reservorios pueden ser infectadas accidentalmente mediante el contacto con la especie que funge como reservorio primario (Dobson, 2005).

Los quirópteros como grupo facilitan el papel evolutivo del patógeno en la propagación. Todos los murciélagos vuelan, algunos son abundantes y distribuidos ampliamente y muchos son altamente gregarios. En teoría, esos son los atributos clave que pueden contribuir a incrementar la incidencia de una enfermedad en comparación con otros mamíferos. También estas características pueden hacer de los quirópteros particularmente sensibles a enfermedades. Se sabe que 25 familias de virus tienen la capacidad de infectar a vertebrados, diez de esas familias han sido asociadas con los quirópteros y la mayoría son virus de RNA (Kunz, 1982).

Se ha reportado la presencia de 66 diferentes virus que afectan a los humanos en 74 especies de quirópteros; entre los que se encuentran el virus del Marbug, el ébola y el de la rabia por mencionar algunos (Towner *et al.*, 2007; Calisher *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2005) (Ver anexo II).

Un ejemplo de lo anterior, es lo ocurrido en 1999 en Malasia donde el virus Nipah que pertenece a la familia de los paramyxovirus, generó encefalitis en personas que en su mayoría trabajaban en la industria porcina y causó 105 muertes humanas. Pronto se descubrió su relación con los murciélagos frugívoros y con los cerdos que eran infectados con el virus a través de la ingestión de los restos de fruta dejados por los murciélagos portadores, esto generó el decaimiento de la industria porcina en aquel país ya que se sacrificaron cerca de 800,000 cerdos (Enserink, 2000). Observaciones similares fueron encontradas en el sitio de brote del virus Hendra en Queensland, Australia (Dobson, 2005).

Otro ejemplo, es el coronavirus que causa el Síndrome Severo Respiratorio Agudo (SARS) donde los murciélagos ya han sido reconocidos oficialmente como reservorios naturales. La emergencia de este patógeno en China durante 2002-2003 a causa de los murciélagos tuvo estragos en la economía del sur de Asia (Dobson, 2005).

Un paso clave en la determinación de la amenaza impuesta por los nuevos patógenos, es identificar la ruta a lo largo de la cual se transmiten desde su reservorio a los nuevos hospederos, como el ganado o seres humanos. En el caso de los patógenos que usan murciélagos como reservorio, se ha observado una ruta en común. Muchos murciélagos son frugívoros y cumplen sus necesidades energéticas ingiriendo las frutas, pero en lugar de tragarlas las mastican para extraer los azúcares y componentes de alta energía, de tal forma que escupen las frutas parcialmente digeridas y caen a la tierra. Otra especie animal puede ingerir estos remanentes de frutas y puede infectarse con las partículas virales presentes en los residuos de saliva del murciélago (Dubson, 2005).

No debe olvidarse que una buena parte de lo que se entiende como fauna silvestre es en realidad “peri doméstica”, en razón de la proximidad e interconexión de sus áreas de distribución natural con zonas habitadas por el hombre. Esta situación facilita la influencia humana sobre estos animales y por tanto están sujetos con mayor probabilidad a alteraciones medioambientales originadas por la población humana, el ganado doméstico y hasta en algún caso, los animales de compañía (Goyache-Goñi, 2000).

I.10. Los quirópteros y el Virus Dengue

O’ Connor y Rowan (1955) detectaron anticuerpos contra el virus dengue en una pequeña población de zorros voladores del suborden megaquiroptera de Australia (3/17). Price (1978) reportó la presencia de anticuerpos que inhiben la hemaglutinación del VD en 126 de 857 murciélagos de diversas especies en Trinidad. Zhang *et al.*, (1998) detectaron el VD mediante RT-PCR en el cerebro de murciélagos colectados en áreas endémicas de FD en la isla de Hainan. El resultado positivo fue demostrado en 20 de 35 murciélagos analizados, con un índice de positividad del 57.14%, por ensayos de inmunofluorescencia indirecta encontraron la presencia del antígeno del VD2 en 16 (80%) cerebros de de los 20 murciélagos analizados. Platt *et al.*, (2000) detectaron actividad neutralizante del VD en 15 (23.8%) de 63 sueros de murciélagos entre los que se encontraban murciélagos *Artibeus sp.* colectados en Costa Rica y Ecuador.

Posteriormente, nuestro grupo de trabajo encontró anticuerpos contra el VD y la presencia de la proteína no estructural NS1 en suero en tres especies de insectívoros *Myotis nigricans* (4 positivos/12 examinados), *Pteronotus parnellii* (3/19), y *Natalus stramineus* (1/4) y un frugívoro *Artibeus jamaicensis*. La presencia del VD2 se encontró en dos especies de frugívoros, *A. jamaicensis* (2/9) y *Carollia brevicauda* (1/2), y una especie de insectívoros *M. nigricans* (1/11). Las capturas de los murciélagos se llevaron a cabo en los estados de Colima, Jalisco y Veracruz, particularmente, en localidades donde en ese momento había fuerte actividad epidémica de dengue. Esta la primera evidencia que demuestra la presencia del VD en murciélagos de México (Aguilar-Setién *et al.*, 2008).

El último estudio realizado a este respecto se hizo en dos localidades de la Guayana Francesa. La primera localidad fue un bosque rodeado por áreas urbanas donde el dengue es endémico. La segunda localidad es un bosque donde la enfermedad no ha emergido aun. Se capturaron 616 especímenes de mamíferos, en el hígado y/o suero de 92 especímenes se detectó el RNA de los cuatro serotipos del virus por RT-PCR: Rodentia (33 positivos/146 probados), Marsupialia (40/318), y Chiroptera (19/152). El análisis en la secuencia de una porción de la cápside y premembrana viral revelaron que los serotipos VD1, VD2, VD3 y VD4 tuvieron un 92.6%, 89%, 95% y 95.8% de igualdad, respectivamente, con los serotipos circulantes durante los mismos periodos en casos reportados en humanos. Especialmente, en cuanto al VD2, se encontraron cepas con 99% de igualdad con las responsables de un acontecimiento epidémico en humanos en la Guayana Francesa durante las sesiones de captura, sugiriendo que los mamíferos silvestres que habitan en la periferia de las áreas urbanas pueden ser infectados por las cepas humanas. Este último antecedente demuestra que los mamíferos silvestres pueden ser infectados por el VD. La pregunta es si los mamíferos pueden mantener el VD en ciclos enzooticos y si pueden jugar un papel en la re-emergencia en las poblaciones humanas. (de Thoisy *et al.*, 2009).

Estos antecedentes sugieren que los murciélagos pueden ser reservorios para el VD, proporcionando una pista importante para el control eficaz de las epidemias de FD en áreas endémicas (Zhang *et al.*, 1998).

II. JUSTIFICACIÓN

El entendimiento de la patogénesis causada por el VD, se ha dificultado puesto que únicamente los humanos desarrollan los padecimientos clínicos propios de la enfermedad. Además, las únicas especies que tienen la capacidad de replicar el virus en la naturaleza, hasta la fecha comprobado, son los humanos, los primates y los mosquitos del género *Aedes*.

Los agentes zoonóticos producen, como ya se ha citado anteriormente, infecciones en animales y humanos, por lo que el conocimiento de los reservorios no-humanos (principalmente animales silvestres) es esencial para entender la epidemiología y posible control de este tipo de enfermedades en el hombre. La búsqueda de nuevos patógenos zoonóticos ha llegado a ser una parte de la estrategia que se sigue para contrarrestar la amenaza de las enfermedades re-emergentes humanas.

Se ha detectado la presencia de anticuerpos contra VD y al VD en diferentes especies de murciélagos de México y otros países (Aguilar-Setién *et al.*, 2008; de Thoysi *et al.*, 2009; O' Connor y Rowan, 1955; Price, 1978; Zhang *et al.*, 1998; Platt *et al.*, 2000) , sin embargo, aun no se ha determinado si estos animales tienen la capacidad de replicar al virus, por lo anterior, la aportación del presente trabajo es demostrar que cultivos primarios de células de murciélagos *Artibeus sp.* son susceptibles a la infección y pueden replicar el VD. Así eventualmente, esto podría brindar una idea general acerca de la susceptibilidad de los murciélagos *Artibeus sp.* como organismos que pueden replicar el virus y probablemente representar algún papel en la epidemiología de la enfermedad.

Además, los murciélagos *Artibeus sp.* reúnen muchas características por las que podrían ser considerados como un vector de alto riesgo. Como es: presentan una amplia distribución en la región Tropical y Neotropical, son un elemento predominante en las comunidades en donde están presentes, se introducen de manera frecuente y en números abundantes a las áreas urbanas y suburbanas, son murciélagos frugívoros y sus desechos

pueden ser ampliamente aprovechados por otros animales silvestres. Por último, es necesario señalar que en nuestro país poco se sabe de las enfermedades transmitidas a través de la fauna silvestre, en especial de los murciélagos, siendo este un trabajo pionero en ese aspecto.

III. OBJETIVO GENERAL

Determinar si los cultivos de fibroblastos y macrófagos de murciélagos *Artibeus sp.* son susceptibles a la infección por VD2.

IV. OBJETIVOS PARTICULARES

IV.1. Adaptar y cultivar los monocitos/macrófagos y fibroblastos procedentes de murciélagos *Artibeus sp.*

IV.2. Evaluar el nivel de infección con VD2 de los macrófagos derivados de monocitos de bazo y sangre periférica, así como de fibroblastos de oreja de murciélagos *Artibeus sp.* detectando a la proteína no estructural 1 (NS1) por medio de ELISA.

IV.3. Observar la presencia intracelular del VD en los macrófagos y fibroblastos para comprobar la entrada del virus a las células y su replicación intracelular por medio de inmunofluorescencia.

V. HIPÓTESIS

Debido a que se ha reportado la presencia de anticuerpos contra VD y el VD en murciélagos silvestres de México, y se ha demostrado en otras especies la susceptibilidad de los cultivos de macrófagos y fibroblastos al virus, entonces la infección *in vitro* de macrófagos y fibroblastos procedentes de estos animales es posible.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Virus Dengue.

La cepa de VD serotipo 2 empleada para los experimentos fue de Nueva Guinea “C” del (Bioseguridad ver Anexo I). La replicación del virus se realizó en la línea celular proveniente de intestino de mosquito *A. albopictus* C6/36.

VI.2. Anticuerpos.

Se utilizó el anticuerpo primario monoclonal 4G2 de ratón específico para los cuatro serotipos de virus (anti-proteína E del VD). Como anticuerpo secundario se empleó un conjugado de anticuerpos contra IgG de ratón acoplado FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Sigma Inmuno Chemicals, F-6257). Para los ensayos de doble tinción e identificación de CD14 se empleó un anticuerpo anti-CD14 humano acoplado a FITC (eBioscience, Clona 61D3) y para el VD2 se utilizó también el anticuerpo primario monoclonal 4G2 anti-proteína E del VD y como anticuerpo secundario un conjugado anti-IgG de ratón acoplado a TR (Rojo Texas) (Santa Cruz Biotechnology, S-2781).

VI.3. Captura de murciélagos y muestreo.

