



UNIVERSIDAD LATINA DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

TESIS

“Caracterización de la respuesta inmune celular frente al virus del Dengue (DENV-2 y DENV-4), mediante Citometría de flujo espectral en co-cultivos autólogos de monocitos-linfocitos”

Proyecto final de graduación presentado como requisito para optar por el título de
Licenciatura en Tecnología Médica en la Universidad Latina de Panamá

Natasha Sánchez
4-772-1991

Profesor Asesor:
Mauricio Perea

Asesores Externos:
Davis Beltrán
Rita Corrales

Panamá, República de Panamá

2026

Dedicatoria

Gracias a mis padres Venancio Sánchez y Tamara Hernández, por confiar en mí en esta nueva etapa académica, por brindarme su apoyo incondicional, por ser mi fuerza para seguir adelante y mi motivo para superarme. Cada esfuerzo y cada logro alcanzado es por ustedes.

A mis amistades, que siempre estuvieron ahí cuando más perdida me sentía y que siempre me brindaron su tiempo para escucharme y aconsejarme.

A mis mascotas, cuya compañía silenciosa hicieron más llevaderos los momentos de estrés y cansancio. Gracias por estar siempre presentes, por regalarme tranquilidad en los días más difíciles.

Finalmente, agradecida con Dios por todas las personas que pone en mi vida y que me apoyan en cada decisión que tomo.

Con todo mi amor y gratitud.

Agradecimiento

Expreso mi más sincero agradecimiento a mis asesores del Instituto Conmemorativo Gorgas de la Salud, Rita Corrales y Davis Beltrán, por su valiosa orientación, acompañamiento académico y disposición durante el desarrollo de este trabajo de investigación. Agradezco profundamente la confianza depositada en mí y la oportunidad brindada para realizar la pasantía en el Centro de Citometría de Flujo, la cual fue fundamental para mi formación profesional y para la ejecución de esta tesis.

Sus conocimientos, enseñanzas y apoyo constante contribuyeron de manera significativa a mi crecimiento académico y al fortalecimiento de mis competencias en el área de investigación científica.

Tabla de Contenido

Introducción.....	10
Resumen	12
Abstract.....	14
Capítulo 1.0 El problema.....	16
1.1 Antecedentes del problema de investigación	16
1.4 Objetivos	23
1.4.1 Objetivo general.....	23
1.4.2 Objetivos específicos	23
1.5. Alcance	24
1.6 Limitaciones de la investigación	24
Capítulo 2.0 Marco teórico.....	26
2.1 Antecedentes de investigaciones realizadas en el tema.....	26
2.1.1. Respuesta Inmune Celular frente al DENV	26
2.1.2. Citometría de flujo espectral como herramienta de caracterización inmunológica de alta dimensionalidad	30
2.1.3. Antecedente directo de la presente investigación	34
2.2. Bases teóricas	35
2.2.1 Virus del Dengue.....	35
2.2.2 Patogénesis del DENV	41
2.2.3 Respuesta inmune innata.....	44
2.2.4 Respuesta inmune humoral	47
2.3. Variable.....	48
2.3.1 Definición conceptual de la variable	48
2.3.2 Definición operacional de la variable.....	49
2.3.3 Mapa de variables	50
2.4. Glosario de términos:	50
Capítulo 3.0 Marco metodológico	53
3.1 Tipo y diseño de la investigación	53
3.2 Población y muestra (o universo de estudio)	53
3.6 Procedimiento de la investigación	53

3.6.1. Producción viral.....	53
3.6.4. Titulación viral	58
3.6.5 Separación de PBMCs	61
3.6.6. Separación celular por perlas magnéticas	63
3.6.7 Infección de monocitos y establecimiento del co-cultivos autólogos de monocitos-linfocitos.....	67
3.6.8. Estandarización de panel de citometría de flujo espectral.	69
3.6.8.1. Titulación de anticuerpos.	69
3.6.8.2 Citometría de flujo espectral.....	72
3.6.8.3. Análisis de datos de citometría de flujo	74
Capítulo 4.0 Análisis e interpretación de los resultados	78
4.0.1. Producción y titulación de los serotipos DENV-2 y DENV-4	78
4.0.2. Estandarización del modelo de co-cultivo autólogo de monocitos -linfocitos	79
4.0.3. Estandarización del panel multiparamétrico para citometría de flujo espectral.....	81
4.0.4. Caracterización fenotípica de la respuesta inmune frente a DENV-2 y DENV-4.....	84
Discusión	87
Conclusiones.....	94
Recomendaciones.....	96
Bibliografía.....	97

Índice de figuras

Figura 1. Esquema general de un citómetro de flujo	31
Figura 2. Parámetros en citometría de flujo.....	32
Figura 3. Comparación entre la compensación convencional y la citometría espectral.....	33
Figura 4. Ciclo de transmisión del virus del dengue	38
Figura 5. Organización estructural y genómica del virus del dengue (DENV)	40
Figura 6. Ciclo replicativo del virus del dengue (DENV)	43
Figura 7. Respuesta inmunitaria temprana durante la infección por el virus del dengue	45
Figura 8. Cultivo de células Vero con una confluencia aproximada del 80% previo a la inoculación viral (Microfotografía en campo claro (10x))	54
Figura 9. Producción en células Vero (Microfotografía en campo claro (10x))	55
Figura 10. Cosecha de los serotipos DENV-2 (cepa: 487625, v3) y DENV-4 (cepa: 400654, v4)	57
Figura 11. Cultivo de células BHK con una confluencia aproximada del 80% (Microfotografía en campo claro (10x)) previa a la infección	59
Figura 12.. Procedimiento de ensayo de formación de placas virales en células BHK.....	60
Figura 13. Titulación de los serotipos DENV-2 (cepa: 487625, v3) y DENV-4 (cepa: 400654, v4)	61
Figura 14. Procedimiento para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll.....	63
Figura 15. Procedimiento para el aislamiento de monocitos CD14+, mediante separación magnética (MACS).....	65
Figura 16. Microfotografía en campo claro (10x) de linfocitos obtenidos en la fracción no retenida (flow-through), tras separación inmunomagnética en RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%.	66
Figura 17. Comparación de monocitos no infectados vs. monocitos infectados..	68

Figura 18. Determinación de población negativa de la población positiva, utilizando criterio Stain Index.....	70
Figura 19. Tinción de células con un cóctel de anticuerpos de superficie para la identificación y caracterización fenotípica de subpoblaciones celulares, mediante citometría de flujo espectral.....	74
Figura 20. Estrategia de exclusión secuencial.	75
Figura 21. Estrategia de exclusión secuencial para identificación de poblaciones específicas	76
Figura 22. Formación de placas virales para los serotipos DENV-2 y DENV-4 en células BHK.....	78
Figura 23. Análisis representativo de la titulación de anticuerpos, mediante concatenación de archivos FCS en flowJo.....	83
Figura 24. Expresión de marcadores asociados con reconocimiento inmunológico, activación y citotoxicidad tras infección con DENV-2 y DENV-4	86

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Clasificación modificada de la gravedad del dengue, OPS/OMS</i>	36
Tabla 2. Mapa de variables.....	50
Tabla 3. Panel multiparamétrico de citometría de flujo espectral para la evaluación de poblaciones inmunes y respuesta citotóxica frente a la infección de dengue ..	70
Tabla 4. Recuento celular de monocitos CD14+ y linfocitos autólogos utilizados en el establecimiento del co-cultivos por donante	80

Introducción

El dengue es una arbovirosis transmitida al ser humano mediante la picadura de mosquitos del género *Aedes* (*A. aegypti* y *A. albopictus*), con una carga global estimada de aproximadamente 390 millones de infecciones anuales, de las cuales 96 millones presentan manifestaciones clínicas evidentes, lo que lo posiciona como una de las enfermedades de mayor impacto en salud pública a nivel mundial (Cadena 2020; CDC 2025). El agente etiológico comprende cuatro serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, genéticamente relacionados, pero antigénicamente distintos (Galindo et al., 2023). Las manifestaciones clínicas son heterogéneas y pueden oscilar desde cuadros asintomáticos o febriles autolimitados hasta formas potencialmente mortales como dengue con signos de alarma y dengue grave (Fernandes y Leal ,2022).

La inmunidad innata constituye la primera barrera de defensa del organismo frente a los patógenos (Dhole et al., 2024). Los monocitos circulantes, las células dendríticas (CD) y los macrófagos tisulares constituyen las principales células diana del DENV (Fernandes y Leal, 2022). La infección primaria desencadena respuestas de linfocitos T y B con generación de memoria inmunológica; mientras que ante una reinfección por el mismo serotipo la respuesta es eficaz, una infección secundaria por un serotipo heterólogo puede resultar en una reacción cruzada de anticuerpos que, al no neutralizar adecuadamente el virus, favorece el fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE), comprometiendo la

eficiencia en la eliminación viral y asociándose a formas más graves de la enfermedad (Khan et al., 2023)

La necesidad de identificar oportunamente los casos con mayor riesgo de progresión a dengue grave ha impulsado la búsqueda de biomarcadores predictivos que orienten las intervenciones clínicas y reduzcan la mortalidad (Pradeep et al., 2021). En este contexto, la citometría de flujo emerge como una herramienta de alto valor para la caracterización inmunológica de alta resolución. Esta tecnología analiza células en suspensión al hacerlas pasar por un haz láser que detecta sus propiedades físicas y químicas mediante parámetros de dispersión frontal (FSC) asociado al tamaño celular y lateral (SSC) reflejo de la complejidad interna, lo que permite identificar y diferenciar poblaciones como eritrocitos, leucocitos y plaquetas, así como diversas subpoblaciones leucocitarias (Brestoff, 2023). Su aplicación en el estudio del dengue favorece el descubrimiento de biomarcadores con utilidad diagnóstica, pronóstica y terapéutica (Waijij et al., 2025).

Con base en lo anterior, se plantea el proyecto titulado "Caracterización de la respuesta inmune celular frente a DENV-2 y DENV-4 mediante citometría de flujo espectral en co-cultivos autólogos de monocitos-linfocitos", el cual contempla la infección in vitro de células inmunes primarias humanas y su posterior análisis mediante citometría espectral de alta resolución.

Resumen

El dengue es una arbovirosis con un alto impacto en la salud pública, causada por cuatro serotipos que están genéticamente relacionados, pero antigénicamente distintos (DENV-1 a DENV-4) y es transmitidos por mosquitos del género *Aedes*. En Panamá, la reintroducción del serotipo DENV-4 en 2023 tras 20 años sin circulación, junto a la co-circulación de DENV-1, DENV-2 y DENV-3, configuró un escenario complejo. Este fenómeno de hiperendemicidad aumenta el riesgo de infecciones secundarias y del fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE). Unas de las problemáticas actuales es la ausencia de modelos animales adecuados y tratamientos antivirales específicos, los modelos *in vitro* con células inmunes humanas primarias son herramientas esenciales para comprender la inmunopatogénesis viral. En este contexto, este estudio busco caracterizar la respuesta inmune celular frente a DENV-2 y DENV-4 mediante citometría de flujo espectral en co-cultivos autólogos de monocitos-linfocitos de 7 donantes sanos. Ambos serotipos fueron producidos en células Vero y titulados en células BHK por ensayo de placas; los monocitos CD14⁺ fueron aislados por selección magnética positiva a partir de PBMCs, infectados *in vitro* a MOI 0.5 y co-cultivados en proporción 1:2 con sus linfocitos autólogos. Se diseñó y estandarizó un panel multiparamétrico de 22 marcadores de superficie e intracelulares adquirido en el citómetro Cytek Northern Lights®. La estandarización del panel fue una etapa crítica: se titularon individualmente los anticuerpos utilizando el Stain Index como criterio de selección, evaluados en FlowJo™ v10.10.1. La evaluación computacional en Cytek Cloud arrojó un Stain Index global de 16.19, garantizando adecuada separación espectral. Este proceso permitió identificar y excluir

interferencias irresolubles como las del HLA-ABC/Streptavidin PerCP-eFluor 710, demostrando que el diseño computacional no sustituye la validación experimental. Se analizaron marcadores de activación, citotoxicidad y reconocimiento inmunológico: Nectin-2, DNAM-1, perforina, LAMP-1, TNF- α y NS3 en monocitos, linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y células NK. Aunque no se alcanzó significancia estadística, se observaron tendencias biológicamente plausibles. Este trabajo aporta un protocolo estandarizado de citometría espectral para el estudio de la inmunopatogénesis del dengue y sienta las bases para la identificación de biomarcadores con potencial diagnóstico y pronóstico.

Abstract

Dengue is an arboviral disease with a significant public health impact, caused by four genetically related yet antigenically distinct serotypes (DENV-1 through DENV-4) and transmitted by *Aedes* mosquitoes. In Panama, the reintroduction of the DENV-4 serotype in 2023 following a 20 year absence of circulation combined with the co-circulation of DENV-1, DENV-2, and DENV-3, created a complex scenario. This state of hyperendemicity increases the risk of secondary infections and the phenomenon of antibody-dependent enhancement (ADE). Given the current lack of suitable animal models and specific antiviral treatments, *in vitro* models using primary human immune cells serve as essential tools for understanding viral immunopathogenesis. In this context, this study sought to characterize the cellular immune response to DENV-2 and DENV-4 using spectral flow cytometry in autologous monocyte-lymphocyte co-cultures from seven healthy donors. Both serotypes were propagated in Vero cells and titrated in BHK cells by plaque assay; CD14⁺ monocytes were isolated by positive magnetic selection from PBMCs, infected *in vitro* at MOI 0.5, and co-cultured in a 1:2 ratio with their autologous lymphocytes. A 22-marker multiparametric panel of surface and intracellular markers was designed and standardized for acquisition on a Cytex Northern Lights® spectral cytometer. Panel standardization was a critical stage: individual antibody titration was performed using the Stain Index as the selection criterion, evaluated in FlowJo™ v10.10.1. Computational evaluation in Cytex Cloud yielded a global Stain Index of 16.19, ensuring adequate spectral separation. This process

enabled the identification and exclusion of unresolvable spectral interferences — such as those from HLA-ABC/Streptavidin PerCP-eFluor 710, demonstrating that computational panel design does not replace experimental validation. Activation, cytotoxicity, and immunological recognition markers: Nectin-2, DNAM-1, perforin, LAMP-1, TNF- α , and NS3 were analyzed in monocytes, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, and NK cells. Although no statistically significant differences were observed, biologically plausible trends were identified. This work provides a standardized spectral flow cytometry protocol for studying dengue immunopathogenesis and lays the groundwork for identifying biomarkers with diagnostic and prognostic potential.

Capítulo 1.0 El problema

1.1 Antecedentes del problema de investigación

La gravedad del dengue es multifactorial; entre los elementos propuestos se encuentran las infecciones secundarias, la edad del paciente, la carga viral y las características del virus circulante, específicamente su serotipo y genotipo (Yung et al., 2015). La respuesta inmunitaria del hospedador desempeña un papel clave en la evolución de la enfermedad, ya que la interacción entre el virus del dengue y el sistema inmune puede generar manifestaciones clínicas que van desde cuadros febriles leves hasta formas severas, como el dengue grave (Morales et al., 2026). La circulación simultánea de varios serotipos del virus del dengue, fenómeno conocido como hiperendemicidad, se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de los países afectados, lo que ha favorecido un aumento en la frecuencia de brotes epidémicos en los que intervienen múltiples serotipos de manera concurrente (Ross, 2010).

Durante la respuesta inmunitaria se liberan citocinas proinflamatorias que, junto con la acción de anticuerpos heterólogos, el sistema del complemento y diversas poblaciones celulares, contribuyen al daño endotelial y a las alteraciones de la coagulación características del dengue (Pardo et al., 2018). En las etapas tempranas de la infección, la inmunidad innata particularmente el interferón tipo I (IFN tipo I) y las células NK cumple un papel fundamental al restringir rápidamente la propagación viral y modular las respuestas adaptativas específicas frente al antígeno, favoreciendo así una eliminación más eficiente del patógeno (Beltrán y

López-Vergès, 2014). Sin embargo, cuando esta primera línea de defensa resulta insuficiente o es evadido por el DENV, la progresión hacia formas graves de la enfermedad se relaciona con una respuesta exacerbada del sistema inmunitario, esto se evidenciada por la elevación de diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias, entre ellas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-8 y MCP-1 (Lee et al., 2022).