Se capturaron 8 murciélagos machos y adultos. Las capturas se realizaron en Cocoyoc en el estado de Morelos (Bioseguridad, ver Anexo III). En cada área de trabajo se colocaron de dos a cinco redes de niebla durante 4 horas. Las redes se colocaron entre los árboles de un jardín donde por las noches se alimenta una colonia de animales. El número de permiso de SEMARNAT bajo el que se realizó la captura es FAUT – 0124 concedido al Dr. Ricardo López Wilchis.

Los animales se colocaron en una trampa de cilindro para murciélagos y se trasladaron al bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, donde se identificaron taxonómicamente hasta género bajo la supervisión del Dr. Ricardo López Wilchis. Originalmente los murciélagos capturados fueron asignados a dos categorías taxonómicas: *Artibeus jamaicensis* y *A. intermedius*; pero debido a que varios autores cuestionan la

validez de *A. intermedius* (Redondo *et al.*, 2008), en este trabajo todos son referidos como *Artibeus sp.*

Todos los animales fueron mantenidos en cautiverio durante el tiempo mínimo siguiendo los métodos éticos recomendados por el “Animal Care and Use Committee” (1998), en forma general tratando de darles espacio suficiente, dieta y peculiaridades de su comportamiento. La dieta proporcionada a los murciélagos consistió en una mezcla de cereales (trigo, avena, arroz y maíz), a la que se le adicionó mango, papaya, manzana, guayaba y naranja en cubos pequeños (*ad livitum*) y complementado con vitaminas para aves Vitafort-A®.

VI.4. Infección *in vitro* de cultivos con VD2

VI.4. 1. Cultivos e infección de macrófagos derivados de monocitos de bazo y de sangre periférica de *Artibeus sp.*

Se emplearon 3 murciélagos *Artibeus sp.* adultos, machos. Cada uno de ellos se anestesió con 20 µL de Ketamina:Xilacina (1:1). Posteriormente se extrajo la sangre periférica por punción cardiaca con una jeringa previamente cargada con 2 mL de Alsever con gelatina al 3% (glucosa 2.05%, citrato de sodio 0.8%, ácido cítrico 0.055%, cloruro de sodio 0.42%, agua bidestilada y gelatina 3 %) y se mezcló por inversión para después incubar a 37 °C durante una hora colocando la jeringa en posición vertical con la aguja hacia arriba para que se separaran dos fases (en el precipitado se encontraron los eritrocitos y en el sobrenadante los leucocitos). Después de la incubación se dobló la aguja en un ángulo de 45° con ayuda del capuchón sin perder la posición vertical de la jeringa para recuperar el sobrenadante, al que se le adicionaron 10 mL de solución Alsever para hacer un lavado y se centrifugó a 330 x g por 5 minutos. El paquete de leucocitos se re-suspendió en medio RPMI con 10% de Suero Fetal Bobino (SFB) previamente inactivado a 56°C durante 30 min. Por otro lado, se extrajo el bazo y se macero sobre una coladera de células Falcon®, el macerado se paso a un tubo cónico de 50 mL al cual se le agregaron 30 mL de PBS 1X pH 7.4 para después centrifugar a 330 x g por 5 minutos. El paquete celular

se re-suspendió en medio RPMI con 10% de SFB inactivado. Finalmente se mezclaron ambos paquetes celulares y se colocaron en 4 botellas de cultivo de 25 cm² con 5 mL de medio RPMI con 10% de SFB inactivado.

Después de 24 horas de incubación los macrófagos se adhirieron en la base de la botella de cultivo y se decantó el medio, se lavaron las células con 2 mL de PBS 1X pH 7.4, posteriormente se agregaron 3 mL de una solución con EDTA (EDTA 6 mM, PBS 1X pH 7.4 y 5% de SFB inactivado) para despegar las células adheridas y poder hacer un conteo de ellas.

Se colocaron 1 millón de células en 5 botellas Slide Flask®, se adicionó medio fresco y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación se agregó el VD2 a una *Multiplicidad de la Infección* (MOI) igual a 1 más 500µL de medio RPMI pH 7 con 10% de SFB inactivado y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después las células se lavaron 2 veces con PBS 1X pH 7.4 y se adicionaron 2 mL de medio RPMI pH 7 con 10% de SFB inactivado y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 0, 2, 3, 4, 5 días p-i. Como control positivo se utilizaron cultivos de macrófagos derivados de mocitos humanos extraídos de 4 mL sangre periférica, los cuales fueron inoculados con el VD2 a una MOI = 1 y se incubaron a las mismas temperaturas y tiempos; el control negativo fue cultivos de macrófagos derivados de monocitos de bazo y de sangre periférica de ratón y macrófagos derivados de monocitos de bazo y de sangre periférica de murciélago sin inoculo de VD2.

A los tiempos de 0, 2, 3, 4, 5 días post-inoculación (p-i), los portaobjetos se separaron de cada Slide Flask® donde se realizó la inoculación de los cultivos. Las células en los portaobjetos fueron lavadas 3 veces durante 3 minutos con 2 mL de PBS 1X pH 7.4. Las células se fijaron una solución de metanol-acetona (1:1) durante 10 min y se realizó una inmunofluorescencia indirecta para evidenciar la presencia del virus en los cultivos.

Para la inmunofluorescencia, las células se lavaron 3 veces con 4 mL de PBS-Tritón X100 al 0.2% durante 3 minutos. Tras la fijación-permeabilización, se hizo un bloqueo con 5mL de leche al 3% en PBS-Tritón X100 al 0.2% durante 45 minutos. Finalizado este tiempo se lavaron 3 veces con 4 mL PBS-Tritón X100 al 0.2% durante 3 minutos.

Posteriormente, se adicionó con el anticuerpo primario (anti-VD2) diluido 1:300 con PBS-Tritón X100 al 0.2% y leche al 1% para incubar durante 2 horas a 37 °C. Después las laminillas se lavaron 3 veces con 4mL de PBS-Tritón X100 al 0.2% durante 3 minutos. A continuación se agregó el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón acoplado a FITC) 1:300 diluido con PBS-Tritón X100 al 0.2% y leche al 1% y se incubó durante una hora a 37 °C. Por último se hizo un lavado con 4 mL de PBS 1X pH 7.4 durante 5 min. Se adicionaron algunas gotas de PBS-glicerina (1:1) con pH de 8.3 como líquido de montaje y se colocó un cubreobjetos. Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal y/o de fluorescencia.

Para hacer la determinación de la proteína viral NS1 se realizaron otros cultivos de macrófagos de 2 murciélagos *Artibeus sp.*, en los que se colocaron 1 millón de células adherentes en 4 botellas de cultivo de 25 cm², tal como se describió anteriormente. A cada botella se les adicionaron 5 mL de medio RPMI pH 7 con 10% de SFB inactivado y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Pasado este tiempo, se inocularon con el VD2 (MOI = 1) más 1.5 mL de medio RPMI pH 7 y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después, las células se lavaron 2 veces con 2 mL de PBS 1X pH 7.4 y se agregaron 5.5 mL de medio RPMI pH 7 con 10% de SFB inactivado y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Según lo tiempos sugeridos por Ludert *et al.* (2008), se tomaron 100 µL de sobrenadante de cada una de las botellas a los tiempos de 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas p-i. Como control positivo se utilizaron cultivos de 1 millón de macrófagos derivados de monocitos humanos extraídos de 4 mL sangre periférica, los cuales fueron inoculados con el VD2 a una MOI de 1 y se incubaron a las mismas temperaturas y tiempos; como control negativo se

emplearon cultivos 1 millón de macrófagos derivados de monocitos de bazo y de sangre periférica de ratón inoculados con VD2. Los sobrenadantes se almacenaron a -70 °C.

La determinación de la proteína no estructural NS1 se realizó utilizando el kit comercial Platelia™ Dengue Ag NS1 (Bio-Rad Laboratories, número de catálogo 72830). Todos los sobrenadantes se diluyeron a razón de 1:5 con agua inyectable y se realizó el inmunoensayo de acuerdo a las especificaciones propuestas por el fabricante.

VI.4.2. Cultivos e infección de fibroblastos de oreja de *Artibeus sp.*

Con la finalidad de homogenizar el acervo genético de los ensayos, se empleó un murciélago adulto *Artibeus sp.* macho, que fue anestesiado con 20 µL de Ketamina:Xilacina (1:1) y desinfectado en la oreja con el microbicida Estericide®. Con tijeras estériles se le disectó un segmento de oreja de aproximadamente 4mm² y se lavó 4 veces con medio mínimo RPMI-1640 (200 U/mL de penicilina 20⁻⁴ g/mL de estreptomycin, 20⁻⁴ g/mL de fungizon y 0.003g/mL de L-glutamina). El segmento se cortó en pequeños fragmentos sobre una caja de Petri (Moratelli *et al.*, 2002). Estos fragmentos se transfirieron a un tubo Falcon® de 50 mL que contenía 20mL de tripsina y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 210 x g por 2 minutos, el botón o paquete celular se colocó en una botella de cultivo de 25 cm² que contenía medio de cultivo completo (MEM GLASGOW, 100 U/mL de penicilina 10⁻⁴ g/mL de estreptomycin, 10⁻⁴ g/mL de fungizon y 0.003g/mL de L-glutamina), suplementado con 20% SFB. El cultivo se incubó a 37 °C y 5% de CO₂. En cuanto las células proliferaron se mantuvieron con MEM GLASGOW suplementado con 10% de SFB a 37 °C y 5% de CO₂. Este único cultivo se amplificó lo suficiente como para obtener 16 botellas de cultivo de poliestireno, Slide Flask® de 18x50 mm, dos de esas botellas se emplearon como control negativo. En las 14 botellas restantes una vez que se tuvo una monocapa confluyente de células, se decantó el medio y las células se lavaron con PBD pH 7.4 1X estéril, después se adicionó el VD2 a una MOI igual a 1 más 500µL de MEM GLASGOW sin SFB con pH 6.2 y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 1 hora. Pasado este tiempo se hicieron dos lavados

con 1 mL de PBS 1X, posteriormente se adicionaron 2 mL de MEM GLASGOW suplementado con 10% de SFB y se incubaron a 37 °C y con 5% de CO₂. Como control positivo se utilizaron cultivos de línea celular de riñón de hámster (BHK-21) infectados con el VD2.

Las células se fijaron con metanol-acetona (1:1) durante 10 min, a los 0, 3, 5, 7 y 9 días p-i y se realizó una inmunofluorescencia indirecta para evidenciar la presencia del virus en los cultivos como se describió anteriormente. El sobrenadante se almacenó a -70 °C para medir la proteína viral no estructural NS1 con el kit comercial Platelia™ (Bio-Rad Laboratories, número de catálogo 72830).

VI.4.3. Identificación de los monocitos de bazo y sangre periférica mediante citometría de flujo.

Los monocitos/macrófagos forman parte de la inmunidad celular innata y son células susceptibles al VD2 en los humanos. Estas células en humanos y ratones expresan el receptor CD14. A partir de lo anterior, se marcaron monocitos de murciélagos *Artibeus sp.* con un anticuerpo monoclonal anti-CD14-FITC humano, con el objeto de determinar si estas células expresan el receptor y lo pueden reconocer estos anticuerpos.