En este contexto, los monocitos CD14+ desempeñan un rol dual como células dianas del virus del dengue, y como vehículos de diseminación viral hacia tejidos periféricos. De manera similar, las células dendríticas infectadas por DENV experimentan activación y liberan citocinas proinflamatorias; no obstante, lo hacen sin secreción de IFN- α/β citocina esencial para la activación de linfocitos T, comprometiendo así la eficiencia de la respuesta antiviral adaptativa (Bos et al., 2024). Esta disfunción inmunitaria converge en el elemento fisiopatológico central del dengue grave: la lesión del endotelio vascular, que provoca un aumento de la permeabilidad capilar manifestado clínicamente mediante fuga de plasma, alteraciones en los mecanismos de coagulación y compromiso multiorgánico (Cáceres et al., 2019).

En el plano de la inmunidad humoral, los anticuerpos neutralizantes (nAb) constituyen el principal mecanismo de protección frente a la reinfección, al actuar sobre las proteínas estructurales prM y E del virus (Lee et al., 2022). No obstante, dicha protección es estrictamente serotipo-específica: una infección primaria genera memoria inmunitaria frente al serotipo homólogo, pero no confiere

inmunidad cruzada ante serotipos heterólogos, lo que mantiene al huésped susceptible ante una exposición posterior a un serotipo distinto (Sarker et al., 2023). Ante una infección secundaria, los anticuerpos preexistentes no solo pierden su capacidad neutralizante, sino que pueden facilitar activamente la entrada viral en células que expresan receptores Fc monocitos, macrófagos y células dendríticas mediante el fenómeno de amplificación dependiente de anticuerpos (ADE), intensificando la viremia y la liberación de mediadores inflamatorios (Rodenhuis et al., 2010).

La magnitud de este efecto guarda relación directa con el título de anticuerpos circulantes: los títulos intermedios se asocian con mayor severidad clínica, mientras que los títulos elevados de nAb con reactividad cruzada confieren protección frente a la reinfección (Katzelnick et al., 2017). Finalmente, cabe destacar que la patogénesis del dengue no depende exclusivamente de la respuesta inmunitaria, sino que también está modulada por factores como la virulencia del serotipo infectante, la edad, el origen étnico del individuo y las condiciones epidemiológicas del entorno (Rodenhuis et al., 2010).

Paralelamente, la inmunidad celular mediada por linfocitos T y monocitos ha sido reconocida como un componente determinante tanto en el control viral como en la inmunopatogénesis del dengue. Se ha documentado la presencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con especificidad por serotipo y con reactividad cruzada entre serotipos, así como la existencia de clones T CD4⁺ citotóxicos en individuos con

inmunidad natural (Guzmán y Kourí, 2004). Asimismo, los monocitos CD14⁺ han sido identificados como productores de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6, observándose una mayor proporción de estas células activadas en pacientes con formas graves de la enfermedad (Delgado et al., 2014). No obstante, la caracterización funcional comparativa de estas poblaciones celulares frente a diferentes serotipos del dengue, particularmente DENV-2 y DENV-4, mediante modelos in vitro sigue siendo un área con información limitada. Esto se debe a que no se ha logrado desarrollar un modelo animal adecuado para la infección por DENV viéndose obstaculizado por el bajo nivel o la falta de replicación de aislados clínicos de DENV en ratones de tipo salvaje (WT) y la falta de enfermedad clínica en primates no humanos (PNH) (Zompi y Harris, 2012). En estudios previos demostró que la infección por DENV-2 en ratones AG129 (que carecen de receptores de IFN de tipo I y II) produce parálisis, condición del sistema nervioso central que no se observa frecuentemente en casos de dengue en humanos (Kayesh y Tsukiyama-Kohara, 2022).

Para abordar esta brecha, la citometría de flujo (FCM), considerada una tecnología unicelular multiparamétrica y de alto rendimiento, se ha consolidado como una herramienta esencial en la investigación biomédica y el diagnóstico clínico, gracias a su capacidad para analizar propiedades físicas celulares, como el tamaño y la complejidad, así como características bioquímicas, incluyendo marcadores de superficie y proteínas intracelulares (Zhou et al., 2026). En particular, la citometría de flujo espectral representa un avance significativo respecto a los sistemas

convencionales, ya que permite analizar simultáneos fluorocromos mediante la captura del espectro de emisión completo de cada fluorocromo, e incorpora la sustracción de la autofluorescencia celular para mejorar la resolución de las señales (Martínez 2022; D. Bonilla 2024). Estas capacidades amplían considerablemente las posibilidades de detección y clasificación celular, abriendo nuevas oportunidades en la investigación, el diagnóstico y el desarrollo terapéutico (Robinson et al, 2023).

1.2 Planteamiento del problema

En América Latina, alrededor de 500 millones de personas están en riesgo de infectarse con el virus del dengue (OPS, 2025). Se estima que entre 100 y 400 millones de personas en todo el mundo contraen el virus del dengue. En Panamá, la situación epidemiológica ha alcanzado niveles críticos sin precedentes: en 2023 se registró el mayor número de casos en 30 años con 16,211 casos confirmados, de los cuales 91% fueron clasificados como dengue sin signos de alarma y 9% con signos de alarma (Chen-Germán et al., 2024). Esta tendencia se agravó dramáticamente en el período 2024-2025, acumulándose 41,338 casos y 72 muertes hasta noviembre de 2025 (Minsa, 2025). La complejidad epidemiológica se intensificó con la reintroducción del serotipo DENV-4 en 2023 tras 20 años sin circulación, sumándose a la transmisión simultánea de DENV-1, DENV-2 y DENV-3, configurando un escenario de hiperendemicidad que aumenta exponencialmente el riesgo de infecciones secundarias y dengue grave por ADE (Chen-Germán et al., 2024).

En la actualidad, el mecanismo de virulencia del DENV es poco comprendido, ya que solo los humanos desarrollan los síntomas y no existe modelo animal para realizar estudios debido a que la sintomatología de la enfermedad (leve o grave) debido a que ningún otro animal sufre manifestaciones clínicas similares (Rico-Hesse, 2009; Martina et al., 2009). Se conoce que el DENV en humanos puede inhibir eficazmente la respuesta de interferón (IFN), replicarse y causar enfermedad, en ratones no consigue bloquear adecuadamente esta respuesta inmunitaria. Por ello, los ratones de tipo salvaje (WT) generalmente no permiten una replicación eficiente del virus ni desarrollan la enfermedad (Schmid et al., 2014). Sin embargo, los estudios in vitro en cultivos celulares con DENV han permitido que se entienda un poco más respecto a las alteraciones producidas por este virus (Valdivieso et al., 2022).

La necesidad de diagnosticar tempranamente a pacientes con dengue grave para facilitar el tratamiento ha dado lugar a investigaciones para identificar biomarcadores como el TNF- α , el IP-10, la IL-6 y la IL-10 de monocitos y granulocitos, junto con el TNF- α , el IP-10, la IL-10 y el IFN- γ de los subconjuntos de células NK y NKT, que predigan la progresión de la enfermedad (Pradeep et al., 2021). Actualmente, no existe una vacuna que pueda reducir eficazmente la gravedad de la enfermedad causada por todos los serotipos, convirtiéndose en una consecuencia grave y potencialmente mortal para las personas que padecen esta enfermedad (Sinha et al., 2024).

1.3 Justificación de la investigación

En Panamá se ha documentado recientemente la reintroducción del serotipo DENV-4, lo que ha incrementado la incidencia de infección por dengue y gravedad de la enfermedad. Esto se le atribuye a su co-circulación con los otros serotipos del virus (DENV-1, DENV-2 y DENV-3) (Chen-Germán et al., 2024). Los mecanismos subyacentes aún no están del todo claros; se cree que una activación inmunitaria excesiva mediada por citocinas podría ser responsable de los principales hallazgos en la gravedad de la enfermedad (Fernández et al., 2025). Por lo tanto, la comprensión de la reacción inmunológica de la protección contra la infección por DENV es el prerrequisito para el avance en el desarrollo de vacunas eficaces contra el virus (Khanam et al., 2022). En este sentido, la citometría de flujo espectral permite comprender el papel que juegan la inmunidad y la adaptabilidad en el avance o manejo de la enfermedad (Pérez et al., 2018).

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), compuestas por linfocitos T, linfocitos B, células NK y monocitos, constituyen componentes fundamentales del sistema inmunitario debido a su participación en la defensa frente a diversos agentes patógenos. En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo caracterizar la respuesta inmune celular frente a los serotipos DENV-2 y DENV-4, utilizando co-cultivos autólogos de monocitos y linfocitos humanos; serán analizados mediante citometría de flujo espectral. Este estudio se realizará bajo condiciones controladas in vitro, limitándose al análisis de marcadores celulares y funcionales previamente definidos, de acuerdo con la

disponibilidad de recursos técnicos, reactivos y equipamiento especializado. No se abordarán aspectos clínicos directos en pacientes ni estudios poblacionales a gran escala, centrándose exclusivamente en la respuesta inmune celular asociada a estos dos serotipos del virus del dengue.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Caracterizar la respuesta inmune celular frente al virus del Dengue (DENV-2 y DENV-4), mediante citometría de flujo espectral en co-cultivos autólogos de monocitos-linfocitos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Producir y titular DENV-2 y DENV-4 en células BHK.
- Establecer Co-cultivos autólogos de monocitos-linfocitos infectados con DENV-2 y DENV-4, utilizando monocitos CD14⁺ aislados por selección magnética con columnas.
- Analizar mediante citometría de flujo espectral la activación celular, la expresión de marcadores de superficie y la producción de citoquinas en las subpoblaciones inmunes infectadas con DENV-2 y DENV-4.
- Obtener un protocolo estandarizado por citometría de flujo espectral para detección de subtipos celulares en infección por dengue.

1.5. Alcance

La presente investigación tuvo como alcance evaluar la respuesta inmunológica y la interacción celular frente a la infección por el virus del dengue (DENV-2 y DENV-4) mediante un modelo *in vitro*, mediante citometría de flujo espectral en co-cultivos autólogos de linfocitos y monocitos obtenidos de 7 donantes sanos. El estudio permitió analizar marcadores inmunológicos y mecanismos asociados a la respuesta antiviral, contribuyendo al entendimiento de los procesos celulares implicados durante la infección por DENV. Asimismo, los hallazgos obtenidos pueden servir como base para futuras investigaciones orientadas al estudio de la inmunopatogénesis del dengue y al desarrollo de estrategias terapéuticas o de monitoreo inmunológico.

1.6 Limitaciones de la investigación

Entre las limitaciones de esta investigación, se encuentra el uso de un modelo *in vitro*, el cual, aunque permite evaluar de manera controlada diversos mecanismos celulares e inmunológicos, no reproduce completamente la complejidad de la infección *in vivo*, donde intervienen múltiples factores fisiológicos y del microambiente inmunológico. Asimismo, el estudio se centró únicamente en los serotipos DENV-2 y DENV-4, por lo que no se incluyeron los serotipos DENV-1 y DENV-3, lo que limita una visión comparativa completa de la respuesta inmune frente al virus del dengue en su conjunto.

Por último, el desarrollo de los experimentos dependió de la cantidad y viabilidad de células obtenidas de los “conos” de cada donante. La cantidad y viabilidad de

las células recuperadas pueden variar entre muestras, afectando la disponibilidad de monocitos y linfocitos necesarios para la ejecución de los ensayos y la realización de réplicas experimentales, constituyendo una limitación metodológica del estudio.

1.6. Línea de investigación a la que pertenece el estudio

La presente investigación pertenece a la línea de investigación de Hematología e Inmunología Clínica aprobado por la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Latina de Panamá para la carrera de Tecnología Médica, específicamente en los subtemas de inmunología y citometría de flujo, ya que tiene como propósito la caracterización de la respuesta inmune celular frente al virus del dengue (DENV-2 y DENV-4) mediante citometría de flujo espectral en co-cultivo autólogo de monocitos-linfocitos.

De manera complementaria, el estudio se relaciona con la línea de investigación Gestión de los servicios de laboratorio, ya que se contempló la estandarización y optimización de un protocolo de citometría de flujo espectral.

Capítulo 2.0 Marco teórico

2.1 Antecedentes de investigaciones realizadas en el tema

2.1.1. Respuesta Inmune Celular frente al DENV

La respuesta inmune innata frente al dengue comprende una acción coordinada en la que intervienen receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como TLR2, citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17) e inmunomoduladoras como IL-10, junto con poblaciones celulares especializadas que incluyen monocitos intermedios y células Th17 (Dash et al., 2024). Tras la picadura del mosquito infectado, el virus replica en macrófagos, monocitos y células de Langerhans presentes en la piel; estas células reconocen componentes virales mediante PRR, lo que desencadena la activación de mediadores inmunitarios e inicia la respuesta antiviral del hospedero (Dhole et al., 2024). La interacción entre los PAMP y sus respectivos PRR activa múltiples vías de señalización intracelular que culminan en la producción de citocinas proinflamatorias e interferón tipo I (IFN-I), favoreciendo el desarrollo de respuestas inmunes adaptativas orientadas al control viral (Castillo y Urcuqui, 2015). Los monocitos, lejos de constituir una población homogénea, se clasifican en subpoblaciones clásica (CD14⁺⁺CD16⁻), intermedia (CD14⁺⁺CD16⁺) y no clásica (CD14⁺CD16⁺⁺), cada una con funciones diferenciadas durante la inflamación (Naranjo et al., 2019). En este sentido, Wong et al. (2012) demostraron que los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α producidos por los monocitos CD14⁺CD16⁺⁺ son significativamente más elevados que los generados por los monocitos CD14⁺⁺CD16⁻ en respuesta al virus dengue, lo que subraya el papel diferencial de cada subpoblación en la inmunopatología de la enfermedad.

La captura y presentación de antígenos a los linfocitos T es mediada por las DC mieloides (mDC) (Lin-HLA-DR⁺, CD11c⁺, CD123⁺) (Dash et al., 2024). La activación de linfocitos T ha sido documentada como un componente central de la respuesta inmune antiviral, a través de la producción de citocinas y el despliegue de mecanismos de citotoxicidad celular (Mathew et al., 2014). Las células T CD8⁺ responden principalmente contra las proteínas no estructurales NS3 y NS5, conservadas entre los diferentes serotipos del DENV, mientras que las células T CD4⁺ coordinan la respuesta inmunitaria mediante la producción de citocinas y el apoyo a la activación de células B y la síntesis de anticuerpos, reconociendo epítomos en proteínas estructurales y en proteínas no estructurales como el antígeno NS1 (Ghosh et al., 2025). Se ha demostrado además que células T CD4⁺ y CD8⁺ pueden presentar reactividad cruzada entre serotipos, y que una infección previa puede generar células de memoria que, durante una infección secundaria por un serotipo heterólogo, favorecen la activación del complemento y el incremento de la infección en células monocíticas, dando como resultado la producción de citocinas proinflamatorias que pueden aportar, junto con la respuesta de las células T CD8⁺, a una liberación perjudicial de citocinas (Martina et al., 2009; Robinson et al., 2026).

Un subconjunto especializado de linfocitos T CD4⁺ las células T foliculares auxiliares (Tfh) ha sido implicado en el impulso de respuestas protectoras de células B y anticuerpos en los centros germinales. Sin embargo, el conocimiento

sobre el papel y la magnitud de la respuesta Tfh en la infección por DENV permanece limitado (Ansari et al., 2025). La progresión hacia formas graves del dengue se ha asociado, además, con alteraciones en la cinética de activación del sistema inmune innato, señalando a las células NKT IFN- γ^+ CD56 $^+$ CD3 $^+$ y los granulocitos IL-6 $^+$ como posibles biomarcadores tempranos con capacidad predictiva (Pradeep et al., 2021). En infecciones secundarias, las respuestas inflamatorias resultan más exacerbadas y desreguladas, con niveles elevados de IFN- γ , IL-6, CXCL5, CXCL9, CCL17 y VCAM-1 (Castillo et al., 2026). Otros estudios han revelado que las células T participan tempranamente en la respuesta frente a la infección por DENV y pueden ejercer efectos tanto protectores como patogénicos. En infecciones secundarias, las células T de reactividad cruzada predominan, favoreciendo una eliminación viral deficiente y una producción excesiva de citocinas proinflamatorias, lo que contribuye al desarrollo de dengue severo (Dash et al., 2024).

Las células NK constituyen otro componente relevante de la respuesta innata frente al DENV. Las células NK activadas pueden controlar la infección viral mediante la destrucción de células infectadas y la producción de interferón gamma (IFN- γ) (Costa et al., 2017). Durante la infección aguda, tanto las células NK CD56 $^{\text{bright}}$ como una subpoblación CD56 $^{\text{dim}}$ exhiben una respuesta robusta mediada principalmente por IL-18, cuyos niveles elevados en plasma y tejido cutáneo activan la señalización vía IL-18R (Zimmer et al., 2019). Estos estudios evidenciaron una mayor proporción de células CD56 $^+$ CD69 $^+$ en pacientes con

dengue grave en comparación con aquellos que presentaban dengue leve (Mathew, 2018). Estas células poseen distintos receptores, entre ellos los receptores citotóxicos naturales (NKp30, NKp44 y NKp46) y los receptores tipo lectina NKG2. Algunos receptores NKG2 pueden activar o inhibir la respuesta inmunitaria; por ejemplo, NKG2D reconoce ligandos inducidos por estrés celular, como MICA/B y ULBP (Taechasan et al., 2024). Sin embargo, los estudios de asociación del genoma completo han identificado a MICA y MICB, ligandos del receptor NKG2D, como genes relacionados con la susceptibilidad al síndrome de choque por dengue (Costa et al., 2017).

En otro contexto, las células B de memoria específicas frente al DENV pueden mantenerse en circulación durante años; sin embargo, predominan aquellas que producen anticuerpos con reactividad cruzada y escasa o nula capacidad neutralizante, mientras que los anticuerpos altamente neutralizantes corresponden a poblaciones poco frecuentes (Ansari et al., 2025). Ante una infección secundaria, las células B y T de memoria generadas durante el primer contacto viral modifican la rapidez y especificidad de la respuesta inmunitaria a través del fenómeno conocido como pecado antigénico original, el cual puede suprimir o retrasar la eliminación viral al redirigir la respuesta hacia epítopos del serotipo previo (Rothman, 2011; Robinson et al., 2026).

Los anticuerpos preexistentes, lejos de neutralizar el virus heterólogo, pueden facilitar su entrada en células con receptores Fc monocitos, macrófagos y células

dendríticas, incrementando la carga viral y desencadenando una activación exacerbada de células T con liberación masiva de mediadores inflamatorios, fenómeno conocido como amplificación dependiente de anticuerpos (ADE) (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). Mediante el uso de partículas similares al virus (VLPs) y citometría de flujo espectral, linfocitos B específicos frente al DENV han sido identificados tanto en ratones como en humanos, evidenciando el carácter dual de los anticuerpos: protector a títulos elevados con reactividad cruzada, y potencialmente patogénico a títulos intermedios frente a serotipos heterólogos (Segura et al., 2025). Un estudio prospectivo confirmó que los títulos de anticuerpos anti-DENV al momento de la infección secundaria son determinantes en la severidad del desenlace clínico (Katzelnick et al., 2017).

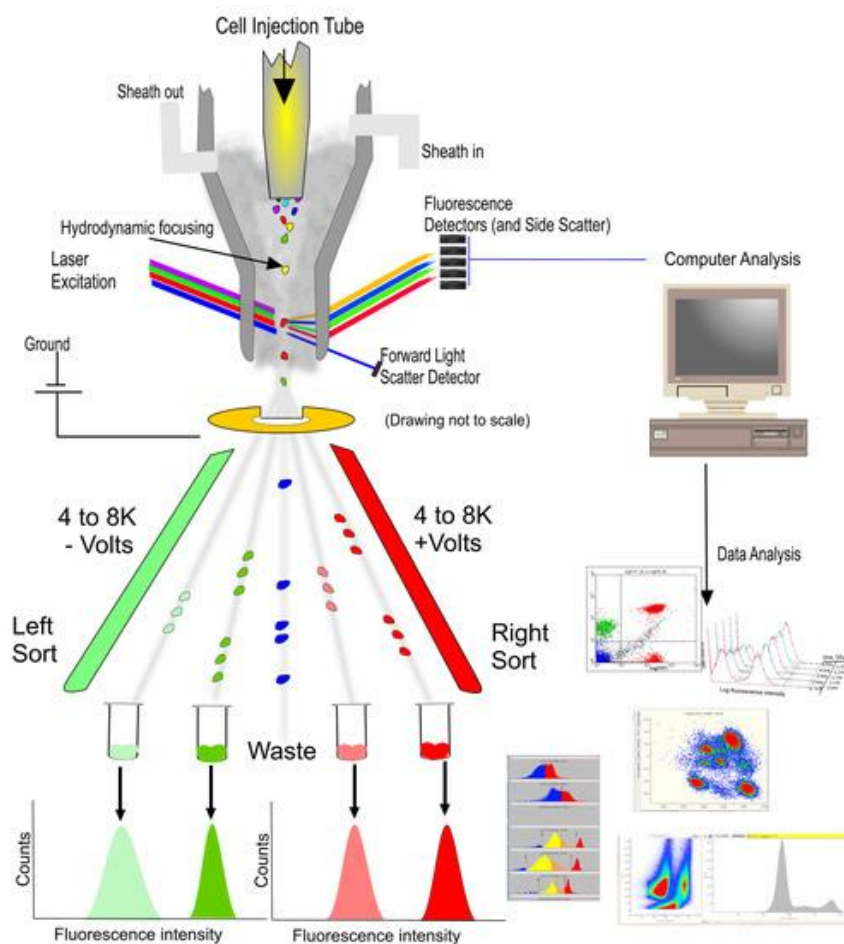
2.1.2. Citometría de flujo espectral como herramienta de caracterización inmunológica de alta dimensionalidad

La citometría de flujo es una técnica que se emplea en investigaciones biomédicas, que permite el uso de muestras biológicas, estudiando partículas o células en suspensión y que son analizadas de manera individual. Estas células pasan por un láser en el cual la luz incide en las células y se transforma en emisiones diferentes de longitudes de onda (Ramírez Orellana, 2012) (Figura 1). Esta técnica permite analizar múltiples parámetros de la población de interés, como el tamaño, granularidad, complejidad del citoplasma celular y proteínas que permiten la clasificación fenotípica y funcional de un gran número de células (Baquero et al., 2022) (Figura 2). Las señales asociadas al tamaño, la complejidad

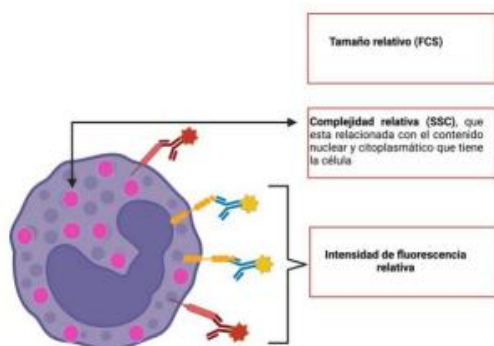
y la fluorescencia de cada célula son registradas individualmente a medida que estas atraviesan el haz láser, permitiendo un análisis célula por célula. Finalmente, dichas señales son transformadas en datos digitales que pueden ser analizados por computadora y visualizados de manera comprensible para el usuario, demostrando demostrado que es una técnica de gran utilidad en la caracterización inmunofenotípica (Sánchez et al., 2022; Marrero et al., 2025).

Figura 1.

Esquema general de un citómetro de flujo



Nota. Esta figura indica los tres sistemas que componen a un citómetro, así como el flujo del procesamiento de la señal y la detección (Robinson et al., 2023).

Figura 2.**Parámetros en citometría de flujo**

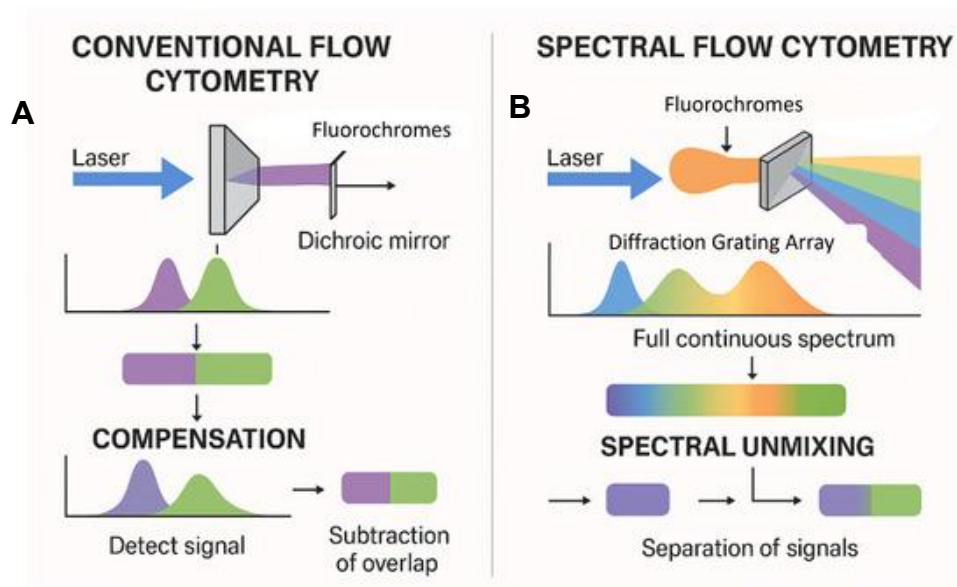
Nota. El tamaño de las células se evalúa a través de la dispersión frontal de la luz (FSC), producida al pasar la célula o partícula por el haz láser. En contraste, la dispersión lateral de la luz (SSC) refleja la complejidad estructural y la granularidad interna de las células (Uriostegui et al., 2022).

Sin embargo, se conoce que la implementación de la citometría de flujo espectral mejora las capacidades de la citometría convencional al analizar el espectro completo de fluorescencia de los fluoróforos y realizar su separación espectral (Figura 3). Esto permite evaluar un mayor número de marcadores en un mismo panel y facilita un análisis más detallado de las poblaciones celulares (Astakhova et al., 2025). Un hito en su aplicación clínica fue el año 1993, cuando los CDC incluyeron el recuento de células T CD4⁺ en los criterios diagnósticos del SIDA, impulsando el uso generalizado de la citometría de flujo en el seguimiento de pacientes con VIH/SIDA (Zhou et al., 2026). Desde entonces, su campo de aplicación se ha extendido al estudio de artritis reumatoide, leucemias, síndromes mielodisplásicos y diversas enfermedades infecciosas, incluido el dengue. La estandarización de metodologías para la cuantificación de títulos virales mediante

citometría convencional para DENV y ZIKA sentó las bases para el uso de esta técnica en el estudio de arbovirus (Holguín y Varela, 2020).

Figura 3.

Comparación entre la compensación convencional y la citometría espectral



Nota. (A) En la citometría convencional, la fluorescencia emitida por los fluorocromos es detectada mediante filtros ópticos específicos, lo que genera superposición espectral entre fluorocromos y requiere la aplicación de compensación para corregir las señales. **(B)** En contraste, la citometría espectral registra el espectro completo de emisión de cada fluorocromo mediante una rejilla de difracción y utiliza algoritmos de desmezcla espectral para separar las señales fluorescentes, permitiendo una mejor resolución y el análisis simultáneo de un mayor número de marcadores celulares. (Czechowka et al., 2025).

En el contexto específico del dengue, un estudio desarrolló y optimizó un ensayo de citometría de flujo para identificar células B de memoria específicas del DENV en modelos murinos y en PBMCs de pacientes pediátricos infectados

naturalmente. Los resultados mostraron que, tras una infección primaria, la respuesta de células B de memoria es principalmente serotipo-específica, mientras que después de una infección secundaria aumenta la reactividad cruzada, predominando durante la fase aguda una respuesta de anticuerpos ampliamente reactiva frente al DENV (Segura et al., 2025). Por otra parte, un estudio sobre vesículas extracelulares pequeñas (sEVs) derivadas de células C6/36 infectadas con DENV-2 demostró mediante citometría de flujo que la infección viral induce la producción de sEVs de mayor tamaño y concentración, caracterizadas por los marcadores CD9, CD61 y CD81, y asociadas con la proteína NS1 en el ambiente extracelular (Cordero, 2025). La citometría de flujo espectral representa un avance significativo respecto a los sistemas convencionales al capturar el espectro de emisión completo de cada fluorocromo y al mismo tiempo incorporar la sustracción de la autofluorescencia celular, lo que incrementa la resolución de las señales y amplía considerablemente las posibilidades de detección y clasificación multiparamétrica (Martínez, 2022; D. Bonilla, 2024; Robinson et al., 2023). Su aplicación en el estudio del dengue favorece el descubrimiento de biomarcadores con utilidad diagnóstica, pronóstica y terapéutica, abriendo nuevas oportunidades en investigación y desarrollo clínico.

2.1.3. Antecedente directo de la presente investigación

Existe un estudio previo que sirve como base directa para el desarrollo de esta tesis, titulado "Caracterización de la respuesta inmune celular frente al virus del Dengue (DENV-2 y DENV-4), mediante citometría de flujo espectral en co-cultivos autólogos de monocitos-linfocitos", realizado en el Instituto Conmemorativo

Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) por Davis Beltrán, Rita Corrales, Zumara Chaverra y Sandra López-Vergès. Dicho trabajo permitió identificar y caracterizar perfiles de activación celular, citotoxicidad y dinámica de interferones durante la infección por DENV-2 y DENV-4, mediante inmunofenotipificación de alta dimensión. La presente tesis busca ampliar y profundizar estos hallazgos mediante la incorporación de un panel más amplio de marcadores inmunológicos, con el objetivo de obtener una caracterización más detallada de las respuestas celulares involucradas y explorar nuevas rutas de activación y regulación inmunitaria que contribuyan a una mejor comprensión de la interacción huésped-virus en la infección por dengue (Beltran et al., 2025).

2.2. Bases teóricas

2.2.1 Virus del Dengue

El DENV se transmite a las personas por medio de la picadura de un mosquito *Aedes* hembra (*Ae. aegypti* y *Ae. Albopictus*) (Khanam et al., 2022) (figura 4). La infección primaria por DENV se caracteriza por ser asintomática o solo presentar fiebre leve, en caso de gravedad, puede causar coagulopatía, aumento de la fragilidad vascular y aumento de la permeabilidad. Entre los cuatro serotipos del DENV, los datos epidemiológicos indican que las infecciones secundarias por DENV-2 se relacionan con cuadros clínicos más graves en comparación con las infecciones causadas por DENV-4 (Hamlin et al., 2017). Las manifestaciones clínicas del dengue son heterogéneas y pueden progresar desde formas leves hasta cuadros potencialmente mortales. Según la clasificación vigente de la Organización Mundial de la Salud, el dengue se clasifica en tres categorías:

dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave, siendo esta última potencialmente mortal (Khan et al., 2023; OMS, 2009) (Tabla 1).

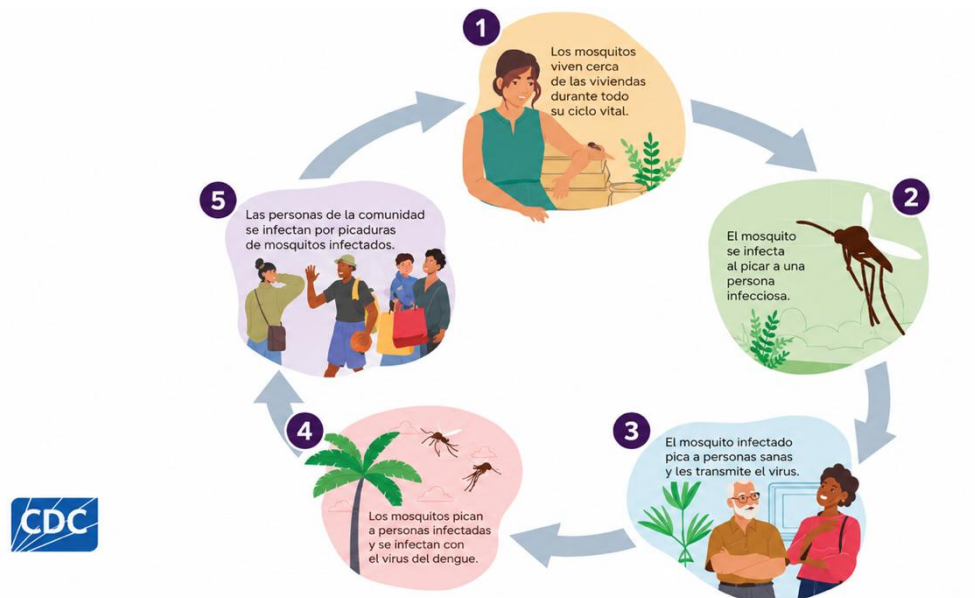
Tabla 1.