Para este ensayo, se anestesiaron con 20 µL de Ketamina:Xilacina (1:1), 2 murciélagos *Artibeus sp.* adultos machos. Posteriormente se extrajo la sangre periférica por punción cardíaca y el bazo, para obtener los paquetes de leucocitos de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. Se mezclaron ambos paquetes celulares y se re-suspendieron en 500 µL de PBS-BSA-EDTA (1X-0.2%-2mM). Las células se distribuyeron en 3 tubos tipo eppendorf de 1.5 mL. Un tubo fue etiquetado como control negativo, otro como CD14-FITC y el último fue el control de isotipo.

Se añadió el anticuerpo anti-CD14 humano acoplado a FITC diluido 1:100 y el control de isotipo en el tubo correspondiente y se incubaron 20 minutos a 4°C. Pasado este

tiempo de incubación se lavó con 500 μ L de PBS-BSA-EDTA (1X-0.2%-2mM) y se centrifugó a 590 x g durante 8 minutos. Finalmente se fijó con 35 μ L de paraformaldehído al 2%. Se leyeron las muestras en el citómetro de flujo FACS-SCALIBUR del centro de instrumentos del Hospital de Especialidades del CMN-Siglo XXI, IMSS.

VII. RESULTADOS

VII.1 Infección de los fibroblastos de oreja de murciélagos *Artibeus sp.* y detección del virus con inmunofluorescencia indirecta.

De la cinética de infección de los fibroblastos de murciélago se encontró, por la técnica de inmunofluorescencia que desde el día 0 y hasta el día 9 no se observó fluorescencia; por lo que se determinó que los fibroblastos de oreja de murciélago no son susceptibles al VD2 adaptado a células de insecto C6/36 (fig. 10). Los estudios se realizaron por triplicado. Al no encontrarse la presencia de virus por inmunofluorescencia, las pruebas subsecuentes fueron omitidas.

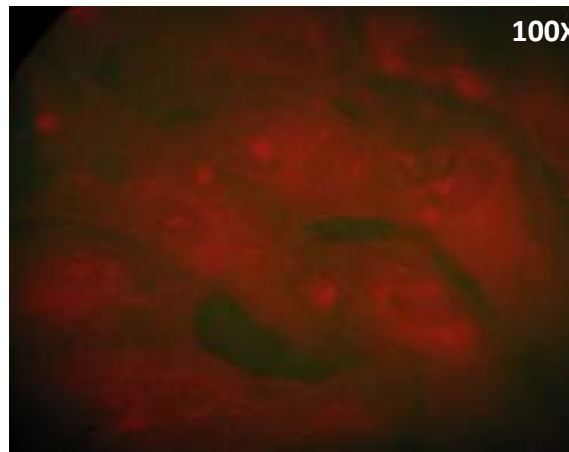


Figura. 10. Fibroblastos de murciélagos *Artibeus sp.* Inmunofluorescencia 9 días post-inoculación. Se puede observar que no hay fluorescencia específica que este indicando infección de las células.

VII.2 Infección de los macrófagos derivados de monocitos de bazo y sangre periférica de *Artibeus sp.*

En el ensayo de infección de los monocitos/macrófagos de murciélago, se usaron dos controles negativos, uno de células de murciélago sin inoculo (fig.11a) y otro de células de ratón con el inoculo (11b). La figura 11 no revela la presencia del VD2.

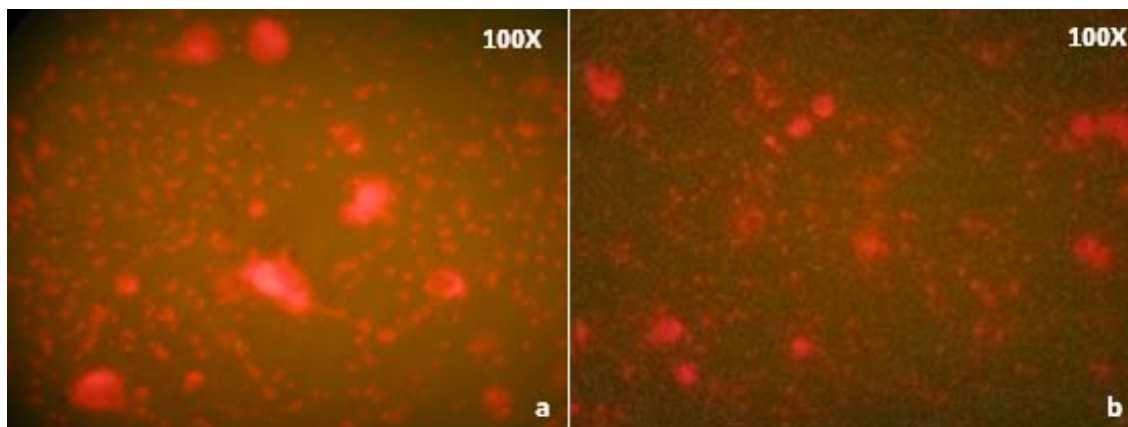


Figura. 11. Controles del ensayo de infección de macrófagos de murciélago con VD2. **a**, macrófagos de murciélagos *Artibeus sp.* sin inoculo de VD2. **b**, macrófagos de ratón inoculados con VD2. En ningún caso se observa fluorescencia.

En la figura 12 se muestra la cronología de las inmunofluorescencias a los tiempos 2, 3, 4 y 5 días p-i de los macrófagos de murciélago y humano (control positivo). Como puede observarse hay un incremento de la fluorescencia a medida que pasa el tiempo.

En la tabla 2 se expresa la intensidad de fluorescencia (valorada objetivamente por tres personas) encontrada en los cultivos de macrófagos de murciélagos *Artibeus sp.*, infectados con el VD2 a una MOI de 1 en comparación con macrófagos infectados paralelamente, procedentes de humano y ratón. Se puede observar que a los 2 días p-i, la cantidad de células infectadas es mayor en los cultivos humanos y esta no incrementa sino hasta los 5 días. En el caso de los macrófagos de murciélagos, la cantidad de células infectadas se observa a partir del día 3 p-i, sin embargo la cantidad de células infectadas incrementa en cada día. Por otro lado, en el marcaje de los cultivos de macrófagos de *Artibeus sp.*, sin virus no se observa la presencia de fluorescencia, indicando que los anticuerpos empleados son específicos para el VD2 y no tienen uniones con otras proteínas celulares. En cuanto a los macrófagos de ratón que se inocularon con el VD2 tampoco se observó fluorescencia, indicando que el virus no se replica en estas células en los tiempos observados.

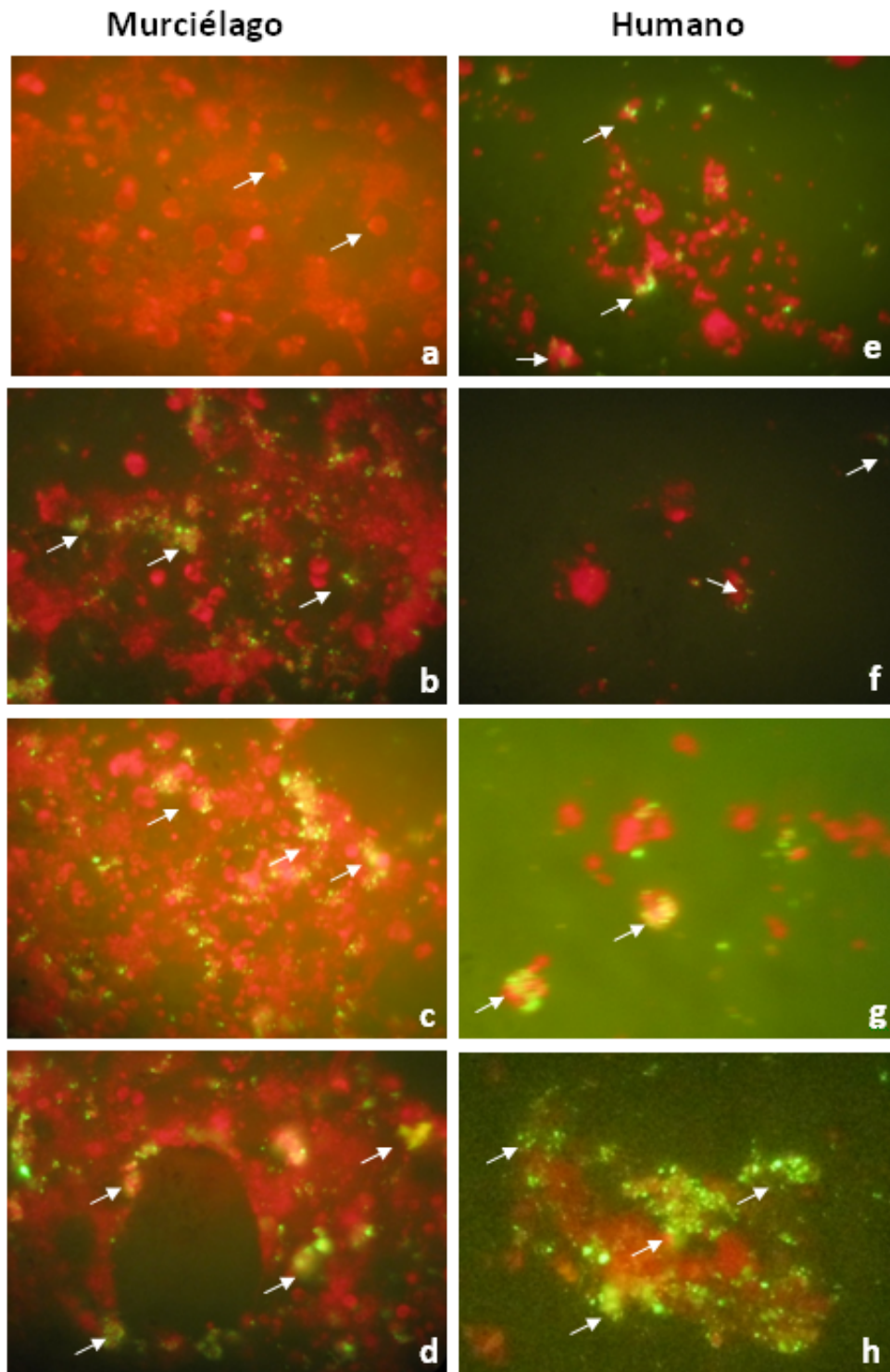


Figura. 12. Infección de macrófagos con VD2. **Izquierda** macrófagos de murciélagos *Artibeus sp.* **derecha**, macrófagos de humano. **a** y **e** 2 días post-infección (p-i), **b** y **f** 3 días p-i, **c** y **g** 4 días p-i y **d** y **h** 5 días p-i. Las flechas blancas indican la fluorescencia que señala la presencia del virus.

Días	2	3	4	5
Macrófagos de humano con VD2	+	+	+	++++
Macrófagos de murciélago con VD2	-	++	+++	+++
Macrófagos de murciélago sin VD2	-	-	-	-
Macrófagos de ratón con VD2	-	-	-	-

Tabla 2. Intensidad de fluorescencia en macrófagos de diferentes especies infectados con virus dengue (MOI = 1). – negativo, el número de cruces indica la intensidad de la fluorescencia. Los ensayos se hicieron por triplicado.