Clasificación modificada de la gravedad del dengue, OPS/OMS

Nota. OPS, 2019

Dengue sin signos de alarma (DSSA)	Dengue con signos de alarma (DCSA)	Dengue Grave (DG)
Persona que vive o ha viajado en los últimos 14 días a zonas con transmisión de dengue y presenta fiebre habitualmente de 2 a 7 días de evolución y 2 o más de las siguientes manifestaciones: 1. Náuseas/ vómitos 2. Exantema 3. Cefalea/ dolor retroorbitario 4. Mialgia / artralgia 5. Petequias o prueba del torniquete (+) 6. Leucopenia También puede considerarse caso todo niño o residente en zona con transmisión de dengue, con cuadro febril agudo, usualmente entre 2 a 7 días y sin foco aparente	Todo Caso de dengue que cerca y preferentemente de la caída de la fiebre presenta uno o más de los siguientes signos: 1. Dolor abdominal intenso o dolor a la palpación del abdomen 2. Vómitos persistentes 3. Acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico) 4. Sangrado de mucosas 5- Letargo / irritabilidad 6. Hipotensión postural (lipotimia) 7. Hepatomegalia >2 cm 8. Aumento progresivo del hematocrito	Caso de dengue tiene una o más manifestaciones: 1. Choque o dificultad respiratoria debido a extravasación grave de plasma. Choque evidenciado por: pulso débil o indetectable, taquicardia, extremidades frías y llenado capilar >2 segundos, presión de pulso ≤20 mmHg: hipotensión en fase tardía. Sangrado grave: según la evaluación del médico tratante (ejemplo: hematemesis, melena, metrorragia voluminosa, sangrado del sistema nervioso central (SNC)) 3. Compromiso grave de órganos, como daño hepático (AST o ALT ≥1000 UI), SNC (alteración de conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos

La confirmación de la infección por dengue se hace en laboratorio y se basa en el reconocimiento del material genético del virus (ARN viral), detección de las proteínas del virus (como NS1), el aislamiento viral o la presencia de anticuerpos específicos anti-dengue (DENV) en la sangre del paciente (OPS, 2025). En vista de que no existe un antiviral específico contra el dengue, el tratamiento dependerá de la gravedad de la infección (Baldi Mata et al., 2019). Por lo general, a los pacientes sin signos de alarma se les recomienda descanso, ingesta adecuada de líquidos y medicamentos de acuerdo con sus síntomas y, sobre todo, no utilizar AINES. Por otra parte, las personas con sintomatología de alarma necesitan tratamiento urgente y observación de hemorragias (Castaño, 2020). En la actualidad no se conoce tratamiento específico contra el dengue, y se ha utilizado como medida de prevención, el uso de vacunas para evitar que el virus se propague (Cadena, 2020). Actualmente, se ha aprobado una segunda vacuna, la Qdenga (TAK-003), la cual se puede administrar sin que haya padecido dengue con anterioridad; de igual forma, hay riesgos identificados adicionales que deben ser monitorizados (OPS, 2025).

Figura 4.*Ciclo de transmisión del virus del dengue*

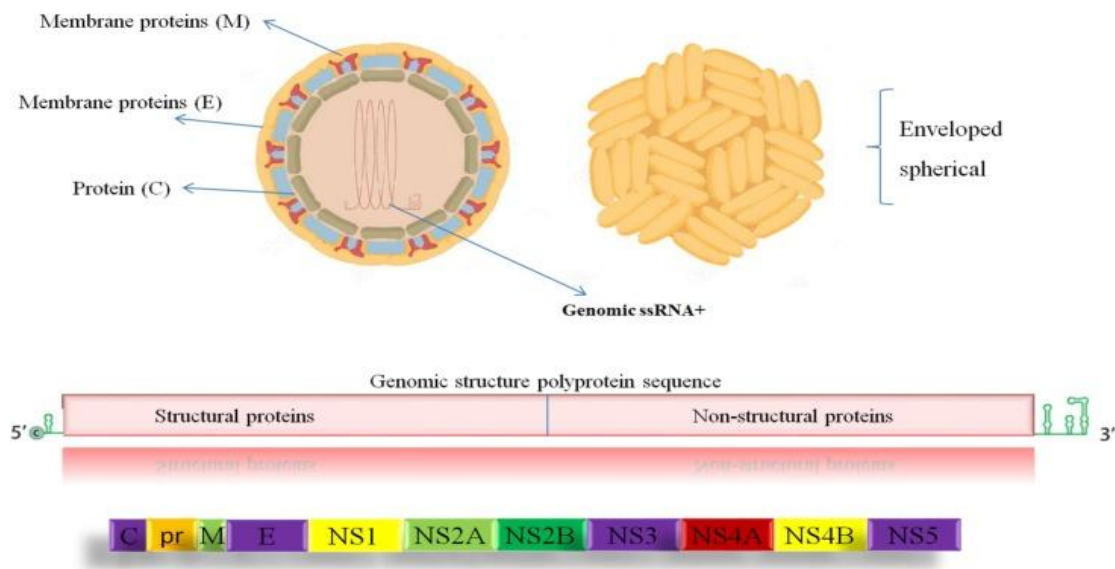
Nota. El dengue se transmite mediante un ciclo humano-vector-humano que involucra principalmente a mosquitos del género *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti*. (1) Un mosquito susceptible adquiere el virus al alimentarse de una persona con viremia. (2) El virus se replica en el mosquito durante el período de incubación extrínseca, tras el cual el vector se vuelve infectante. (3) El mosquito infectado transmite el virus a individuos susceptibles durante una nueva alimentación sanguínea. (4) Las personas infectadas desarrollan viremia y pueden actuar como fuente de infección para otros mosquitos. (5) La continua interacción entre humanos virémicos y mosquitos competentes mantiene la transmisión del virus en la comunidad. Las flechas indican la secuencia del proceso de transmisión (CDC, 2026).

El genoma del virus del dengue está constituido por una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo (+), con una longitud aproximada de 10,7 a 11 kb. Este genoma contiene un único marco abierto de lectura que codifica una poliproteína compuesta por alrededor de 3400 codones (Contreras et al., 2021). El

genoma del DENV codifica tres proteínas estructurales: cápside (C), premembrana (prM) y envoltura (E). La proteína C participa en la formación y estabilidad de la nucleocápside, la prM interviene en la maduración e infectividad viral, y la proteína E facilita la unión y fusión del virus con la célula hospedera, además de ser el principal blanco de anticuerpos neutralizantes y de la respuesta inmunitaria (García et al., 2022). En conjunto con estas, el DENV también codifica siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5), las cuales no forman parte de la estructura del virión, pero son fundamentales para el ciclo de vida viral (Figura 5). Estas proteínas participan en procesos clave como la replicación del ARN, el ensamblaje del virus, la modulación de la respuesta inmune del huésped y la patogénesis, permitiendo la eficiencia de la infección y la supervivencia del virus en el organismo (Lee et al., 2022). Cabe recalcar que el antígeno NS1 es un marcador que se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar dengue grave ya que desempeña un papel muy importante en la replicación viral, la progresión de la enfermedad y la evasión inmunitaria (Paranavitane et al., 2014; Perera et al., 2024).

Figura 5.

Organización estructural y genómica del virus del dengue (DENV)



Nota. Representación esquemática del virión del DENV, mostrando la envoltura lipídica con las proteínas E y M, la proteína de la cápside (C) y el genoma constituido por ARN monocatenario de sentido positivo (ssRNA+). El genoma viral codifica una única poliproteína que es procesada en tres proteínas estructurales (C, prM/M y E) y siete proteínas no estructurales (NS1–NS5), involucradas en la replicación viral, ensamblaje del virión y evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador. La organización génica se presenta en orientación 5'–3' (Pourzangiabadi et al., 2025).

El virus del dengue se clasifica en cuatro serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 según las diferencias proteicas estructurales y no estructurales. La infección con cada serotipo confiere inmunidad de por vida para el serotipo causante, pero no para los otros serotipos (Kularatne y Dalugama, 2022). La reinfección heterotípica por DENV (con un tipo de DENV distinto al tipo de infección primaria) aumenta el factor de riesgo de desarrollar formas graves de la

enfermedad (Katzelnick et al., 2017). Sin embargo, se ha asociado al DENV-2, con shock y síntomas hemorrágicos, seguido del DENV-3, mientras que el DENV-1 mostró manifestaciones clínicas menos graves y el DENV-4 (Peinado et al. 2022). Diversos estudios han evidenciado que los serotipos DENV-2 y DENV-3 se asocian con mayor frecuencia a manifestaciones clínicas graves, como choque y hemorragias. En contraste, los serotipos DENV-1 y DENV-4 suelen relacionarse con presentaciones clínicas más leves de la enfermedad (Velasco y Cano, 2024). Asimismo, se ha observado que las epidemias con elevada incidencia de dengue hemorrágico suelen relacionarse con infecciones secuenciales, particularmente cuando una infección primaria por DENV-1 es seguida posteriormente por una infección con DENV-2 o DENV-3 (Contreras et al. 2021).

2.2.2 Patogénesis del DENV

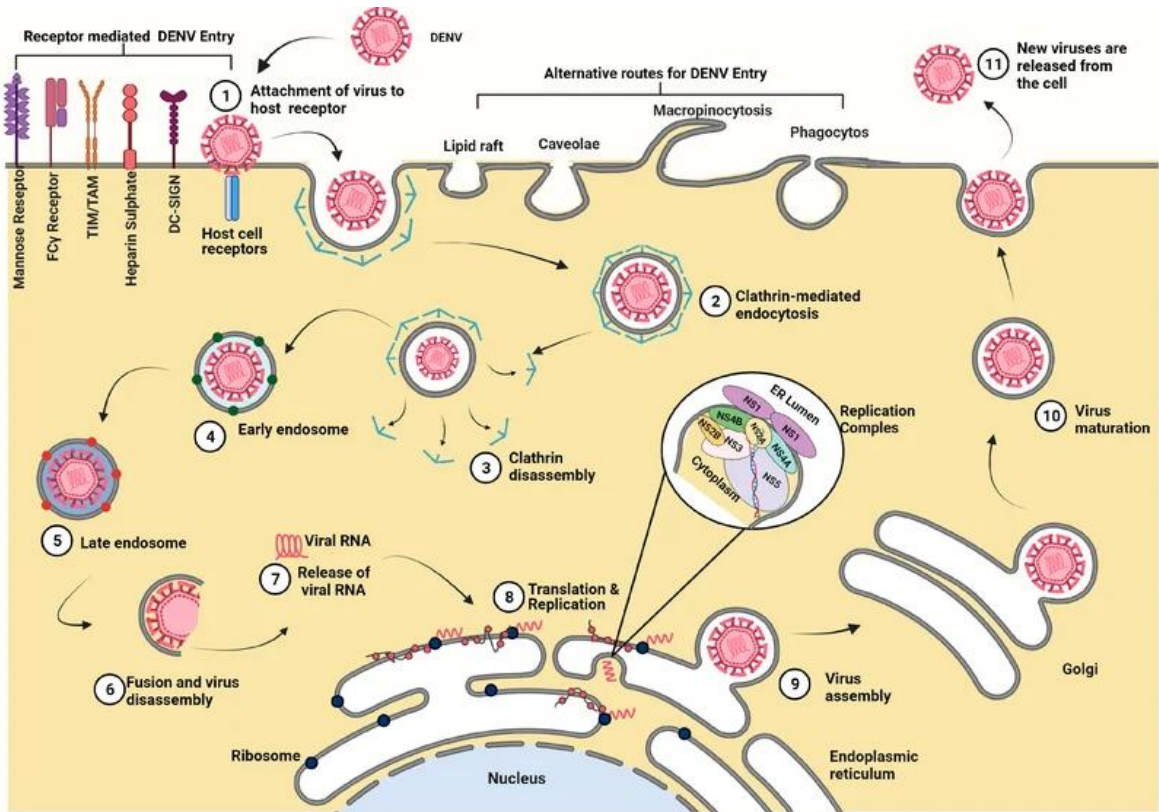
El virus del dengue (DENV) ingresa a la célula huésped mediante un proceso de internalización que involucra la interacción con diversos receptores de superficie celular, desencadenando su entrada a través de endocitosis mediada por clatrina (Nanaware et al., 2021). A diferencia de otros virus, el DENV no depende de un receptor único o exclusivo para su entrada, sino que es capaz de utilizar múltiples receptores según el tipo celular, lo que explica su amplio tropismo celular (King et al., 2020). Entre los receptores y moléculas de superficie descritos como mediadores de la internalización del DENV se encuentran DC-SIGN y L-SIGN, ambas lectinas de tipo C que facilitan la captura y entrada del virus en células dendríticas y monocitos a través de la interacción directa con la proteína de

envoltura E del virión (Bos et al., 2024). Asimismo, se han identificado otros receptores involucrados en este proceso, como el receptor de manosa, los glicosaminoglicanos en particular el sulfato de heparina, los receptores TIM-1 y TAM, así como las moléculas CD14 y CD300a, los cuales participan en distintas vías de internalización dependiendo del tipo celular infectado (King et al., 2020).

Cabe destacar que el principal blanco celular del DENV en el ser humano son las células dendríticas de la piel, dado que expresan de manera prominente varios de estos receptores de entrada, convirtiéndolas en el sitio inicial de infección y replicación viral (Martínez, 2022). La proteína E facilita la entrada del virus hacia la célula huésped por medio de la endocitosis, en la cual se libera la nucleocápside viral y el ARN monocatenario, y se traduce en una poliproteína y posteriormente procesada y dividida por la proteasa viral NS2B/NS3 para generar las proteínas virales estructurales y no estructurales necesarias para la replicación del virus (Fernández et al., 2025). El ARN viral sirve como molde para la traducción y replicación en el retículo endoplasmático (RE), donde las proteínas virales forman un complejo de replicación. Luego, el genoma y las proteínas se ensamblan en el RE para generar partículas virales inmaduras, que maduran en la red trans-Golgi mediante la acción de la furina y finalmente son liberadas por exocitosis, completando el ciclo infeccioso (Figura 6) (Nanaware et al. 2021).

Figura 6.