VII.3 Cuantificación de la proteína NS1 para determinar la cinética de replicación viral.

Para determinar la replicación del virus en los macrófagos de murciélago cultivados *in vitro*, se realizó una cinética de producción de la proteína viral NS1, en la que se extrajo el sobrenadante a los siguientes tiempos: 0, 1, 12, 48 y 72 horas. En la figura 13 se muestra que los macrófagos de humano y de murciélago, producen cantidades crecientes de proteína NS1, no así en el caso del ratón en el cual la producción de NS1 es mínima y descende a las 72 horas. Este resultado nos indica similitud en la susceptibilidad a la infección por VD2 de los macrófagos de murciélago y de humano, el cual es el reservorio natural y la única especie susceptible reportada en América.

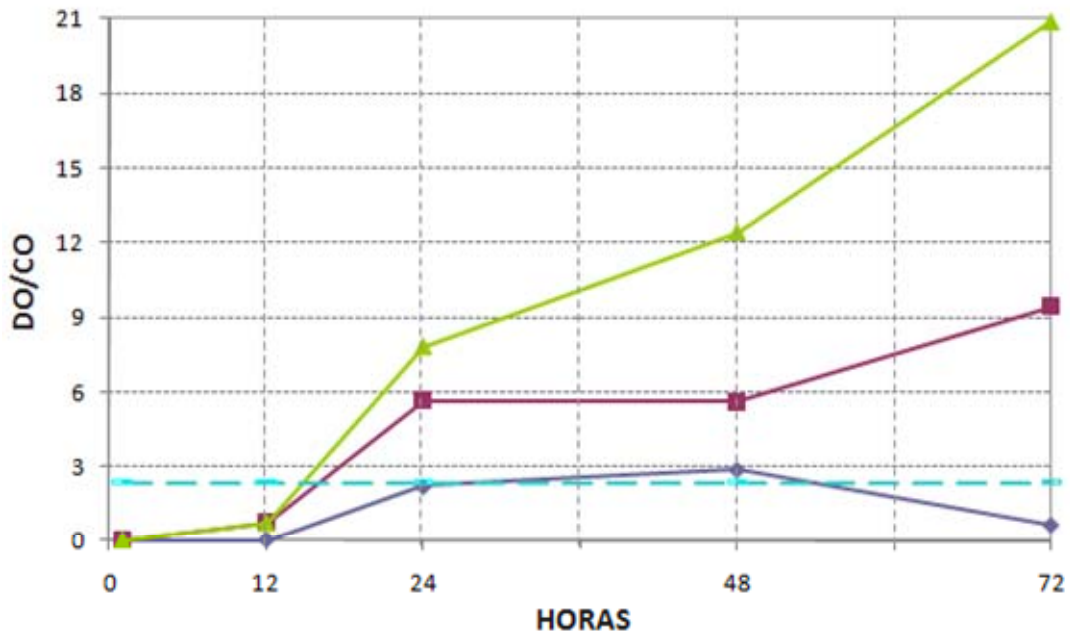


Figura 13. Cinética de producción *in vitro* de la proteína viral NS1 por macrófagos de distintas especies: **■** humano, **▲** murciélago, **◆** ratón, **---** Control positivo del kit comercial. El ensayo se realizó en un periodo de 72 horas post-inoculación.

VII.4 Identificación de los monocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo.

A través de la técnica de citometría de flujo se encontró que los monocitos de murciélagos *Artibeus sp.* tienen un patrón de distribución y tamaño diferente al observado de humano (fig. 14).

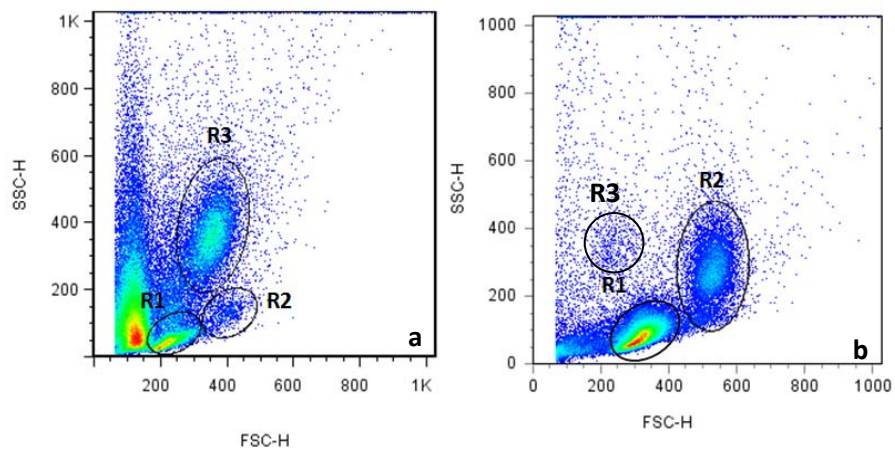
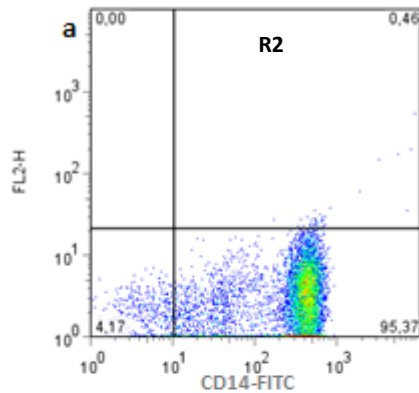


Figura 14. Identificación de las poblaciones celulares (leucocitos de sangre periférica) de murciélagos y de humano por tamaño y granularidad. **a**, en murciélagos se pueden distinguir tres poblaciones bien definidas (R1, R2 y R3) **b**, regiones celulares presentes en humanos (R1, R2 y R3).

Al analizar las poblaciones de monocitos/macrófagos en humanos y murciélagos se encontró que dos poblaciones celulares presentes en murciélagos (R1 y R2) expresan el receptor CD14 (fig. 15 b y c), mientras que en humano se tiene una sola población de células CD14 positivas (R2) (fig. 15 c).

Humano



Murciélago

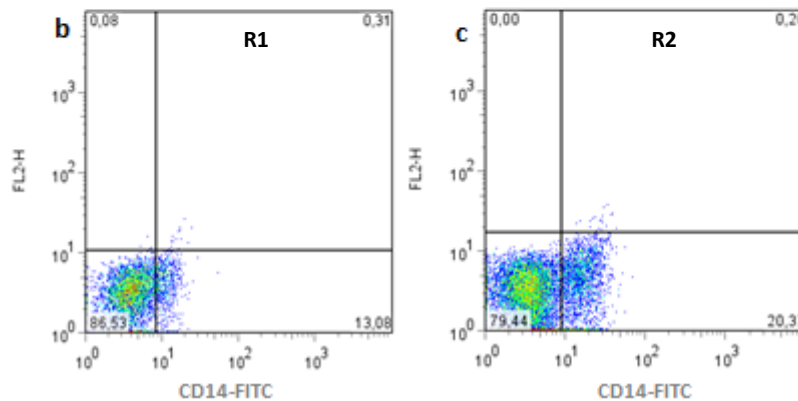


Figura 15. Detección del receptor CD14 en monocitos/macrófagos. **a**, Porcentaje de células positivas a CD14 en humanos en la región R2 (95.37). **b**, porcentaje de células positivas al receptor CD14 en la región 1 de monocitos/macrófagos de murciélago (13.08). **c**, porcentaje de células positivas CD14 en la región 2 de monocitos/macrófagos de murciélago (20.37).

En la figura 16, se hace una comparación del porcentaje de expresión de CD14 en las poblaciones de monocitos/macrófagos de humano y murciélagos. Se puede observar que los humanos tienen una mayor expresión de CD14 en comparación con los murciélagos, sin embargo, las células CD14+ de estos últimos se distribuyen en dos

poblaciones más pequeñas (barras moradas) mientras que en los humanos las células CD14 se encuentran en una sola población (barra azul).

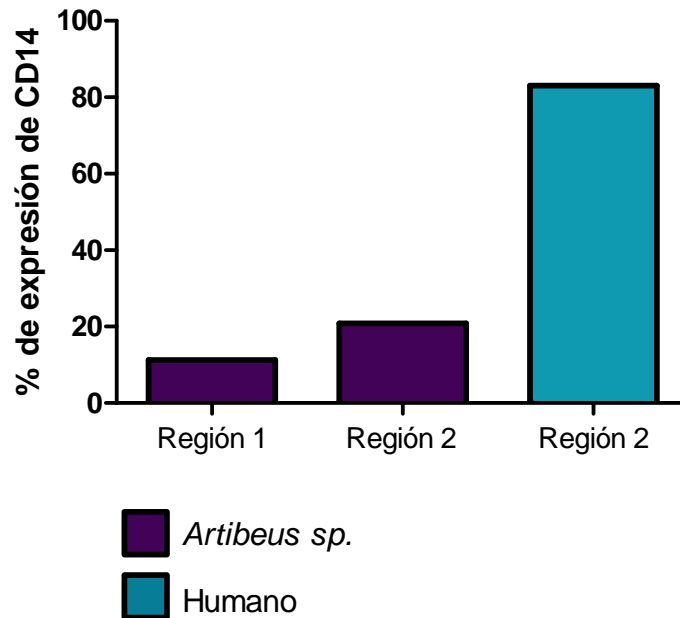


Figura 16. Promedio del porcentaje de expresión de CD14 por regiones de monocitos. *Artibeus sp.* R1= 11.27% y R2 = 20.85%. Humano R2= 83%. Se leyeron 10,000 eventos en el citómetro.

VII.5 Identificación del CD14 y del VD2 en los macrófagos de murciélagos.

Una vez que se encontró por citometría que los murciélagos presentan células CD14+, se realizó inmunofluorescencia para observar la distribución de ésta molécula en la célula mediante microscopia confocal. En la figura 17 se observa en verde la marca correspondiente al receptor CD14 en los monocitos/macrófagos humanos y de murciélago. Ambas imágenes se tomaron con un aumento de 100X y se corrobora lo encontrado por citometría que las células de murciélago tienen un tamaño más pequeño que las humanas (11.36 μm en humanos vs 8.08 y 5.81 μm en murciélago).

Una vez se observó la distribución del CD14 en las células humanas y de murciélago, se prosiguió a detectar si estas células son las que se están infectando con el VD2. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia con dos fluoróforos diferentes para ver si co-localiza la distribución del VD2 y el CD14. Se muestra que la distribución del CD14

y el VD2 si co-localizan, lo que indica que las células que se infectan en los murciélagos, al igual que en los humanos son de un linaje monocítico (fig. 18).

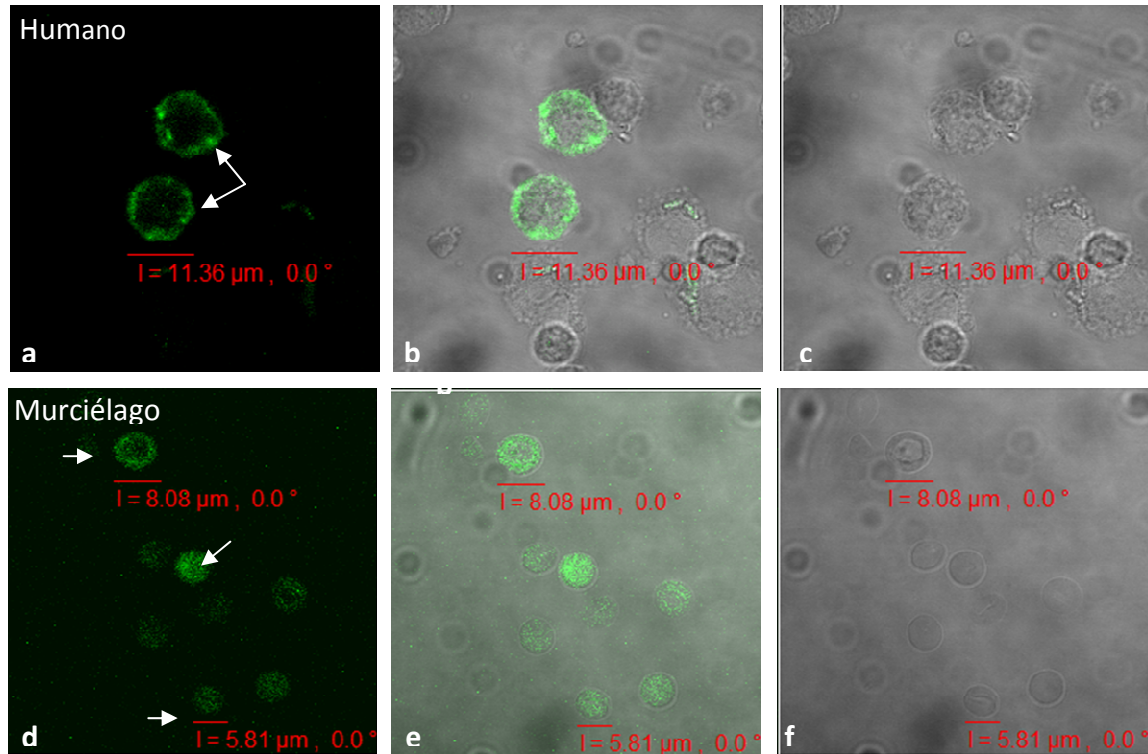


Figura 17. Inmunofluorescencia para detectar CD14. **a** y **d** macrófagos marcados con un anticuerpo anti-CD14 humano acoplado a FITC. **b** y **e**, macrófagos de murciélago marcados con un anticuerpo anti-CD14 humano acoplado a FITC co-localizando con luz blanca. **c** y **f**, macrófagos observados con luz blanca. Las flechas blancas indican la fluorescencia que señala la presencia del receptor de superficie CD14.

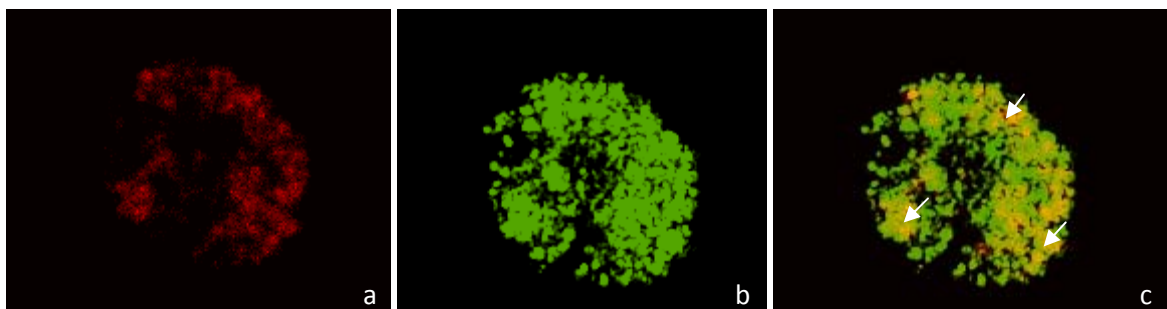


Figura 18. Inmunofluorescencia para identificar al VD2 y CD14 en células de murciélago. **a**. Marcaje del VD2 con un anticuerpo acoplado a Rojo Tejas (rojo). **b**, marcaje de CD14 con un anticuerpo acoplado a FITC (verde). **c**, co-localización de las imágenes **a** y **b**; en amarillo (señalado por flechas blancas) se indica donde es que se encuentra la presencia de ambas marcas simultáneamente.

VIII. DISCUSIÓN

Actualmente se sabe que los mosquitos del género *Aedes* son los vectores del VD y por otro lado, los humanos y otros primates son las únicas especies en las que se ha descrito que pueden replicarlo exitosamente de manera natural. Como el dengue ha prosperado en áreas en donde no existen los primates no humanos, se considera que este flavivirus no requiere de un ciclo enzootico en el que pueda afectar a otras especies para mantenerse en la naturaleza y posiblemente re-emerger en la población humana.

En un estudio realizado previamente por nuestro grupo se demostró la presencia de anticuerpos contra el VD, además de la proteína viral NS1 y del RNA viral por RT-PCR en diferentes especies de murciélagos de México, incluidos aquellos del género *Artibeus* (Aguilar-Setién *et al.*, 2008), estos resultados nos permiten suponer que estos animales podrían ser también susceptibles a la infección con el VD, lo que podría conferirles además algún papel en la epidemiología de la enfermedad o constituir un modelo de laboratorio para el estudio de la misma. Sin embargo, esto no ha sido demostrado fehacientemente como con el virus Nipha, SARS, Hendra, Ébola y otros virus más estudiados, especialmente el de la rabia, el cual re-emerge a partir de los murciélagos en las poblaciones humanas y en la fauna que los rodea (Cui *et al.*, 2008; Badrane y Tordo 2001).

Con estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue el de dilucidar si algunos tipos celulares procedentes de murciélagos *Artibeus sp.*, que resultaron positivos al VD en condiciones naturales (Aguilar-Setién *et al.*, 2008) son susceptibles a la infección por el VD en condiciones de laboratorio.

En los últimos años se han estudiado en los humanos, cuáles son las células más susceptibles a la infección con el VD y esto ha llevado a la obtención de diferentes modelos de infección en cultivos celulares primarios y del estudio de la patogenia de la enfermedad por esta vía (Bente *et al.*, 2006). El análisis histológico de personas que han sufrido DH y SCD sugieren que los nódulos linfáticos, el bazo, el hígado y la medula ósea

están involucrados o son afectados por la replicación del virus; no obstante, se ha visto que los pacientes con dengue muestran una variedad de tipos celulares como las células dendríticas, monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales que son infectadas a diferentes tiempos en el curso de la enfermedad (Bente *et al.*, 2006).

Muchos cultivos celulares de fibroblastos, epiteliales y endoteliales han mostrado poder replicar al virus de manera *in vitro*. Un amplio rango de líneas celulares, ahora son usadas para el aislamiento, para el diagnóstico y para el estudio de antivirales (Bente *et al.*, 2006). Por otro lado, hace casi tres décadas se especuló acerca de que el sitio de replicación del VD en los humanos son las células fagocíticas mononucleares (Helstead, 1981). Actualmente se ha comprobado la susceptibilidad de estas estirpes (monocitos/macrófagos) al VD y su participación en la exacerbación de la replicación viral, en presencia de anticuerpos específicos, conduciendo a la probable manifestación del DH y SCD (hipótesis ADA) (Pupo *et al.*, 2004). En el humano existen propuestas en las que los linfocitos B y T pueden ser susceptibles también a la infección, produciendo así las citocinas que causan daño al endotelio presente en la patogenia del dengue (Green y Rothman, 2006); aunque esto ha sido refutado por Blackley *et al.*, (2007), ya que ni en presencia ni ausencia de anticuerpos específicos, los linfocitos B y T son susceptibles, quedando únicamente la estirpe de los monocitos/macrófagos como aptos para la replicación a nivel sistémico.

Se inocularon cultivos primarios de fibroblastos procedentes de biopsias de la oreja de *Artibeus sp.*, encontrándose que en las condiciones en las que se manejaron, son refractarios a la infección (fig. 10). Como se ha mencionado anteriormente, la presencia del receptor al virus sobre la superficie celular es crucial para que se dé o no la infección, de manera que se propone que éstos fibroblastos carecen del mismo, siendo este el motivo principal de la refracción a la infección, contrario a lo sucedido con las líneas de fibroblastos obtenidos de otras especies como Vero y BHK-21, las cuales poseen su receptor al VD y son muy susceptibles a la infección.

Al realizar los cultivos primarios de macrófagos de sangre y bazo de *Artibeus sp.*, se notó que eran mas pequeños en comparación con los procedentes de humanos (11.36 μm en humanos vs 8.08 y 5.81 μm en murciélago) (fig. 17). Al estudiar estas poblaciones por medio de citometría de flujo pudimos identificar que en el murciélago había 3 subpoblaciones celulares bien definidas (fig. 14). Al realizar una búsqueda exhaustiva de estudios previos de clasificación de los leucocitos en murciélagos, no se encontraron antecedentes, por lo que se probó si algunos marcadores que se utilizan en humanos funcionaban en esta especie. Se analizó la presencia del receptor de superficie CD14 ya que en los macrófagos, células dendríticas, microglía, células de Langerhans y células de Kupffer de humano y de ratón este marcador se encuentra de manera específica (Chaturvedi *et al.*, 2006). Se encontró que dos de las tres poblaciones detectadas por citofluorometría en murciélagos expresan CD14 (fig. 15), dando muestra, probablemente de un linaje monocítico. Además se analizó el porcentaje de células CD14+ en los murciélagos *Artibeus sp.* y los humanos y se encontró que, los humanos presentan una mayor cantidad de células CD14+ que los murciélagos (fig. 16).

Se realizaron cultivos de macrófagos de humano, murciélago y ratón que posteriormente fueron infectados con el VD (MOI = 1) durante diferentes tiempos (2, 3, 4 y 5 días p-i), se hicieron inmunofluorescencias para observar la presencia citoplasmática del virus en las células (fig. 11 y 12). Se detectó la presencia del VD2 en los macrófagos humanos desde el segundo día p-i hasta el día cuatro y sólo el quinto día p-i se presentó un aumento en la fluorescencia específica; en otro estudio realizado en 2002 con macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de humano infectados con VD2 (MOI = 3) se encontró que la replicación viral tiene un pico máximo al día 2 p-i disminuyendo gradualmente hasta el día 7 p-i (Yun-Chi y Sheng-Yuan, 2002), esta diferencia en los resultados se puede atribuir a la carga viral con la que se inoculan los cultivos, pues a mayor cantidad de virus disponible se hace factible la infección de un mayor número de células en menos tiempo.

En cuanto a los macrófagos de murciélagos *Artibeus sp.*, se observa el virus a partir del tercer día p-i y la cantidad de células infectadas se incrementa gradualmente con el tiempo hasta el quinto día p-i, encontrándose más evidente el incremento de la infección que en los humanos. En el ratón no observó infección (Tabla 2).

Posteriormente se realizaron otros ensayos de inmunofluorescencia, en los que se marcó al VD y al receptor CD14 para comprobar que las células que se infectan en el murciélago expresan dicho receptor. Se encontró que las células CD14+ son infectadas por el VD (fig. 18). En estudios posteriores se planea hacer la caracterización completa de las células CD14 positivas que se infectan con el VD, realizando la búsqueda con otros marcadores específicos para macrófagos como CD11b, además de determinar las funciones propias de estas células: como fagocitosis y estallido respiratorio.