Ciclo replicativo del virus del dengue (DENV)



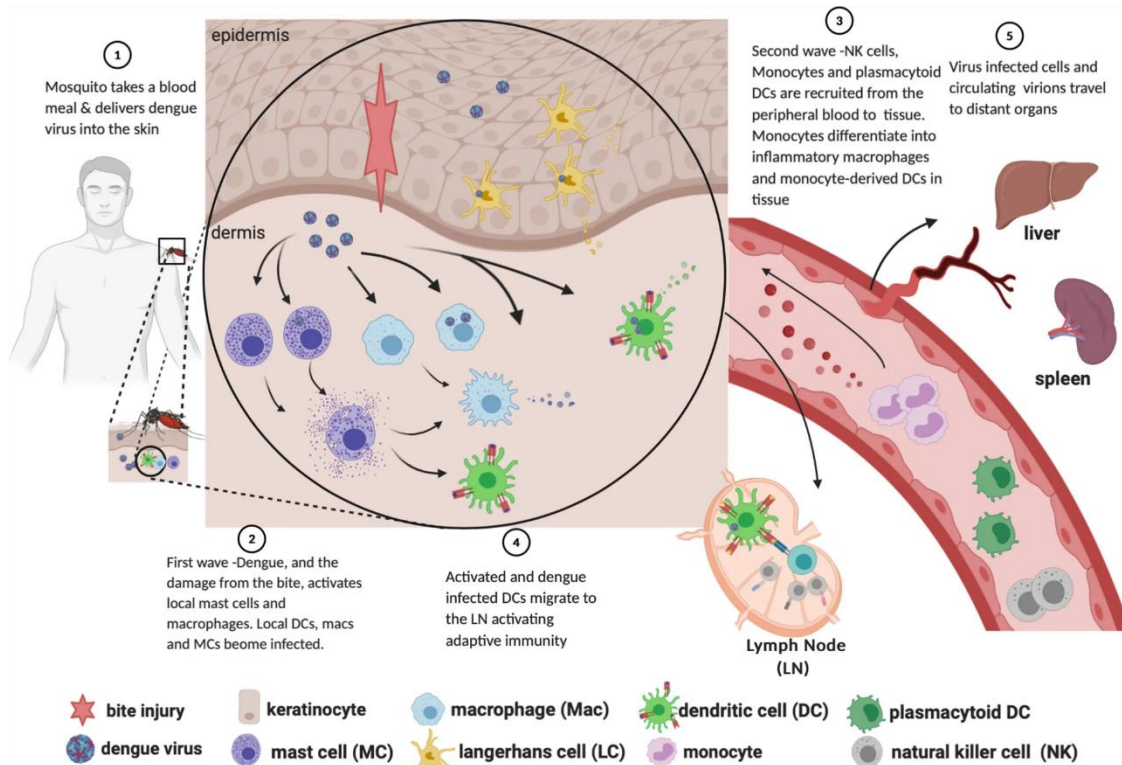
Nota. (1) El virus se une a receptores de la célula hospedadora; (2) ingresa principalmente mediante endocitosis mediada por clatrina; (3) ocurre el desensamblaje de la cubierta de clatrina; (4–5) el virión transita a través de endosomas temprano y tardío; (6) la acidificación endosomal induce la fusión de membranas y el desencapsidamiento viral; (7) el ARN genómico viral es liberado al citoplasma; (8) se llevan a cabo la traducción y replicación del genoma en asociación con el retículo endoplásmico; (9) se ensamblan nuevos viriones; (10) ocurre la maduración viral durante el tránsito por el aparato de Golgi; y (11) los viriones maduros son liberados por exocitosis para infectar nuevas células. Se muestran además vías alternativas de entrada descritas para el DENV. dengue (Nanaware et al., 2021).

2.2.3 Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa contra la infección del virus del dengue (Lee et al., 2022). El virus inicia su ciclo de replicación en las células dendríticas de Langerhans (CL) subdérmicas, siendo reconocidas por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de la célula huésped, incluidos MDA5, RIG-I, TLR3 y TLR7, que reconocen el ARN viral y desencadenan una respuesta antiviral, que se caracteriza inicialmente por la inducción de la respuesta de interferón tipo 1 (IFN) (Holguín y Varela, 2020; King et al., 2020). La infección del macrófago por DENV desencadena una respuesta inflamatoria que, mediante la acumulación de factores vasoactivos, incrementa la permeabilidad endotelial y provoca extravasación vascular (Nanaware et al., 2021). Las células infectadas migran hacia los nódulos linfáticos, donde son reconocidas por macrófagos y células monocíticas, aumentando la replicación viral del DENV hacia las células mononucleares, permitiendo que los viriones del virus del dengue entre a sangre periférica y a los compartimientos de los monocitos (Martínez et al. 2018; King et al., 2020) (Figura 7).

Figura 7.

Respuesta inmunitaria temprana durante la infección por el virus del dengue



Nota. (1) Durante la alimentación sanguínea, el mosquito inocula el virus del dengue en la piel. (2) La lesión causada por la picadura y la presencia del virus activan células inmunitarias locales, incluyendo mastocitos, macrófagos y células dendríticas, algunas de las cuales pueden infectarse. (3) Una segunda ola de células inmunitarias, como monocitos, células dendríticas plasmocitoides y células NK, es reclutada al sitio de infección. (4) Las células dendríticas activadas o infectadas migran hacia los ganglios linfáticos para iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa. (5) Las células infectadas y los viriones circulantes se diseminan a órganos periféricos, como el hígado y el bazo (King et al. 2020).

Las células dendríticas presentan los antígenos a los linfocitos TCD4 +; estos se activan y cooperan con los linfocitos B produciendo respuesta de anticuerpos en consecuencia, desencadena la respuesta inmune adaptativa (Pardo et al. 2018).

Las células logran esto capturando y procesando los péptidos derivados del antígeno presentador en MHC I para las células T CD8 + o en MHC II para las células T CD4+; estos péptidos expresan moléculas coestimuladoras que activan las células T; y secretan quimiocinas y citocinas que atraen a las células T y modifican las funciones de las células T del cebado (Schmid et al., 2014). Las células T CD4+ contribuyen a la secreción de citocinas (IFN- γ , IL-2, TNF- α) para activar las células B, mientras que las células T citotóxicas CD8 + eliminan las células del huésped infectado, lo que favorece a la eliminación viral y a la formación de células T de memoria (Ghosh et al., 2025).

Las células asesinas naturales (NK), componentes clave de la inmunidad innata, cumplen una función esencial durante la infección por DENV. En las etapas iniciales, estas células contribuyen a la respuesta antiviral temprana mediante la eliminación de células infectadas por el virus (Dash et al., 2024). Las células NK son activadas por citocinas como IFN- γ a través de sus receptores de citocinas, y también responden a señales de ligandos expresados en las células diana a través de receptores activadores e inhibidores (Ghosh et al., 2025). Durante la infección por DENV, las células NK activadas presentan expresión de CD69, CD107b y receptores asociados con la migración tisular, lo que indica su participación en la respuesta inmunitaria (Dash et al., 2024).

2.2.4 Respuesta inmune humoral

La respuesta inmune adaptativa constituye la segunda línea de defensa (Dhole et al., 2024). La proteína E y prM del DENV son los principales objetivos de los anticuerpos neutralizantes generados tras la infección por dengue (Pedraza-Escalona et al., 2025). Los anticuerpos dirigidos contra NS1, que se expresa en la superficie celular, pueden conferir protección frente a la infección in vivo mediante mecanismos dependientes o independientes de FcγR. Sin embargo, también se ha sugerido que podrían participar en la patogénesis de la enfermedad (Beltramello et al., 2010).

Durante la infección primaria por DENV, el virus es captado por células presentadoras de antígeno, que activan a las células T CD4⁺ mediante MHC II. Estas, a su vez, estimulan a las células B vírgenes para que se diferencien en células plasmáticas y células B de memoria (Ghosh et al., 2025). La respuesta de las células B genera anticuerpos con funciones opuestas: mientras que los anticuerpos neutralizantes confieren protección frente al virus, los anticuerpos subneutralizantes pueden favorecer la entrada viral mediante la interacción con receptores FcγR, promoviendo así el fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) (Dash et al., 2024). Permitiendo que DENV desarrolle diversas estrategias para modular las respuestas inmunitarias humores del huésped (Lee et al., 2022). Este proceso altera la producción de citocinas, disminuyendo mediadores antivirales como IL-12, IFN-γ y óxido nítrico, y aumentando citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 e IL-10. Este desequilibrio favorece la replicación

del DENV, la disfunción endotelial y la fuga vascular, asociadas a las formas graves del dengue (Pedraza-Escalona et al., 2025).

2.3. Variable

En esta investigación experimental in vitro, las variables se clasifican en independiente y dependiente, conforme a su función dentro del diseño metodológico. La variable independiente corresponde a la condición que el investigador manipula y controla, mientras que la variable dependiente constituye la respuesta biológica que se mide como consecuencia de dicha manipulación. A continuación, se presentan la definición conceptual y operacional de cada variable, junto con el mapa de variables correspondiente.

2.3.1 Definición conceptual de la variable

Variable independiente: Infección de monocitos CD14+ con DENV-2 y DENV-4.

La infección de monocitos CD14+ con los serotipos DENV-2 y DENV-4 corresponde al estímulo experimental utilizado para inducir la respuesta inmunológica en el modelo in vitro. Los monocitos constituyen una de las principales células blanco del virus del dengue y participan en procesos de reconocimiento antigénico, producción de citocinas y activación de otras células inmunes.

Variable dependiente: Respuesta inmune celular en co-cultivos autólogos monocito-linfocito.

La respuesta inmune celular involucra mecanismos de activación celular, presentación antigénica, citotoxicidad y producción de citocinas presentes en los co-cultivos autólogos tras la infección de los monocitos con DENV y que contribuyen al control de la infección viral y a la regulación de la respuesta inmunitaria.

2.3.2 Definición operacional de la variable

Variable independiente: Infección de monocitos CD14+ con DENV-2 y DENV-4.

La variable se operacionaliza mediante la infección experimental de monocitos CD14+ aislados por selección magnética y posteriormente co-cultivados con linfocitos autólogos. Se establecen tres condiciones experimentales: control no infectado, infección con DENV-2 e infección con DENV-4.

Variable dependiente: Respuesta inmune celular

Operacionalmente, se mide mediante la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los marcadores de activación, citotoxicidad y producción de citocinas que conforman el panel multiparamétrico de citometría de flujo espectral, evaluados en las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, células NK y monocitos clásicos mediante citometría de flujo espectral en la plataforma Cytex Northern Lights®, con análisis posterior de los datos en el software FlowJo™ v10.10.1. Por tratarse de valores de MFI, esta variable se clasifica como cuantitativa de tipo continua.

2.3.3 Mapa de variables

El mapa de variables de la presente investigación, que resume la clasificación, el indicador y el instrumento de medición correspondiente a cada variable, se presenta en la tabla 2.

Tabla 2.

Mapa de variables

Variable	Tipo de variable	Indicador	Definición operacional
Variable independiente: Infección de monocitos	Cualitativa nominal	Serotipo viral inoculado (DENV-2 o DENV-4) y no infectado	Infección experimental in vitro
Variable dependiente: respuesta inmune celular	Cuantitativa continua	Intensidad de fluorescencia media (MFI) de los marcadores de activación, citotoxicidad y producción de citocinas del panel multiparamétrico, evaluados en linfocitos T CD4 ⁺ , linfocitos T CD8 ⁺ , células NK y monocitos clásicos	Citometría de flujo espectral (Cytek Northern Lights®); análisis de datos en FlowJo™ v10.10.1

2.4. Glosario de términos:

DENV: Virus del dengue

in vitro: Técnica para realizar un determinado experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

In Vivo: se refiere a cuando la investigación o el trabajo se realizan con o dentro de un organismo

MINSA: Ministerio de Salud

CSS: Caja de Seguro Social

ICGES: Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells – células mononucleares de la sangre periférica o células mononucleares de la sangre periférica humana

CD: Células dendríticas

CL: Células de Langerhans

NK: Natural Killer / Células Asesinas Naturales

IL: Interleucina

IFN- γ / IFN- α / IFN- β : Interferón gamma/ Interferón alfa/ Interferón beta

MIP-1 β : Proteína inflamatoria de 1 beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1

IP-10: Proteína 10 inducible por IFN

DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin - Molécula de adhesión intercelular 3específica de células dendríticas, no integrina

ADE: Antibody-Dependent Enhancement/ Potenciación dependiente de anticuerpos.

nAb: Neutralizing antibodies - Anticuerpos neutralizantes

prM: Proteína Pre-Membrana

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor - Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

MOI: Multiplicity of infection/Multiplicidad de infección. Representa la relación entre el número de partículas virales y el número de células hospedadoras en un medio de infección determinado.

MFI: Median Fluorescence Intensity /Intensidad de fluorescencia media

UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection: técnica de reducción de dimensionalidad

FlowSom: algoritmo de agrupamiento que utiliza mapas autoorganizados (SOM) y agrupamiento jerárquico para clasificar células según su expresión de marcadores, permitiendo identificar poblaciones celulares complejas de forma rápida y reproducible

Citometría de flujo Espectral: Técnica analítica avanzada que estudia los espectros de emisión completos de los fluorocromos.

Cultivo Celular: Proceso mediante el que células, ya sean células procariotas o eucariotas, pueden cultivarse en condiciones controladas

Titulación Viral: Proceso de determinar la concentración de partículas virales infecciosas en una muestra

Efecto citopático (ECP): se define como el compendio de alteraciones morfológicas, estructurales y funcionales que sufre una célula huésped como consecuencia de una infección viral, las cuales son observables por medio de la microscopía óptica.

Capítulo 3.0 Marco metodológico

3.1 Tipo y diseño de la investigación

Este es un estudio experimental analítico que se realizará en condiciones de laboratorio, infectando células primarias de humanos con el virus del dengue con el objetivo de analizar la activación del sistema inmune celular.

3.2 Población y muestra (o universo de estudio)

La población está constituida por células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMCs), específicamente monocitos CD14+ y linfocitos autólogos obtenidos del procedimiento de aféresis de donantes sanos adultos tomados del banco de sangre del Hospital Pacífica Salud.

3.6 Procedimiento de la investigación

3.6.1. Producción viral

Para la producción de los virus del dengue serotipos DENV-2 (cepa: 487625, v3) y DENV-4 (cepa: 400654, v4), se utilizaron células Vero con un pasaje final de 24. Estas células fueron cultivadas en dos frascos independientes de cultivo celular de 175 cm² destinados a la infección viral y un frasco de 25 cm² utilizado como control negativo, el cual fue mantenido bajo las mismas condiciones experimentales, pero sin inoculación viral. Las células fueron expandidas en Minimum Essential Medium (MEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de penicilina-estreptomicina (P/S), e incubadas a 37 °C con 5 % de CO₂, hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80 % (Figura 8).

Figura 8.

Cultivo de células Vero con una confluencia aproximada del 80% previo a la inoculación viral (Microfotografía en campo claro (10x))



Nota. Las células Vero fueron empleadas para los ensayos de propagación del virus del dengue. Imagen obtenida mediante microscopía de campo claro (Fotografía tomada por Natasha Sánchez).

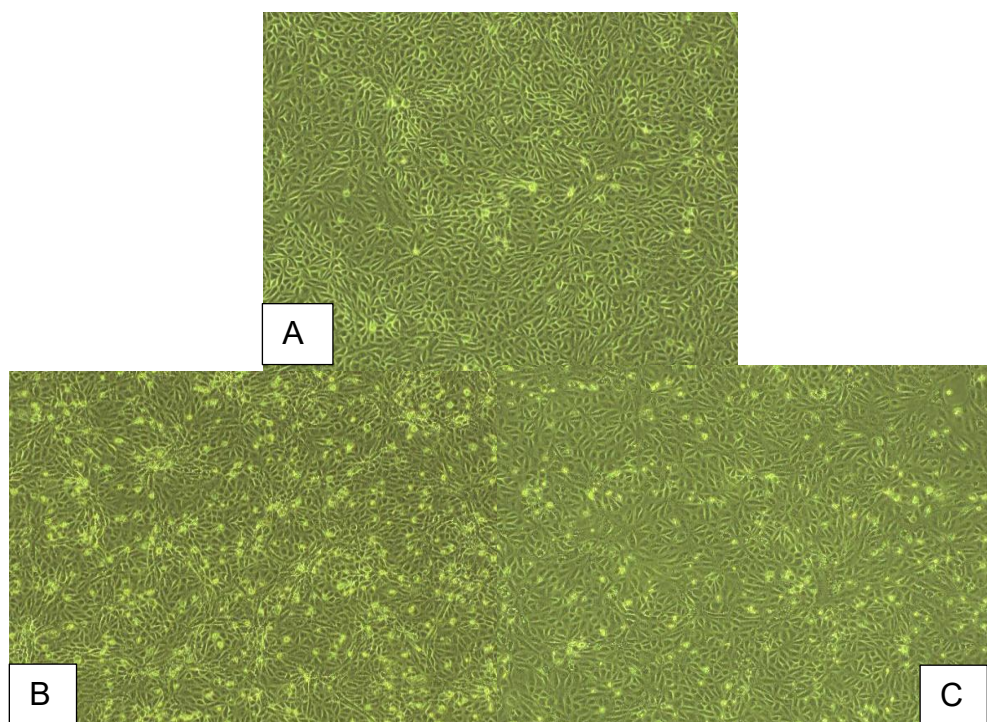
Una vez alcanzada esta confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de mantenimiento (MEM suplementado con 2 % de SFB). Posteriormente, los frascos de 175 cm² fueron inoculados con los virus DENV-2 (cepa: 487625, v3) y DENV-4 (cepa: 400654, v4), respectivamente. Durante el proceso de infección, se permitió un periodo de adsorción viral de dos horas, durante el cual los frascos fueron movidos suavemente cada 15 minutos con el fin de favorecer la distribución homogénea del virus sobre la monocapa celular y facilitar la interacción entre las partículas virales y las células hospedadoras.