Finalmente, se realizó una cinética de infección para medir la replicación viral en los macrófagos después de haberlos inoculado con el VD, para ello, se cuantificó la proteína viral no estructural NS1 a los tiempos 0, 1, 12, 24, 48 y 72 horas de acuerdo a lo propuesto por Ludert *et al.* (2008). La proteína NS1 es una glicoproteína no estructural, la cual existe predominantemente en forma dimérica y se encuentra unida a las membranas de las células infectadas. La proteína NS1 es secretada por las células infectadas como soluble y también se ha demostrado que está presente en el suero de pacientes con fase aguda de la infección. En los cultivos celulares infectados con VD los niveles de NS1 correlacionan con los títulos infectivos (Ludert *et al.*, 2008). En la figura 13 se puede observar que a partir de las 24 horas p-i los macrófagos de murciélagos, producen una mayor cantidad de NS1 con respecto a los de humano y de ratón. A las 48 horas p-i, la cantidad de NS1 producida por parte de los macrófagos humanos se incrementó 2 veces con respecto al control positivo del kit Platelia™ Dengue Ag NS1 mientras que en el caso de los macrófagos de murciélago fue de 5 veces. A las 72 horas p-i la cantidad de NS1 producida en los macrófagos humanos se incrementó 4 veces con respecto al control positivo del kit, en tanto que en el caso de los macrófagos de murciélago fue de 9 veces. Este resultado

puede indicar una replicación viral más rápida en las células de murciélagos que en las humanas. Como se sabe, el humano es el único reservorio que se ha descrito en el continente americano que puede replicar al VD de manera natural, el hecho de haber encontrado valores mayores de producción de proteína NS1 en los macrófagos de murciélago que en los de humano podría indicar una mayor o similar susceptibilidad a la infección. Este resultado resalta la posibilidad de que el VD pueda infectar a los murciélagos además de al ser humano en nuestro medio.

La estructura espacial y demográfica de las poblaciones de quirópteros son suficientemente variables como para brindar oportunidades para mantener a los virus que causan enfermedades persistentes y agudas como el VD, pues se ha propuesto la posibilidad de que los murciélagos puedan participar en el mantenimiento de este virus en la naturaleza aunque probablemente en bajos títulos (Aguilar-Setién *et al.*, 2008).

IX. CONCLUSIONES

Las poblaciones de monocitos/macrófagos procedentes de murciélagos *Artibeus sp.* son permisivas al VD2, en un nivel mayor al que se presenta en humanos a partir de las 48 horas post-infección.

Los cultivos primarios de fibroblastos de oreja de murciélagos *Artibeus sp.* no son permisivos al VD2

Al analizar por medio de citometría de flujo a los monocitos de sangre periférica de murciélagos *Artibeus sp.* se detectaron tres poblaciones diferentes, de las cuales dos son reconocidas con el receptor de superficie CD14.

X. PERSPECTIVAS

Con los resultados encontrados se propone que los macrófagos de los murciélagos podrían ser un modelo para el estudio de la patógena causada por el VD. Es necesario realizar infecciones experimentales *in vivo*, en los murciélagos para monitorear diariamente sus constantes fisiológicas (temperatura, frecuencia respiratoria, frecuencia cardiaca) y comportamiento, además de fórmula sanguínea, carga viral y niveles de proteína NS1 en suero. También se propone identificar si el virus en sangre (si es que se produce) es capaz de infectar mosquitos como ocurre con los flavivirus YFV y JEV (Davis *et al.*, 2005), así como también la búsqueda del RNA viral en los tejidos asociados a la patología de la enfermedad. Estos estudios, nos permitirían un mejor conocimiento del papel de los murciélagos en la epidemiología del dengue o de su utilidad como modelo de laboratorio para el estudio de la infección.

XI. REFERENCIAS

1. Aguilar-Setién A, Romero-Almaraz ML, Sánchez-Hernández C, Figueroa R, Juárez-Palma LP, García-Flores MM, Vázquez-Salinas C, Salas-Rojas M, Hidalgo-Martínez AC, Pierlé SA, García-Estrada C y Ramos C. (2008). Dengue virus in Mexican bats; *Epidemiol. Infect.* 6: 1-6.
2. Anderson R, Wang S, Osiowy C y Issekutz AC. (1997). Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes; *J. Virol.* 71(6): 4226-4232.
3. Badrane H y Tordo N. (2001). Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders; *J Virol.* 75(17):8096-8104.
4. Brandt WE, McCown JM, Gentry MK y Russell PK. (1982). Infection enhancement of dengue type 2 virus in the U-937 human monocyte cell line by antibodies to flavivirus cross-reactive determinants. *Infect. Immun.* 36(3): 1036-1041.
5. Bente DA y Rico R. (2006). Models of dengue virus infection; *Drug. Discov. Today. Dis. Models.* 3(1): 97–103.
6. Bielefeldt - Ohmann H. (1998). Analysis of antibody-independent binding of dengue virus and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes; *Virus Res.* 57: 63–79.
7. Burton KL, Mark DE, Thomas EL, John CP y John WB. (2004). Molecular differentiation of large species of fruit-eating bats (*Artibeus*) and phylogenetic relationships based on the cytochrome *b* gene; *Acta Chiropterologica.* 6(1): 1–12.
8. Cao-Lormeau VM. (2009). Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands; *Virol J.* 6(1):35.
9. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV y Schountz T. (2006). Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses; *Clin. Microbiol. Rev.* 19(3):531–545.
10. Chaturvedi UC, Dhawan R, Khanna M y Mathur A. (1991). Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice; *J. Gen. Virol.* 72(4):859-66.
11. Chaturvedi UC, Nagar R y Shrivastava R. (2006). Macrophage and dengue virus: friend or foe? *Indian J Med Res.* 124(1):23-40.
12. Chen YC, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ y Marks RM. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate; *Nat. Med.* 3: 866-871.

13. Chen YC y Wang SY. (2002). Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide; *J Virol.* 76(19):9877-9887.
14. Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EEUU). Bioseguridad en laboratorios de Microbiología y Medicina, 4ª Edición. Disponible en: www.cdc.gov/od/ohs/pdffiles/bmbl4_spanish.pdf . 25 de marzo de 2009
15. Crill W y Roehring J. (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of DEN E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells; *J. Virol.* 75: 4002-4007.
16. Cui Cui J, Counor D, Shen D, Sun G, He H, Deubel V y Zhang S. (2008). Detection of Japanese encephalitis virus antibodies in bats in Southern China; *Am J Trop Med Hyg.* 78(6):1007-1011.
17. Davis A, Bunning M, Gordy P, Panella N, Blitvich B y Bowen R. (2005). Experimental and natural infection of North American bats with West Nile virus; *Am J Trop Med Hyg.* 73(2):467-469.
18. Del Ángel RM. (2006). Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral; *Cinvestav.* 36-43.
19. de Thoisy B, Lacoste V, Germain A, Muñoz-Jordán J, Colón C, Mauffrey JF, Delaval M, Catzefflis F, Kazanji M, Matheus S, Dussart P, Morvan J, Setién AA, Deparis X y Lavergne A. (2009). Dengue infection in neotropical forest mammals; *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9(2):157-170.
20. Dobson AP. (2005). Virology. What links bats to emerging infectious diseases?; *Science.* 310(5748):628-629.
21. Egger JR y Coleman PG. (2007). Age and Clinical Dengue Illness; *Emerging. Infec. Dis.* 13(6): 924-925.
22. Enserink M. (2000). Emerging diseases. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats; *Science.* 289(5479):518-519.
23. Espinoza F, Hernández CM, Rendón R, Carrillo ML y Flores JC. (2003). Transmisión interepidémica del dengue en la ciudad de Colima, México; *Salud pública de México.* 45(5): 365-370.

24. Falconar AKI. (1997). The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin / adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in hemorrhagic fever pathogenesis; *Arch. Virol.* 142: 897-916.
25. Flores-Martínez JJ, Ortega J e Ibarra-Manríquez G. (2000). El hábito alimentario del murciélago zapotero (*Artibeus jamaicensis*) en Yucatán; *Rev. Mex. Mastozool.* 4: 22-39.
26. Garcia Flores MM. (2000). Ontogenia del receptor neuronal para el virus dengue serótipo 2 en el sistema nervioso central del ratón; *Tesis de Maestría*. Universidad Autónoma de México, FES Cuautitlan. pp 60.
27. Gibbons RV y Vaughn DW. (2002). Dengue: an escalating problem; *BMJ.* 324:1563-1566.
28. Goyache-Goñi J. (2000). Resumen de la conferencia: Animales salvajes y salud pública; Departamento de Patología Animal I, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense, España.
29. Green S y Rothman A. (2006). Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever; *Curr Opin Infect Dis*, 19(5):429-436.
30. Guzmán MG. y Kouri G. (2002). Dengue: an update; *Lancet Inf. Dis.* 2(1):33-42.
31. Henchal EA y Putnak JR. (1990). The Dengue Viruses; *Clin. Microbiol. Rev.* 3(4):376-396.
32. Imbert JL, Guevara P, Ramos-Castañeda J, Ramos C y Sotelo J. (1994). Dengue virus infects mouse-cultured neurons but no astrocytes; *J. Med. Virol.* 42(3): 228-233.
33. Jindadamrongwech S y Smith DR. (2004). Identification of GRP78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2; *Arch. Virol.* 149(5): 915-927.
34. Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WW, Rose RC, Schlesinger JJ y Jin X. (2007). Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells; *J Med Virol.* 80(1):134-146
35. Kunz H. Thomas. (1982). Ecology of bats. Plenum Press, New York-London. pp, 425
36. Larreal Y, Valero N, Estévez J, Reyes I, Maldonado M, Espina LM, Arias J, Meleán E, Añez G y Atencio R. (2005). Hepatic alterations in patients with dengue; *Invest. Clin.* 46(2):169-1678.

37. Leroy E, Kumulungui B, Pourrut B, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Délicat A, Paweska J, Gonzalez JP y Swanepoel R. (2005). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus; *Nature*. 438 (7068): 575-576.
38. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JR, Rey FA, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F y Amara A. (2005). Dendritic cell specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals; *J. Biol. Chem.* 280(25): 23698-23708.
39. Ludert JE, Mosso C, Ceballos-Olvera I y del Angel RM. (2008). Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells; *Virology*. 5:51.
40. Maguina C, Osorio F, Suarez L, Soto L y Pardo K. (2005). Dengue clásico y hemorrágico: una enfermedad reemergente y emergente en el Perú; *Rev. Med. Hered*, 16(2):120-140.
41. Malavigne GN, Fernando S, Fernando DJ y Seneviratne SL. (2004). Dengue viral infections; *Postgrad. Med. J.* 80(948): 588-601.
42. Marianneau P, Cordova A, Edelman L, Doubel V y Desprès P. (1997). Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF- κ B which in turn induces apoptotic cell death. *J. Virol.* 71(49): 3244-3249.
43. Martínez-Barragán JJ. y Del Ángel RM. (2001). Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection; *J. Virol.* 75(27):7818–7827.
44. Martínez E. (2006). La prevención de la mortalidad por dengue: un espacio y un reto para la atención primaria de salud; *Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am J Public Health* 20(1): 60-74.
45. Mindell DP, Dick CW, y Baker RJ. (1991). Phylogenetic relationships among megabats, microbats, and primates; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88(22): 10322–10326.
46. Modis Y, Ogata S, Clements D y Harrison SC. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion; *Nature*. 22; 427(6972):313-319.
47. Moratelli R, Andrade Cde M y de Armada JL. (2002). A technique to obtain fibroblast cells from skin biopsies of living bats (Chiroptera) for cytogenetic studies; *Genet Mol Res.* 1(2):128-130.

48. Moreno-Altamirano MM, Sánchez-García FJ y Muñoz ML. (2002). Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2; *J. Gen. Virol.* 83(Pt 5):1123–1130.
49. Muñoz ML, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R y Ortega A. (1998). Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS. Microbiol. Lett*; 168(2):251-258.
50. Muzaffar J, Venkata-Krishnan P, Gupta N y Kar P. (2006). Dengue encephalitis: why we need to identify this entity in a dengue-prone región; *Singapore Med. J.* 47(11):975-977.
51. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ y Rossmann MG. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle; *Nat Rev Microbiol.* 3(1):13-22.
52. Navarro-Sánchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F y Desprès F. (2003). Dendritic-cell-specific ICAM 3- grabbing-non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses; *EMBO Rep* 4, 723-728.
53. O'Connor J, Rowan L y Lawrence J. (1955). Relationships between the Flying Fox (Genus *Pteropus*) and Arthropod-borne Fevers of North Queensland; *Nature* 176(4479): 472.
54. Organization Mundial de la Salud, OMS. (1967). Serie de informes técnicos No 369. Los arbovirus y su importancia en patología humana. Geneva.
55. Organización Mundial de la Salud, OMS. (1997). Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment prevention y control. Geneva.
56. Ortega J y Castro-Arellano I. (2001). *Artibeus jamaicensis*; *Mammalian Species* 662: 1-9.
57. PAHO. Pan American Health Organization. (2007) Dengue y dengue hemorrágico en las Américas; *Rev Panam Salud Pública /Pan Am. J. Public Health.* 21(4):187-191.
58. Pandey B, Ichinose A e Igarashi A. (1998). Electron microscopic examination of *Aedes albopictus* clone C6/36 cells infected with dengue virus 2 at elevated incubation temperatura; *Acta. Virol.* 42(1): 35-39.
59. Perera R y Kuhn RJ. (2008). Structural proteomics of dengue virus; *Curr Opin Microbiol.* 11(4):369-377.

60. Platt KB, Mangiafico JA, Rocha OJ, Zaldivar ME, Mora J, Trueba G y Rowley WA. (2000). Detection of dengue virus neutralizing antibodies in bats from Costa Rica and Ecuador; *J. Med. Entomol.* 37(6):965-967.
61. Price J. (1978). Serological Evidence of Infection of Tacaribe Virus and Arboviruses in Trinidadian Bats; *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27(1):162-167.
62. Pupo M, Amin N, Alvarez M, Luis Morier, Rodríguez H, González Z y Guzmán MG. (2004). Amplificación dependiente de anticuerpos del virus dengue en cepas cubanas utilizando anticuerpos monoclonales; *Rev. Cubana. Med. Trop.* 56(3): 197-202.
63. Ramos-Castañeda J, Imbert JL, Barrón BL y Ramos C. (2007). A 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells; *J. Neurovirol.* 3(6):435-440.
64. Redondo RA, Brina LP, Silva RF, Ditchfield AD y Santos FR. (2008). Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae); *Mol Phylogenet Evol.* 49(1):44-58.
65. Reyes del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F y Del Ángel RM. (2005). Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of Dengue virus receptor complex in human cells; *J. Virol.* 79(8): 4557-4567.
66. Rico-Hesse R. (2007). Dengue virus evolution and virulence models; *Clin Infect Dis.* 44(11):1462-1466
67. Rothwell SW, Putnak R y La Russa VF. (1996). Dengue-2-virus infection of human bone marrow: characterization of dengue-2 antigenpositive stromal cells; *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54(5):503–510.
68. Salas-Benito JS y Del Angel RM. (1997). Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus; *J. Virol.* 71(17):7246– 7252.
69. Secretaria de Salud Pública, México 2009. Panorama epidemiológico de fiebre y fiebre hemorrágica por dengue en entidades federativas.
http://www.dgepi.salud.gob.mx/dengue_pano/2009_PANORAMAS/.
70. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R y Pittet MJ. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites; *Science.* 325(5940):612-616.
71. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S y

- Marovich MA. (2003). DCSIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells; *J. Exp. Med.* 197(7):823-829.
72. Thepparit C y Smith DR. (2004). Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37/67 kDa high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor; *J. Virol.* 78(22):12647-12656.
73. Towner JS, Pourrut X, Albariño CG, Nkogue CN, Bird BH, Grard G, Ksiazek TG, González JP, Nichol ST y Leroy EM. (2007). Marburg virus infection detected in a common African bat; *PLoS ONE.* 2(1):e764.
74. Wei HY, Jiang LF, Fang DY y Guo HY. (2003). Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides; *J. Gen. Virol.* 84(Pt 11):3095–3098.
75. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP y Murphy BR. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine; *Nat. Rev. Microbiol.* 5(7):518-528.
76. Yun-Chi C. y Sheng-Yuan W. (2002). Activation of Terminally Differentiated Human Monocytes/Macrophages by Dengue Virus: Productive Infection, Hierarchical Production of Innate Cytokines and Chemokines, and the Synergistic Effect of Lipopolysaccharide; *J. of Virology.* 76(19): 9877–9887.
77. Zhang H, Yang X y Li G. (1998). Detection of dengue virus genome RNA in some kinds of animals caught from dengue fever endemic areas in Hainan Island with reverse transcription-polymerase chain reaction; *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 12(3):226-228.

XII. ANEXOS

ANEXO I. Precaución del personal de laboratorio para trabajar con arbovirus

La exposición del personal de laboratorio a distintos arbovirus ha dado lugar con frecuencia a enfermedades de sintomatología leve y transitoria en unas veces y prolongada en otras, con secuelas sensoriales y motoras e incluso con desenlace fatal. Las vías de penetración del virus son, a lo que parece muy variadas: inhalación de aerosoles (corrientes de aire con virus), pulverización directa en los ojos o en la cara, aspiración por la boca, inoculación por pinchazos, cortes u otras lesiones cutáneas leves, picadura de artrópodos con infecciones experimentales, etc. (OMS, 1967).

Todos los trabajos con artrópodos, con antígenos vivos, con cultivos celulares o con animales de experimentación han de efectuarse con las mayores precauciones para evitar la formación de aerosoles infectados, la contaminación de las heridas o la autoinoculación accidental. Además de todas las personas que trabajan en estos laboratorios, hay que organizar el aislamiento apropiado del resto del personal cuidando de que las puertas estén bien cerradas para evitar la difusión de cualquier aerosol que pudiera formarse accidentalmente. El uso de capuchones, pipetas mecánicas, gafas, guantes y otros dispositivos de seguridad será obligatorio para la ejecución de determinados trabajos. Muchas manipulaciones, que son peligrosas si se efectúan en una superficie descubierta, deben hacerse bajo una campana de flujo laminar (OMS, 1967).

En casos de exposición probable a virus que provoquen enfermedades graves o peligrosas se procederá sin pérdida de tiempo a una limpieza profunda o un lavado de la herida para diluir el virus, si la contaminación presunta ha podido producirse por esa vía, y se administrara un viricida eficaz (OMS, 1967).

Con lo anterior, se proponen algunas recomendaciones para evitar infecciones accidentales con VD en el laboratorio:

- Usar guantes de látex nuevos estériles
- Usar pipetas, tubos y botellas de cultivo, nuevas y estériles
- Usar cubre bocas
- Usar gafas protectoras
- Trabajar con el virus en campana de flujo laminar de bioseguridad tipo II
- Cerrar la puerta del lugar de trabajo para evitar corrientes de aire
- Evitar la presencia de personas ajenas al experimento en el área de trabajo
- El material de deshecho se irradiará con luz UV antes de ser depositado en el cesto de desechos biológicos que contenga hipoclorito de sodio
- Al finalizarse el experimento, debe irradiarse la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones posteriores con luz UV.

La manipulación del virus dengue se hizo siguiendo los lineamientos establecidos en el manual editado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, Georgia, EEUU) en la sección IV-G . Arbovirus y Virus relacionados con Zoonosis.

Precauciones recomendadas: Las categorías del Subcomité de Seguridad de Arbovirus en Laboratorios (SALS) del Comité Americano de Virus en Artrópodos (ACAV) categorizó 424 virus registrados en el catalogo de Arbovirus. Estas categorías se basan en el riesgo derivado de la información proporcionada por una encuesta mundial de 585 laboratorios que trabajan con Arbovirus. Los 4 serotipos de virus dengue están catalogados dentro de la lista que recomienda únicamente nivel II para su trabajo.

La Unidad de Investigación Médica en Inmunología cuenta con un área especial para el trabajo de material infeccioso que consta de una campana de flujo laminar vertical de bioseguridad tipo II marca NuAire®, incubadora de 37°C exclusiva para el manejo de

este material y microscopio invertido exclusivo para el área. Todo el material que se trabaja en el área se sumerge en solución desinfectante de hipoclorito de sodio al 0.1%. Todo el material utilizado se deposita finalmente en contenedores apropiados antes de salir del área (bolsas de plástico de color rojo con el símbolo de riesgo biológico, contenedores para material punzo-cortante con el mismo símbolo, etc.). El material depositado en los contenedores descritos, es manejado por compañías especializadas contratadas por el IMSS. El manejo de los virus y las instalaciones descritas están dentro de las recomendaciones para bioseguridad tipo II.

ANEXO II. Virus aislados de quirópteros infectados naturalmente (Calisher *et al.*, 2006).