Los cultivos infectados fueron incubados nuevamente bajo las mismas condiciones previamente descritas y monitoreados periódicamente mediante observación

microscópica para evaluar la aparición de efecto citopático (ECP) como lo son: desprendimiento de la monocapa o cambios morfológicos de la células, que son característico de la infección viral. La cosecha del virus se realizó cuando se observó un efecto citopático aproximado de 2+, indicativo de replicación viral activa y daño celular moderado aproximadamente al 2-4. El cultivo correspondiente al control negativo se mantuvo bajo las mismas condiciones experimentales, pero sin inoculación viral, con el objetivo de verificar la viabilidad celular y descartar alteraciones no relacionadas con la infección viral días (Figura 9).

Figura 9.

Producción en células Vero (Microfotografía en campo claro (10x))



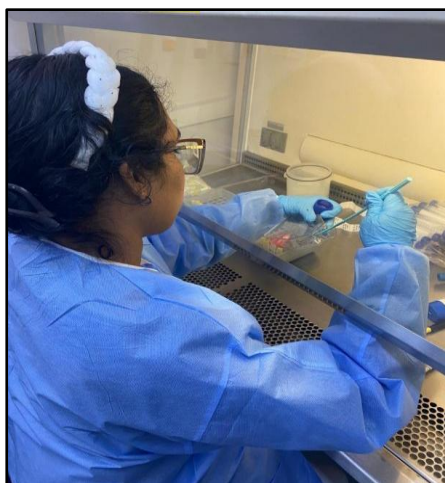
Nota. Se Observa por microscopía el desprendimiento de las células Vero de la monocapa y el cambio de morfología. **A.** Control Negativo de Células Vero a los 2 días. **B.** Células Vero-infectadas con DENV-2 (cepa: 487625, v3) a los 2 días de infección (efecto citopático 2+). **C.** Células Vero infectadas con DENV-4 (cepa: 400654, v4) a los 2 días de infección (efecto citopático 2+). (Fotografía tomada por Natasha Sánchez).

3.6.2 Cosecha de virus

La cosecha viral de los serotipos DENV-2 (cepa 487625, v3) y DENV-4 (cepa 400654, v4) se realizó una vez observado el efecto citopático en el monocapa celular infectada. Posteriormente, la monocapa adherida fue desprendida mediante raspado suave con una escobilla celular, con el objetivo de favorecer la liberación de las partículas virales presentes tanto en las células infectadas como en el sobrenadante (figura 10). El sobrenadante fue resuspendido cuidadosamente, haciendo escurrir el líquido por las paredes del flask para recuperar el material viral remanente. El contenido recuperado se transfirió a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos (aceleración 9 y freno 9). Finalizada la centrifugación, se recuperó el sobrenadante; la muestra se mantuvo en hielo durante todo el procedimiento. Finalmente, se alicuotaron 500 µL del sobrenadante correspondiente a cada serotipo viral en crioviales previamente etiquetados según el formato establecido para su almacenamiento posterior.

Figura 10.

Cosecha de los serotipos DENV-2 (cepa: 487625, v3) y DENV-4 (cepa: 400654, v4)



Nota. Procedimiento de raspado de la monocapa adherida a Flask de 75 cm³ (Fotografía tomada por Natasha Sánchez).

3.6.3 Concentración de virus

La concentración viral de los serotipos DENV-2 (cepa 487625, v3) y DENV-4 (cepa 400654, v4) se realizó utilizando tubos concentradores Amicon® (Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.), según el protocolo de (Ye et al., 2016) (Merck Millipore, 2021). Posteriormente a la cosecha viral y tras la centrifugación inicial, el sobrenadante fue recuperado cuidadosamente, evitando alterar el precipitado celular. Seguidamente, se adicionaron 15 ml del sobrenadante viral al tubo Amicon® (Merck Millipore, Burlington, MA, EE. UU.), para su concentración. Las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm, a 4 °C (aceleración 9 y freno 9). El tiempo de centrifugación fue aproximadamente de 30 minutos y las muestras fueron concentradas hasta obtener un volumen final de 500 µL. Finalmente, se tomaron alícuotas del virus concentrado y se distribuyeron en crioviales

previamente etiquetados con la información correspondiente de cada serotipo viral. Las muestras fueron almacenadas a -80°C para su conservación y posterior utilización experimental.

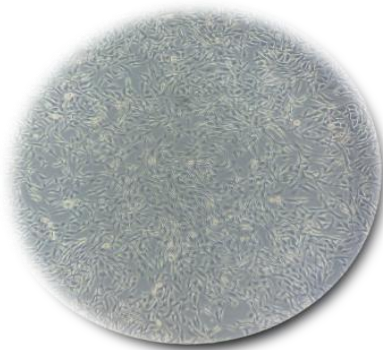
3.6.4. Titulación viral

La titulación de los serotipos DENV-2 (cepa: 487625, v3) y DENV-4 (cepa: 400654, v4) se utilizó según el protocolo de (Díaz et al., 2019), se realizó mediante el ensayo de formación de placas utilizando células BHK (Baby Hamster Kidney). Se sembraron células BHK en placas de 24 pocillos, para la titulación de ambos serotipos virales (DENV-2 y DENV-4). Para cada serotipo se emplearon 20 pocillos, distribuidos de la siguiente manera: 16 pocillos para las diluciones seriadas 1:10 (10^{-1} a 10^{-8} por duplicado) y 4 pocillos como controles no infectados (por duplicado). Las células se mantuvieron en medio α -MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina-estreptomicina hasta alcanzar una confluencia del 80% (Figura 11). Una vez alcanzada la confluencia deseada, el medio de cultivo fue retirado y se procedió a la infección viral. Se prepararon diluciones seriadas 1:10 de cada virus en solución salina balanceada de Hank (HBSS), utilizando un volumen de 25 μL de virus en 200 μL de HBSS para la dilución inicial, continuando las diluciones hasta 10^{-8} . Los platos se incubaron durante 2 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 para permitir la adsorción viral. Las placas fueron incubadas y monitoreadas diariamente hasta observar la formación de placas virales. La lectura del ensayo se realizó al quinto

día postinfección, observándose formación de placas desde la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-6} , la cual fue utilizada para la estimación del título viral.

Figura 11.

Cultivo de células BHK con una confluencia aproximada del 80% (Microfotografía en campo claro (10x)) previa a la infección



Nota. Fotografía tomada por Natasha Sánchez.

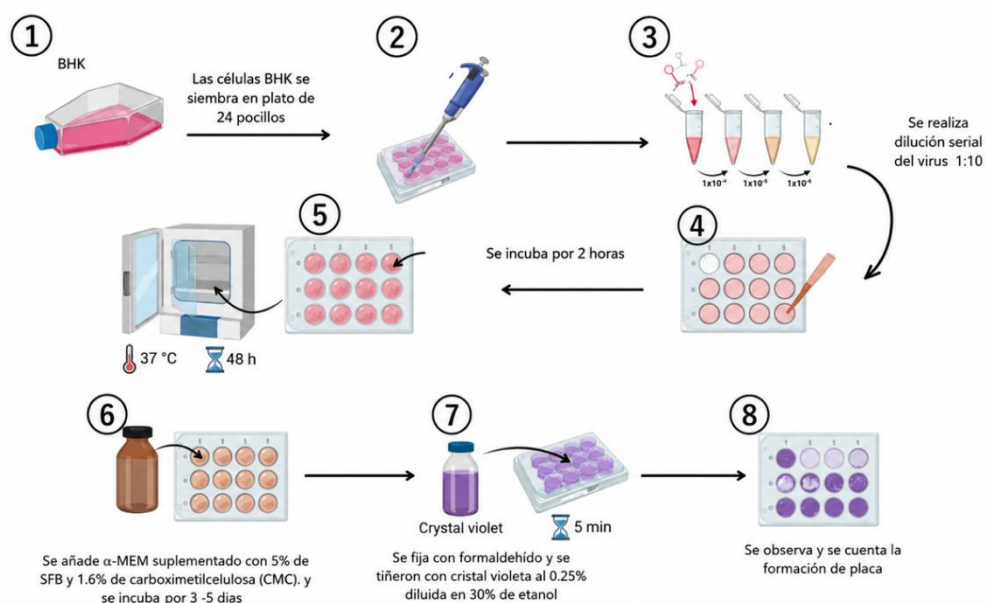
Posterior al período de adsorción, se preparó medio de recubrimiento α -MEM suplementado con 5% de SFB y 1.6% de carboximetilcelulosa (CMC). Se añadieron 500 μ L de esta solución a cada pocillo para formar una capa semisólida que permite la formación de placas de lisis o efecto citopático (CPE) y se dejó incubando por 5 días. Posteriormente, pasado el tiempo de incubación, la monocapa se fijó con formaldehído y se tiñó con cristal violeta al 0.25% diluida en 30% de etanol por 40 minutos, lo que permitió visualizar claramente las placas formadas (Figura 12). Finalmente, las placas fueron contadas manualmente y los resultados se expresaron como unidades formadoras de placa por mililitro

(PFU/mL), lo que permitió determinar la concentración de virus infeccioso presente en cada muestra (Figura 13). Utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Título viral: } \frac{\# \text{ de placas}}{\text{Dilución} \times \text{Volumen de inóculo}}$$

Figura 12.

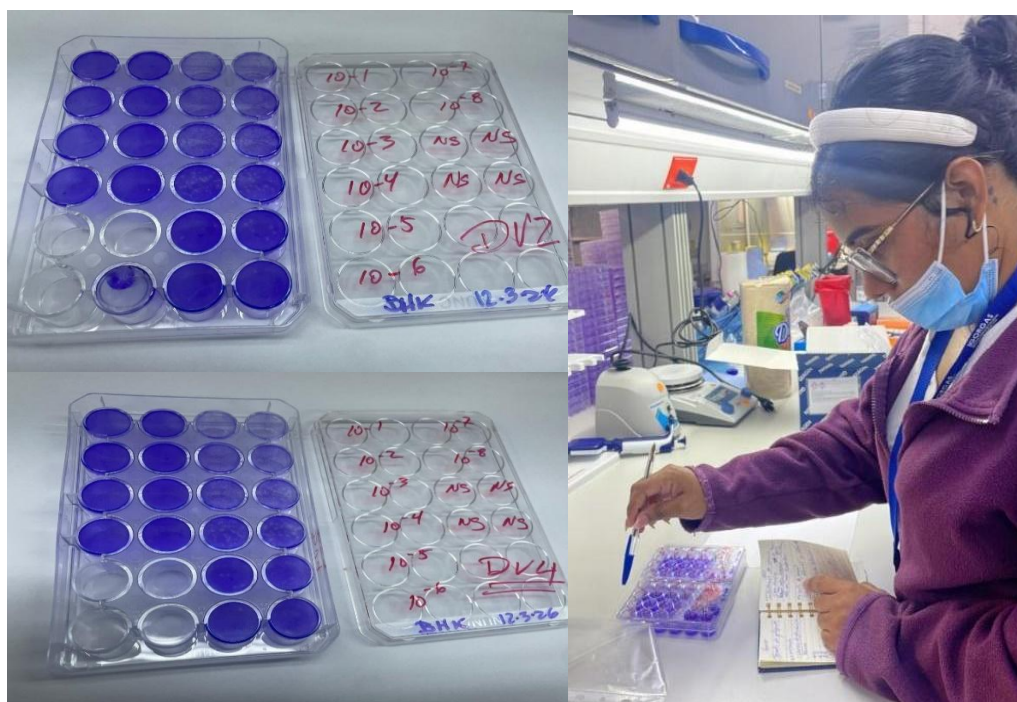
Procedimiento de ensayo de formación de placas virales en células BHK



Nota. (1) siembra de células BHK en placas de 24 pocillos; (2) preparación de diluciones seriadas del virus; (3) inoculación e incubación durante 2 h; (4) adición de α-MEM suplementado con SFB y CMC e incubación durante 3–5 días; (5) fijación y tinción con cristal violeta; y (6) visualización y cuantificación de placas virales.

Figura 13.

Titulación de los serotipos DENV-2 (cepa: 487625, v3) y DENV-4 (cepa: 400654, v4)

**A**

Nota. A. Formación de placas de DENV-2 y DENV-4. B. Conteo manual de la formación de placas (Fotografía tomada por Natasha Sánchez).

3.6.5 Separación de PBMCs

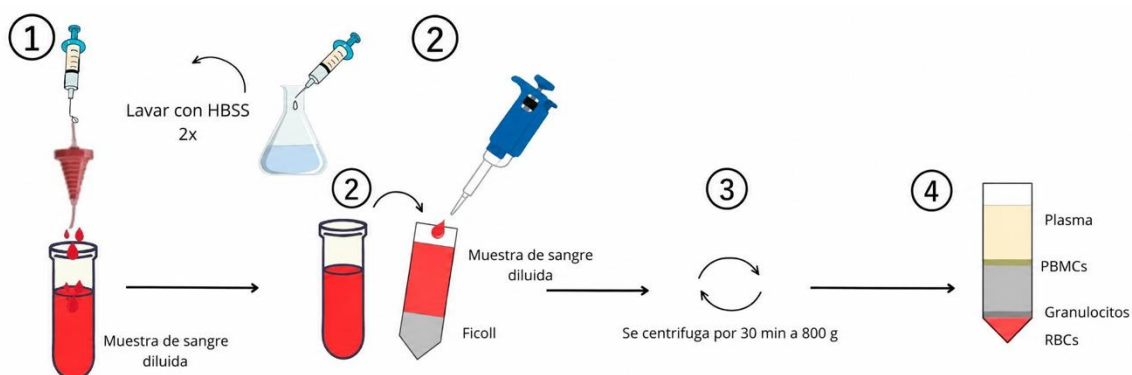
La separación de PBMCs se realizó a partir de muestras obtenidas del banco de sangre de Pacífica Salud mediante procedimiento de aféresis (EC CBITPC 267, Anexo 1). Para este estudio se utilizaron cámaras leucoreductora o “conitos leucoreductores”, considerados material de desecho generado durante el procedimiento de aféresis.

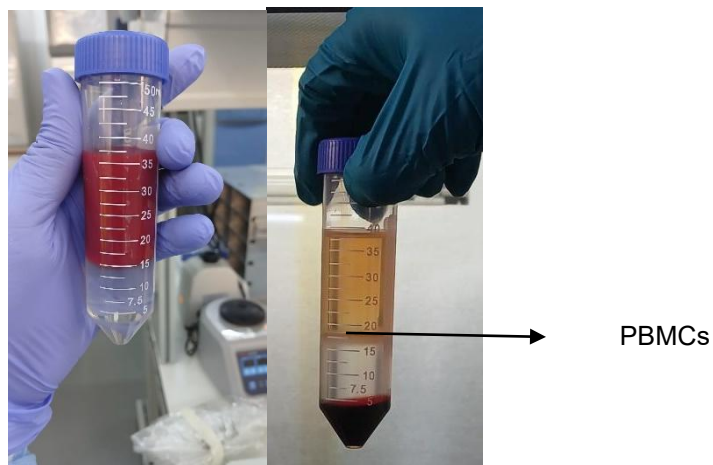
Una vez obtenidas las muestras, se procedió a la separación de las PBMCs técnica utilizada según para separación por gradiente en obtención de linfocitos y

monocitos (Chen et al., 2019). Los cónitos fueron transferidos a tubos cónicos y lavados en dos ocasiones con Solución Salina Equilibrada de Hanks (HBSS), con el fin de recuperar la mayor cantidad posible de muestra residual. Posteriormente, las muestras fueron colocadas cuidadosamente sobre Ficoll-Paque™ PLUS, para realizar la separación por gradiente de densidad utilizada (Böyum, 1968) y centrifugadas a $800 \times g$ durante 30 minutos (aceleración 6 y freno 0) (Figura 14). Finalizada la centrifugación, se recolectó la capa correspondiente a las PBMCs, evitando aspirar restos de sangre o eritrocitos. Las células obtenidas fueron transferidas a nuevos tubos cónicos con HBSS y centrifugadas a $400 \times g$ durante 10 minutos (aceleración 9 y freno 9). Luego de descartar el sobrenadante, se realizó un segundo lavado con HBSS bajo las mismas condiciones de centrifugación.