Virus	Especies de quirópteros
Family <i>Rhabdoviridae</i> , genus <i>Lyssavirus</i>	
Rabies virus.....	Numerous bat species, essentially worldwide
Lagos bat virus.....	<i>Eidolon helvum</i> (African straw-colored fruit bat), <i>Micropteropus pusillus</i> (Peters' lesser epauletted fruit bat), <i>Epomops dobsonii</i> (Dobson's epauletted fruit bat), <i>Nycteris gambiensis</i> (Gambian slit-faced bat), <i>Epomophorus wahlbergi</i> (Wahlberg's epauletted fruit bat)
Duvenhage virus.....	<i>Miniopterus</i> sp., <i>Nyctalus noctula</i> (noctule), <i>Vespertilio murinus</i> (particolored bat), <i>Nycteris thebaica</i> (Egyptian slit-faced bat)
Australian bat lyssavirus.....	Megachiroptera (multiple <i>Pteropus</i> spp.), Microchiroptera sp. from Australia, <i>Saccolaimus flaviventris</i> (yellow-bellied pouched bat)
European bat lyssavirus 1.....	<i>Eptesicus serotinus</i> (common serotine), <i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette)
European bat lyssavirus 2.....	<i>Myotis myotis</i> (mouse-eared myotis), <i>Myotis dasycneme</i> (pond myotis), <i>Myotis nattereri</i> (Natterer's myotis), <i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreibers' long-fingered bat), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (greater horseshoe bat), <i>Myotis daubentonii</i> (Daubenton's myotis)
Aravan virus.....	<i>Myotis blythii</i> (lesser mouse-eared myotis)
Khujand virus.....	<i>Myotis mystacinus</i> (whiskered myotis)
Irkut virus.....	<i>Murina leucogaster</i> (greater tube-nosed bat)
West Caucasian bat virus.....	<i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreibers' long-fingered bat)
Family <i>Rhabdoviridae</i> , genus unassigned	
Gossas virus.....	<i>Tadarida</i> sp.
Kern Canyon virus.....	<i>Myotis yumanensis</i> (Yuma myotis)
Mount Elgon bat virus.....	<i>Rhinolophus eloquens</i> (eloquent horseshoe bat)
Oita 296 virus.....	<i>Rhinolophus cornutus</i> (little Japanese horseshoe bat)
Family <i>Orthomyxoviridae</i> , genus	
<i>Influenzavirus A</i> , influenza A virus.....	<i>Nyctalus noctula</i> (noctule)
Family <i>Paramyxoviridae</i> , genus <i>Henipavirus</i>	
Hendra virus.....	<i>Pteropus alecto</i> (black flying fox), <i>Pteropus poliocephalus</i> (gray-headed flying fox), <i>Pteropus scapulatus</i> (little red flying fox), <i>Pteropus conspicillatus</i> (spectacled flying fox)
Nipah virus.....	<i>Pteropus hypomelanus</i> (variable flying fox), <i>Pteropus vampyrus</i> (large flying fox), <i>Pteropus lylei</i> (Lyle's flying fox)
Family <i>Paramyxoviridae</i> , genus <i>Rubulavirus</i>	
Mapuera virus.....	<i>Sturmira lilium</i> (yellow epauletted bat)
Menangle virus.....	<i>Pteropus poliocephalus</i> (gray-headed flying fox)
Tioman virus.....	<i>Pteropus hypomelanus</i> (variable flying fox)
Family <i>Paramyxoviridae</i> , genus undetermined, a parainfluenzavirus.....	
	<i>Rousettus leschenaultia</i> (Leschenault's rousette)
Family <i>Coronaviridae</i> , SARS coronavirus.....	
	<i>Rhinolophus sinicus</i> (Chinese horseshoe bat), <i>Rhinolophus pearsonii</i> (Pearson's horseshoe bat), <i>Rhinolophus macrotis</i> (big-eared horseshoe bat), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (greater horseshoe bat)
Family <i>Togaviridae</i> , genus <i>Alphavirus</i>	
Chikungunya virus ²	<i>Scotophilus</i> sp., <i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette), <i>Hipposideros caffer</i> (Sundevall's leaf-nosed bat), <i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat)
Sindbis virus.....	<i>Rhinolophidae</i> sp., <i>Hipposideridae</i> sp.
Venezuelan equine encephalitis virus.....	<i>Desmodus rotundus</i> (vampire bat), <i>Uroderma bilobatum</i> (tent-making bat), <i>Artibeus phaeotis</i> (pygmy fruit-eating bat)
Family <i>Flaviviridae</i> , genus <i>Flavivirus</i>	
Bukalasa bat virus.....	<i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat), <i>Tadarida condylura</i> (Angola free-tailed bat)
Carey Island virus.....	<i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat), <i>Macroglossus minimus</i> (lesser long-tongued fruit bat)
Central European encephalitis virus.....	Unidentified bat
Dakar bat virus.....	<i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat), <i>Taphozous perforatus</i> (Egyptian tomb bat), <i>Scotophilus</i> sp., <i>Mops condylurus</i> (Angola free-tailed bat)
Entebbe bat virus.....	<i>Chaerephon pumilus</i> (little free-tailed bat), <i>Mops condylurus</i> (Angola free-tailed bat)
Japanese encephalitis virus.....	<i>Hipposideros armiger terasensis</i> (great roundleaf bat; also known as Formosan leaf-nosed bat), <i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreibers' long-fingered bat), <i>Rhinolophus cornutus</i> (little Japanese horseshoe bat)
Jugra virus.....	<i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat)
Kyasanur Forest disease virus.....	<i>Rhinolophus rouxi</i> (rufous horseshoe bat), <i>Cynopterus sphinx</i> (greater short-nosed fruit bat)
Montana myotis leucoencephalitis virus.....	<i>Myotis lucifugus</i> (little brown bat)
Phnom-Penh bat virus.....	<i>Eonycteris spelaea</i> (lesser dawn bat), <i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat)

Virus	Especies de quirópteros
Rio Bravo virus.....	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i> (Mexican free-tailed bat), <i>Eptesicus fuscus</i> (big brown bat)
St. Louis encephalitis virus.....	<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i> (Mexican free-tailed bat)
Saboya virus.....	<i>Nycteris gambiensis</i> (Gambian slit-faced bat)
Sokuluk virus.....	<i>Vespertilio pipistrellus</i> (probably <i>Pipistrellus pipistrellus</i> ; common pipistrelle)
Tamana bat virus.....	<i>Pteronotus pamellii</i> (Parnell's mustached bat)
Uganda S virus.....	<i>Rousettus</i> sp., <i>Tadarida</i> sp.
Yokose virus.....	Unidentified bat
Family <i>Bunyaviridae</i> , genus <i>Bunyavirus</i>	
Catu virus.....	<i>Molossus obscurus</i> (possibly <i>Molossus currentium</i> ; Thomas' mastiff bat)
Guama virus.....	Unidentified bat
Nepuyo virus.....	<i>Artibeus jamaicensis</i> (Jamaican fruit-eating bat), <i>A. lituratus</i> (great fruit-eating bat)
Family <i>Bunyaviridae</i> , genus <i>Hantavirus</i> ,	
Hantaan virus.....	<i>Eptesicus serotinus</i> (common serotine), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (greater horseshoe bat)
Family <i>Bunyaviridae</i> , genus <i>Phlebovirus</i>	
Rift Valley fever virus.....	<i>Micropteropus pusillus</i> (Peters' dwarf epauletted fruit bat), <i>Hipposideros abae</i> (Aba leaf-nosed bat), <i>Miniopterus schreibersii</i> (Schreibers' long-fingered bat), <i>Hipposideros caffer</i> (Sundevall's leaf-nosed bat), <i>Epomops franqueti</i> (Franquet's epauletted bat), <i>Glauconycteris argentata</i> (common butterfly bat)
Toscana virus.....	<i>Pipistrellus kuhlii</i> (Kuhl's pipistrelle)
Family <i>Bunyaviridae</i> , genus unassigned	
Kaeng Khoi virus.....	<i>Chaerephon plicatus</i> (wrinkle-lipped free-tailed bat)
Bangui virus.....	<i>Scotophilus</i> sp., <i>Pipistrellus</i> sp., <i>Tadarida</i> sp.
Family <i>Reoviridae</i> , genus <i>Orbivirus</i>	
Ife virus.....	<i>Eidolon helvum</i> (straw-colored fruit bat)
Japanaut virus.....	<i>Syconycteris australis</i> (southern blossom bat)
Fomede virus.....	<i>Nycteris nana</i> (dwarf slit-faced bat), <i>Nycteris gambiensis</i> (Gambian slit-faced bat)
Family <i>Reoviridae</i> , genus <i>Orthoreovirus</i>	
Nelson Bay virus.....	<i>Pteropus poliocephalus</i> (gray-headed flying fox)
Pulau virus.....	<i>Pteropus hypomelanus</i> (variable flying fox)
Broome virus.....	<i>Pteropus alecto</i> (black flying fox)
Family <i>Arenaviridae</i> , Tacaribe virus.....	
	<i>Artibeus lituratus</i> (great fruit-eating bat), <i>A. jamaicensis</i> (Jamaican fruit-eating bat)
Family <i>Herpesviridae</i> , genus unassigned	
Agua Preta virus.....	<i>Carollia subrufa</i> (gray short-tailed bat)
A cytomegalovirus.....	<i>Myotis lucifugus</i> (little brown bat)
Parixa virus.....	<i>Lonchophylla thomasi</i> (Thomas' nectar bat)
Family <i>Picomaviridae</i> , genus undetermined,	
Juruaca virus.....	Unidentified bat
Unclassified	
Issyk-kul (Keterah virus) ^c	<i>Nyctalus noctula</i> (noctule), <i>Eptesicus serotinus</i> (common serotine), <i>Pipistrellus pipistrellus</i> (common pipistrelle), <i>Myotis blythii</i> (lesser mouse-eared myotis), <i>Rhinolophus ferrumequinum</i> (greater horseshoe bat), <i>Scotophilus kuhlii</i> (lesser Asiatic yellow house bat), <i>Cynopterus brachyotis</i> (lesser short-nosed fruit bat), <i>Eonycteris spelaea</i> (lesser dawn bat), <i>Chaerephon plicatus</i> (wrinkle-lipped free-tailed bat), <i>Hipposideros diadema</i> (diadem leaf-nosed bat), <i>Taphozous melanopogon</i> (black-bearded tomb bat), <i>Rhinolophus lepidus</i> (Blyth's horseshoe bat), <i>Rhinolophus horsfeldi</i> (possibly <i>Megaderma spasma</i> , lesser false vampire bat)
Mojui dos Campos virus.....	Unidentified bat
Yogue virus.....	<i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette)
Kasokero virus.....	<i>Rousettus aegyptiacus</i> (Egyptian rousette)

ANEXO III. Aspectos de bioseguridad para el manejo de Quirópteros

Debido a que los Quirópteros son hospederos naturales de los Lyssavirus dentro de los que se encuentra el virus de la rabia. Se tomaron las medidas de prevención según la Ley Federal de Salud y la NOM-011-SSA2-1993. La cual indica que las vacunas contra la rabia pueden aplicarse de manera preventiva o como tratamiento post-exposición. En personas con alto riesgo de exposición al virus de la rabia (profesionales y personas que manejan con regularidad animales, tanto domésticos como silvestres, con fines de investigación), se lleva a cabo el tratamiento preventivo y monitoreo de los títulos de anticuerpos cada seis meses.

Por esto, todo el personal que participa en este proyecto fue vacunado contra la rabia de manera preventiva y el nivel de anticuerpos es monitoreado, en el propio laboratorio, cada 4-6 meses para asegurar que los títulos en ningún caso bajen de 0.5 Unidades Internacionales, valor mínimo recomendado por la OMS, para considerar que una persona está protegida contra el virus.

Con la aprobación del los miembros del Comité Tutorial



Co-director externo

Dr. Álvaro Aguilar Setién

Investigador Titular

Unidad de Investigación Médica en

Inmunología, Hospital de pediatría

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.



Co- director interno

Dr. Ricardo López Wilchis

Investigador Titular

Departamento de Biología

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa.



Asesora

M en M. María Martha García Flores

Químico Clínico

Unidad de Investigación Médica en

Inmunología, Hospital de pediatría

Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.