Figura 14.

Procedimiento para el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll





Nota. (1) dilución de la muestra de sangre y lavado con HBSS; (2) estratificación de la sangre diluida sobre Ficoll; (3) centrifugación a $800 \times g$ durante 30 min; y (4) recuperación de la fracción de PBMCs tras la separación de las capas celulares (Böyum, 1968).

Posteriormente, se descartó nuevamente el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en medio de congelación. Antes de la criopreservación, las células fueron contadas en cámara de Neubauer para estimar una concentración de 1×10^7 células por criovial. Finalmente, las muestras fueron distribuidas en crioviales y colocadas en recipientes Mr. Frosty a -80°C durante la noche. Al día siguiente, los crioviales fueron transferidos a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo siguiendo el procedimiento de congelación de células según Lauer et al. (2017).

3.6.6. Separación celular por perlas magnéticas

La separación magnética de monocitos CD14+ se realizó utilizando microesferas magnéticas CD14+ MicroBeads de Miltenyi Biotec a partir de siete muestras de PBMC previamente aisladas (Miltenyi et al., 1990). Para ello, se seleccionó un

criovial correspondiente a cada donante y las muestras fueron transferidas a tubos cónicos de 15 mL, donde se suspendieron en 5 mL de medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S). Posteriormente, 1 mL de cada muestra fue centrifugado a $300 \times g$ durante 10 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet celular fue resuspendido en wash buffer compuesto por 2 mM EDTA y 0.5 % de BSA, utilizando 80 μ L por cada 1×10^7 células totales, seguido de la adición de 20 μ L de CD14 MicroBeads por cada 1×10^7 células. Las muestras se incubaron durante 15 minutos en frío.

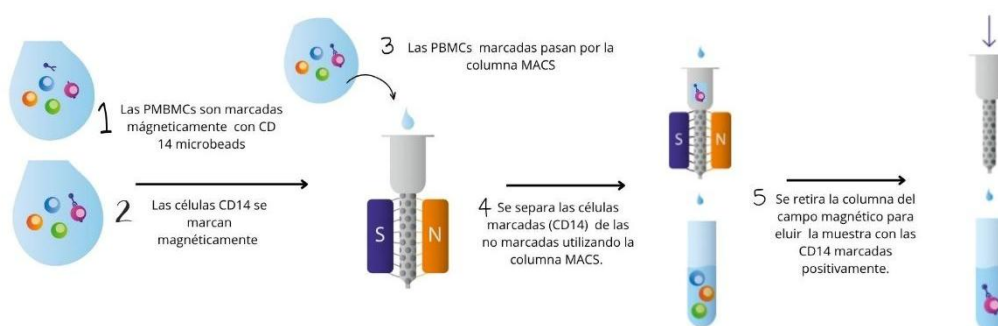
Finalizada la incubación, se lavaron las células con 2 ml de wash buffer y se llevó a centrifugación nuevamente a $300 \times g$ durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células se resuspendieron en 500 μ L de wash buffer. Para la separación magnética, se utilizó un separador magnético de Miltenyi Biotec con columnas LS previamente hidratadas con 3 mL de wash buffer. Se colocaron en frío siete tubos cónicos correspondientes a cada donante, rotulados como “flow through”. Posteriormente, las muestras celulares fueron aplicadas sobre las columnas acopladas al magneto, permitiendo la separación magnética por goteo. Las columnas fueron lavadas 3 veces con 3 ml de wash buffer, recolectando en los tubos “flow through” o “leucocitos restantes”, las células no marcadas.

Una vez completado el proceso de goteo, las columnas fueron retiradas del magneto y colocadas sobre tubos nuevos rotulados como “CD14+”. Finalmente, se añadieron 5 mL de wash buffer a cada columna y las células marcadas

magnéticamente fueron recuperadas mediante el empuje firme del émbolo a través de la columna (Figura 15).

Figura 15.

Procedimiento para el aislamiento de monocitos CD14+, mediante separación magnética (MACS)

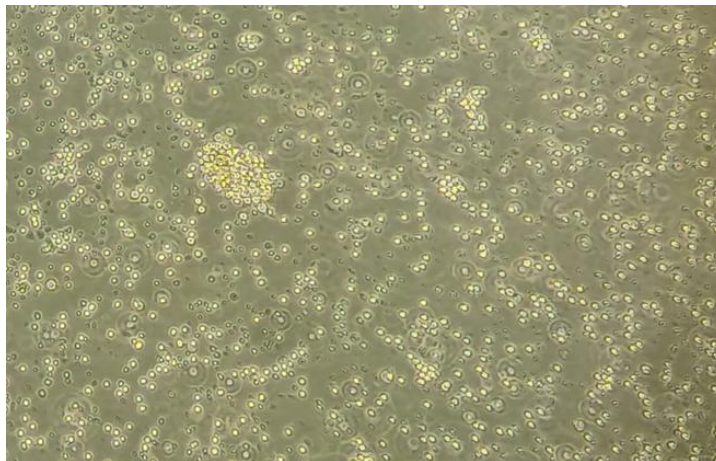


Nota. (1) incubación de las PMBCs con microesferas magnéticas anti-CD14; (2) marcaje específico de las células CD14⁺; (3) paso de la suspensión celular a través de la columna MACS; (4) separación de las células CD14⁺ retenidas de las células no marcadas; y (5) elución y recuperación de la fracción enriquecida de células CD14⁺ tras retirar la columna del campo magnético (Miltyeniy et al., 1990).

Posteriormente a la separación magnética, tanto los tubos rotulados como “flow through” como los tubos correspondientes a las células CD14⁺ fueron centrifugados a 300 × g durante 10 minutos. Finalizada la centrifugación, las células obtenidas en el “flow through” fueron resuspendidas en 12 mL de medio RPMI suplementado con 10 % de SFB y transferidas a frascos de cultivo de 75 cm², los cuales fueron incubados a 37 °C hasta la realización del cocultivo (Figura 16).

Figura 16.

Microfotografía en campo claro (10x) de linfocitos obtenidos en la fracción no retenida (flow-through), tras separación inmunomagnética en RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%.



Nota. Se observa una población homogénea de células redondeadas con halo refringente, morfología característica de linfocitos en reposo, con integridad celular conservada (Fotografía tomada por Natasha Sánchez).

Por otra parte, las células CD14⁺ fueron resuspendidas en 5 mL de RPMI suplementado con 10 % de SFB. Posteriormente, se transfirió a un tubo aparte la cantidad de células requeridas para el ensayo, correspondiente a 150 000 células por cada 10 pocillos, suspendidas en un volumen final de 5 mL. Las células fueron centrifugadas nuevamente a 300 × g durante 10 minutos y, una vez descartado el sobrenadante, el pellet celular fue resuspendido en 700 µL de RPMI suplementado con 2 % de SFB.

Seguidamente, en una placa de fondo en U se distribuyeron 100 µL de suspensión celular en cada uno de los 10 pocillos. Las placas fueron incubadas a 37 °C para su posterior infección con los serotipos DENV-2 y DENV-4.

3.6.7 Infección de monocitos y establecimiento del co-cultivos autólogos de monocitos-linfocitos.

Infección de monocitos con DENV-2 y DENV-4.

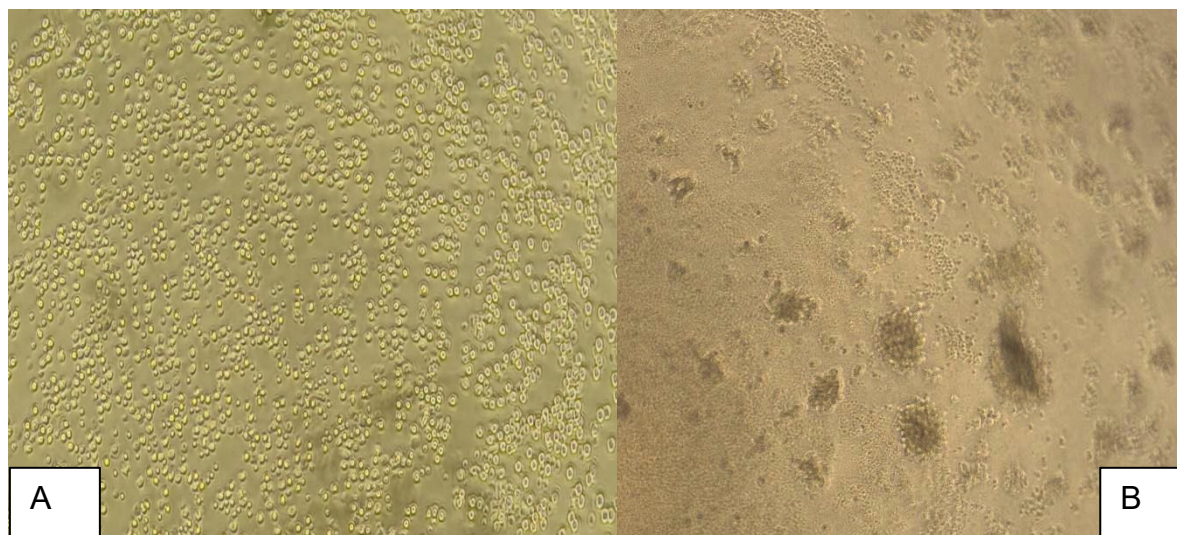
Los monocitos CD14⁺ aislados de los siete donantes fueron infectados individualmente con los serotipos DENV-2 (cepa 487625, v3) y DENV-4 (cepa 400654, v4) a una multiplicidad de infección (MOI) 0.5 calculada con base en el título viral de 2.5×10^6 UFP/mL determinado mediante ensayo de placas. El volumen de inóculo viral se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Volumen de virus: } \frac{\text{MOI} \times \text{Número de células}}{\text{Título viral (UFP/mL)}}$$

Las placas que contenían los monocitos infectados fueron incubadas a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 48 horas sin manipulación, con el fin de garantizar la adsorción viral y el inicio del ciclo replicativo (Figura 17).

Figura 17.

Comparación de monocitos no infectados vs. monocitos infectados



Nota. Comparación morfológica de monocitos no infectados e infectados observados mediante microscopía óptica con aumento de 10×: (A) monocitos no infectados y (B) monocitos infectados a las 48 h postinfección. A. Monocitos sin infectar. B. Monocitos infectados a las 48 h (Fotografía tomada por Natasha Sánchez).

Preparación de los linfocitos autólogos para el co-cultivo.

Durante el período de incubación de los monocitos infectados, los linfocitos autólogos de cada donante fueron mantenidos en reposo en frascos de cultivo de 75 cm² a 37 °C y 5 % de CO₂. Al cumplirse las 48 horas de la infección con DENV a los monocitos, los linfocitos fueron recuperados de los frascos, transferidos a un tubo cónico y centrifugados para separar las células del sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 800 µL de RPMI con 10 % de SFB y 1 % de P/S. De esta suspensión se tomaron 200 µL por pocillo correspondientes a aproximadamente 4.5×10^5 células para cada condición experimental.

Establecimiento del co-cultivo autólogos de monocitos-linfocitos.

Previo a la incorporación de los linfocitos, la placa de cultivo con los monocitos infectados fue centrifugada y el sobrenadante descartado cuidadosamente. Los linfocitos autólogos resuspendidos se añadieron directamente sobre los monocitos infectados, estableciéndose el co-cultivo en una relación celular monocito:linfocito de 1:2. Inmediatamente después, se adicionaron los inhibidores del transporte intracelular Monensin Solution y Brefeldin A Solution a una concentración de 0.20 μ L por pocillo, con el fin de bloquear la secreción de citocinas y facilitar su detección intracelular posterior por citometría de flujo espectral (Nylander y Kalies, 1999). El co-cultivo se mantuvo durante 6 horas a 37 °C y 5 % de CO₂, transcurridas las 6 horas se procedió a realizar la tinción para el panel multiparamétrico.

3.6.8. Estandarización de panel de citometría de flujo espectral.

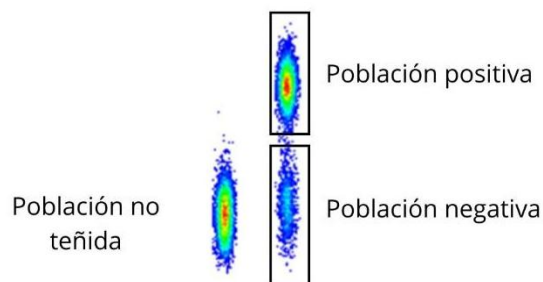
3.6.8.1. Titulación de anticuerpos.

Previo a la caracterización inmunofenotípica, se realizó la titulación individual de los anticuerpos incluidos en el panel mediante diluciones seriadas en PBMCs obtenidas de muestras independientes a las empleadas en el estudio experimental. Para los marcadores intracelulares, las células fueron estimuladas previamente con PMA/Ionomycin Cell Stimulation Cocktail (Invitrogen™) con el fin de inducir la producción de citocinas. Los archivos adquiridos en el citómetro Cytel Northern Lights® fueron analizados en FlowJo™ mediante concatenación de diluciones, seleccionando para cada anticuerpo la concentración que maximizó

el índice de tinción (Stain Index) entre poblaciones positivas y negativas (Figura 18). Las diluciones finales seleccionadas para cada anticuerpo se presentan en la Tabla 3.

Figura 18.

Determinación de población negativa de la población positiva, utilizando criterio Stain Index



Nota. Figura generada utilizando el software FlowJo™ v10.10.1 (BD Life Sciences).

Tabla 3.

Panel multiparamétrico de citometría de flujo espectral para la evaluación de poblaciones inmunes y respuesta citotóxica frente a la infección de dengue

Categoría	Marcador	Fluorocromo	Titulación	Casa comercial	Rol / Definición
Marcador de viabilidad	Via Dye Red fixable dye	ViaKrome	1/500	Cytex Biosciences	Excluye células muertas.
Marcadores de superficie: (Definición de poblaciones)	CD3	BV570 (clon UCHT1)	1/40	BioLegend	Linfocitos T (pan-T).
	CD4	PerCP (clon RPA-T4)	1/160	BioLegend	Linfocitos T colaboradores (Th).
	CD8	BV480 (clon SK1)	1/160	BD Biosciences	Linfocitos T citotóxicos.
	CD14	cFluor B548 (clon 63D3)	1/80	CYTEK Biosciences	Monocitos.
	CD16	BV650 (clon 3G8)	1/40	BioLegend	NK citotóxicas y monocitos.
	CD56	cFluor BYG750 (clon TULY56)	1/80	CYTEK Biosciences	Células NK.

Marcadores de activación/proliferación	CD25	PE-Fire 700 (clon M-A251)	1/40	BioLegend	Activación temprana / identificación de células T reguladoras.
	CD38	FITC (clon LS198-43)	1/40	Beckman Coulter	Activación y diferenciación celular.
Marcadores de diferenciación/memoria	CD27	APC-Fire 810 (clon O323)	1/160	BioLegend	Memoria T / diferenciación.
	CD45RA	cFluor V450 (clon HI100)	1/80	CYTEK Biosciences	Identificación de linfocitos T vírgenes.
Receptores activadores de células NK y T CD8⁺ citotóxicas	NKp46 (CD335)	PE-Cy5 (clon 9E2)	1/40	BioLegend	Receptor activador citotóxico natural de células NK.
	NKG2D (CD314)	PE-Dazzle 594	1/80	BioLegend	Induce producción de citocinas y moléculas citotóxicas.
	DNAM-1 (CD226)	BV750 (clon 11A8)	1/40	BD Biosciences	Receptor activador presente en células NK y linfocitos T citotóxicos.
Ligandos de receptores NK	CD112 (Nectin-2)	Alexa Fluor 405 (clon 405)	1/60	R&D Systems	Ligando del receptor DNAM-1.
	MICA/MICB	PE-Cy7 (clon 6D4)	1/40	BioLegend	Ligandos del receptor NKG2D.
Presentación antigénica	HLA-ABC	PerCP-eFluor 710 (clon REA230)	1/300	Miltenyi Bioetic	Moléculas del MHC clase I.
Marcadores intracelulares – Citocinas efectoras	IFN- γ	APC-eFluor780 (4S.B3)	1/40	eBioscience	Citocina asociada a la respuesta antiviral tipo Th1 y actividad de células NK.
	TNF- α	BV421 (clon MAb11)	1/40	BioLegend	Citocina proinflamatoria.
Marcadores intracelulares – Degranulación lisosomal/citotóxica	CD107a (LAMP-1)	eFluor 660 (clon eBioH4A3)	1/40	eBioscience	Indicador de degranulación citotóxica.

Marcadores intracelulares – Moléculas citotóxicas	Perforina	BV711 (clon dG9)	1/40	BioLegend	Mediador de citotoxicidad dependiente de gránulos.
Antígeno viral	Dengue NS3	PE (clon E1D8)	1/200	UCSF Monoclonal Antibody	Identificación de células infectadas por virus dengue.

Las diluciones seleccionadas durante este proceso de optimización fueron utilizadas para la conformación del panel final de 22 anticuerpos empleado en la caracterización fenotípica y funcional de los co-cultivos autólogos infectados con DENV-2 y DENV-4.

3.6.8.2 Citometría de flujo espectral

Una vez establecidas las concentraciones óptimas de los anticuerpos, las muestras experimentales fueron teñidas utilizando el panel multiparamétrico optimizado. La caracterización fenotípica y funcional de las células se realizó mediante un panel multiparamétrico compuesto por 22 anticuerpos monoclonales. El panel multiparamétrico estuvo compuesto por marcadores de superficie e intracelulares que permitieron identificar las poblaciones de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) y células NK y monocitos CD14⁺, así como evaluar su estado de activación y capacidad funcional mediante la detección de citocinas proinflamatorias y moléculas asociadas a la actividad citotóxica. Adicionalmente, se incluyó la detección de la proteína viral. NS3, utilizada como marcador de infección por dengue y para el análisis de la respuesta inmunitaria frente a células infectadas (Tabla 4).

Una vez establecidas las concentraciones óptimas de los anticuerpos, las muestras experimentales fueron teñidas utilizando el panel multiparamétrico optimizado. Inicialmente, las células fueron incubadas con el marcador de viabilidad correspondiente, seguido de la tinción de los marcadores de superficie mediante la adición del cóctel de anticuerpos previamente preparado (Figura 19). Posteriormente, las células fueron fijadas y permeabilizadas utilizando Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, 2023), para permitir la detección de marcadores intracelulares, incluyendo proteínas virales, moléculas efectoras y marcadores funcionales asociados a la respuesta inmunitaria frente al DENV. Finalmente, las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo espectral Cytel Northern Lights® (Cytel® Biosciences, Fremont, CA, USA), conformado con tres láseres de excitación (405 nm, 488 nm y 640 nm), filtros de dispersión lateral de alta sensibilidad y un sistema de detección espectral avanzado que permite identificar y discriminar simultáneamente múltiples fluorocromos a partir de sus firmas espectrales de emisión (Chen Camaño, 2025). Los archivos generados fueron analizados mediante el software FlowJo™ versión 10.10.1 (FlowJo,2023).

Figura 19.

Tinción de células con un cóctel de anticuerpos de superficie para la identificación y caracterización fenotípica de subpoblaciones celulares, mediante citometría de flujo espectral



Nota. Fotografía tomada por Natasha Sánchez

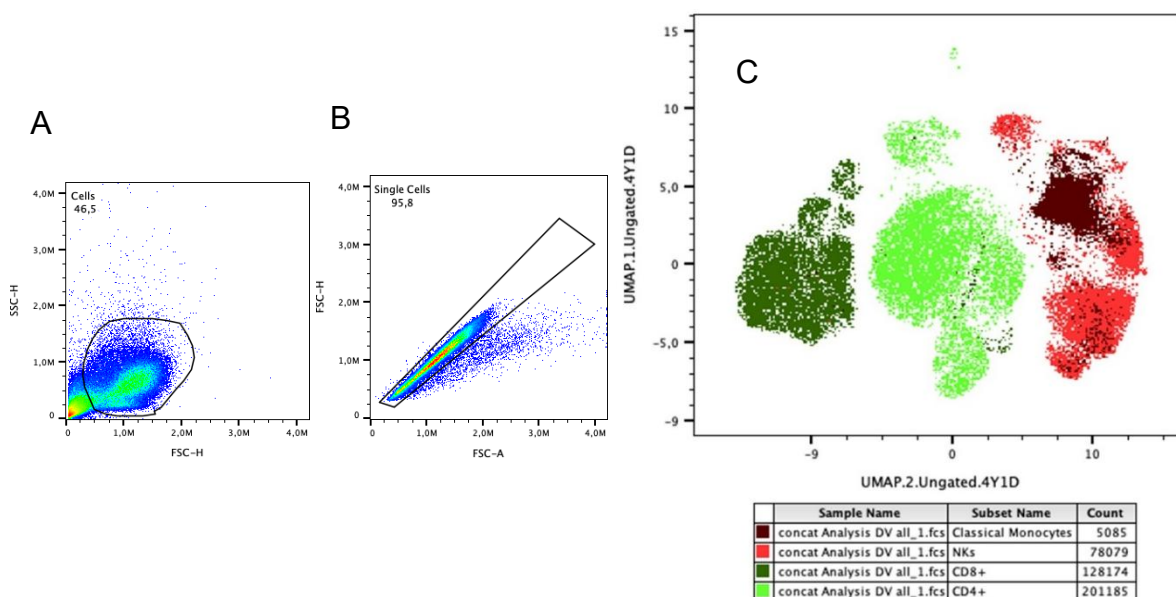
3.6.8.3. Análisis de datos de citometría de flujo

El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo versión 10.10.1 (FlowJo, 2023). Inicialmente, los archivos adquiridos fueron sometidos a un control de calidad mediante la herramienta Peacock QC, con el fin de identificar y excluir eventos de baja calidad. Para la depuración de eventos, se aplicó una estrategia secuencial de gating: inicialmente se seleccionaron células individuales (*single cells*) mediante una gráfica SSC vs. FSC, para aislar la población de interés. Posteriormente, se excluyeron los *doublets* (agregados celulares) mediante una

gráfica FSC-A vs. FSC-H, conservando únicamente las células individuales (Figura 20).

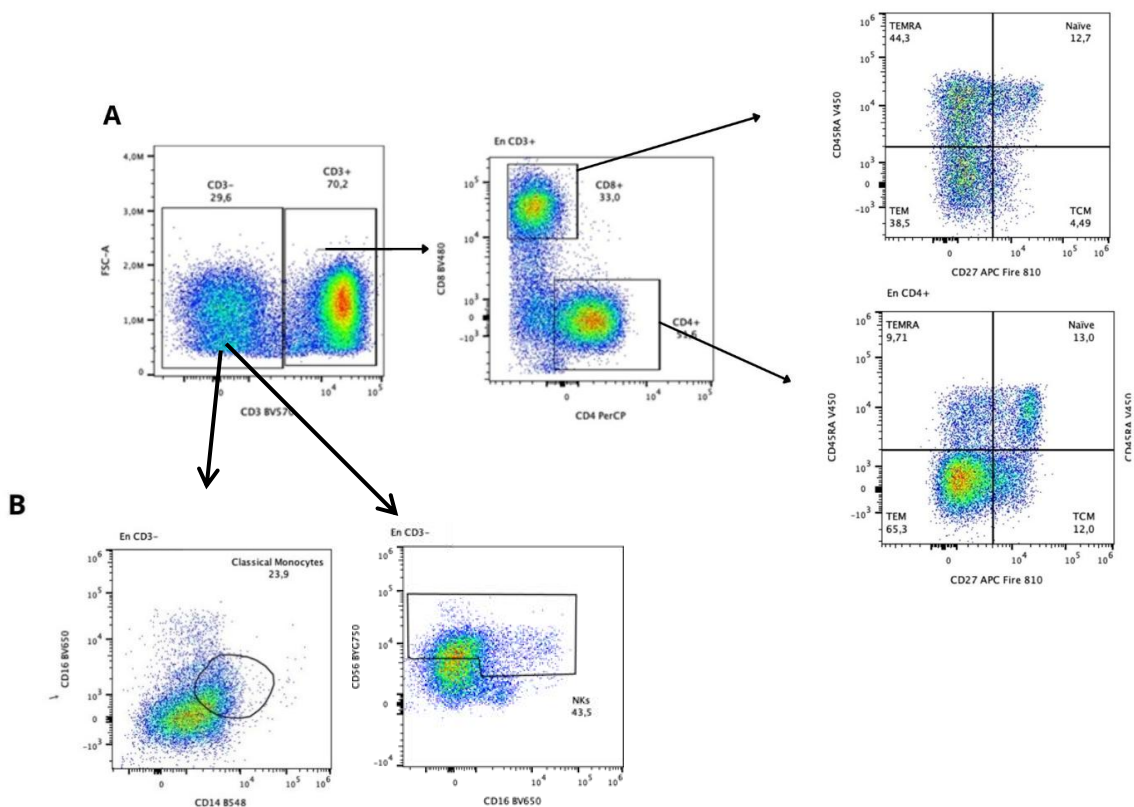
Figura 20.

Estrategia de exclusión secuencial.



Nota. a. Selección de single cells. b. Exclusión de agregados celulares. C. Poblaciones identificadas en UMAP: CD3+, CD4+, NKs y Monocitos clásicos. Figura generada utilizando el software FlowJo™ v10.10.1 (BD Life Sciences).

Se efectuó un análisis de alta dimensión mediante reducción de dimensiones utilizando el algoritmo Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP). Sobre la representación UMAP se aplicó un análisis de agrupamiento utilizando el algoritmo FlowSOM (versión 4.1.0), identificándose diez clústeres celulares con perfiles fenotípicos distintos. La caracterización de dichos clústeres se realizó mediante la herramienta Cluster Explorer, permitiendo evaluar los patrones de expresión de los marcadores incluidos en el panel y comparar las poblaciones



Nota. A. Subpoblaciones específicas de linfocitos T (CD4+ y CD8+). B. Identificación de poblaciones Monocíticas y Células NKs (CD14+, CD16+ y CD56+). Figura generada utilizando el software FlowJo™ v10.10.1 (BD Life Sciences).

Los resultados se expresaron como frecuencia de las poblaciones celulares, porcentaje de células positivas e intensidad media de fluorescencia (Mean Fluorescence Intensity, MFI) de los marcadores evaluados. Posteriormente, los valores de MFI fueron comparados entre las diferentes condiciones experimentales (DV2, DV4 y control no infectado [NI]) para evaluar cambios en la expresión de los marcadores inducidos por la infección viral. Finalmente, los datos fueron exportados a GraphPad Prism para la elaboración de gráficos y el análisis estadístico de los resultados.

Capítulo 4.0 Análisis e interpretación de los resultados

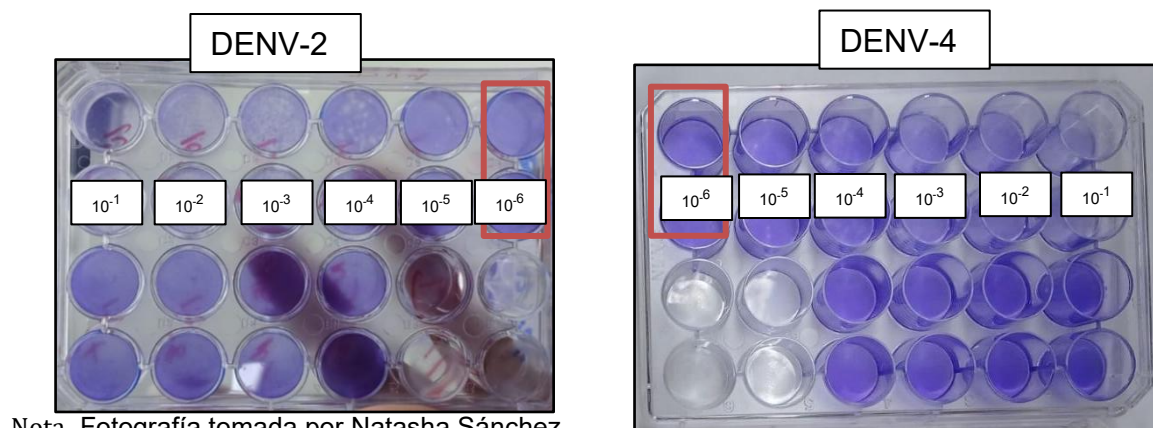
4.0.1. Producción y titulación de los serotipos DENV-2 y DENV-4

La titulación viral realizada mediante ensayo de formación de placas mostró una concentración de 2.5×10^6 PFU/mL para los serotipos DENV-2 y DENV-4. El conteo de placas se efectuó por duplicado y permitió determinar que ambos stocks virales presentaban títulos equivalentes de partículas infecciosas (Figura 22).

Serotipos DENV	Título viral
DENV-2	2.5×10^6 PFU/mL
DENV-4	2.5×10^6 PFU/mL

Figura 22.

Formación de placas virales para los serotipos DENV-2 y DENV-4 en células BHK



Nota. Fotografía tomada por Natasha Sánchez

4.0.2. Estandarización del modelo de co-cultivo autólogo de monocitos - linfocitos

Se estableció un modelo de co-cultivo autólogo utilizando monocitos CD14⁺ infectados con DENV-2 o DENV-4 y linfocitos obtenidos del mismo donante. Previo al establecimiento del co-cultivo, ambas poblaciones celulares fueron cuantificadas para ajustar una relación monocito de 1:2 en todas las condiciones experimentales.

La separación magnética con CD14 MicroBeads permitió recuperar monocitos CD14⁺ a partir de los criviales de PBMCs de los siete donantes, con recuentos que oscilaron entre 150 000 (LSR10) y 1 300 000 células (LSR6), evaluados por exclusión con azul de tripano. En todos los casos, la viabilidad celular fue superior al 90 %, confirmando la integridad de las muestras para los ensayos subsiguientes. Las fracciones fueron resuspendidas en 5 mL de RPMI, obteniendo concentraciones totales que variaron entre 750 000 (LSR10) y 6 500 000 células (LSR6).

La fracción linfocitaria autóloga recuperada en el flow through o leucocitos restantes fue resuspendida en 12 mL de RPMI, con totales celulares que oscilaron entre 1 200 000 (LSR9) y 6 240 000 células (LSR6). Los volúmenes de ambas fracciones utilizados en el co-cultivo fueron ajustados individualmente por donante para mantener la relación monocito:linfocito de 1:2, con los monocitos resuspendidos en 700 μ L de RPMI con 2 % de SFB y los linfocitos en 200 μ L por pocillo (Tabla 4).

El co-cultivo autólogo fue establecido exitosamente en los siete donantes, con viabilidades celulares consistentemente superiores al 90 %, lo que garantizó la idoneidad del modelo experimental para la posterior caracterización de la respuesta inmune celular frente a DENV-2 y DENV-4 mediante citometría de flujo espectral.

Tabla 4.

Recuento celular de monocitos CD14+ y linfocitos autólogos utilizados en el establecimiento del co-cultivos por donante

Donantes	Monocitos totales	Linfocitos totales	Monocitos utilizados en co-cultivo	Linfocitos utilizados en co-cultivo, relación (1:2)
LSR6	6500000	6,240,000	0.808	2.20
LSR8	2950000	2,760,000	1.78	5
LSR9	2600000	1200000	2.02	11
LSR10	750000	2640000	7.0	5.2
LSR11	2900000	1800000	1.81	7.60
LSR12	2500000	2400000	2.1	5.6
LSR13	5500000	3960000	0.95	3.40

La viabilidad celular de ambas fracciones fue evaluada mediante exclusión con azul de tripano, obteniéndose valores superiores al 90 % en todos los donantes. Los volúmenes indicados corresponden a las cantidades ajustadas para mantener la relación monocito:linfocito de 1:2 en cada pocillo del co-cultivo.

4.0.3. Estandarización del panel multiparamétrico para citometría de flujo espectral

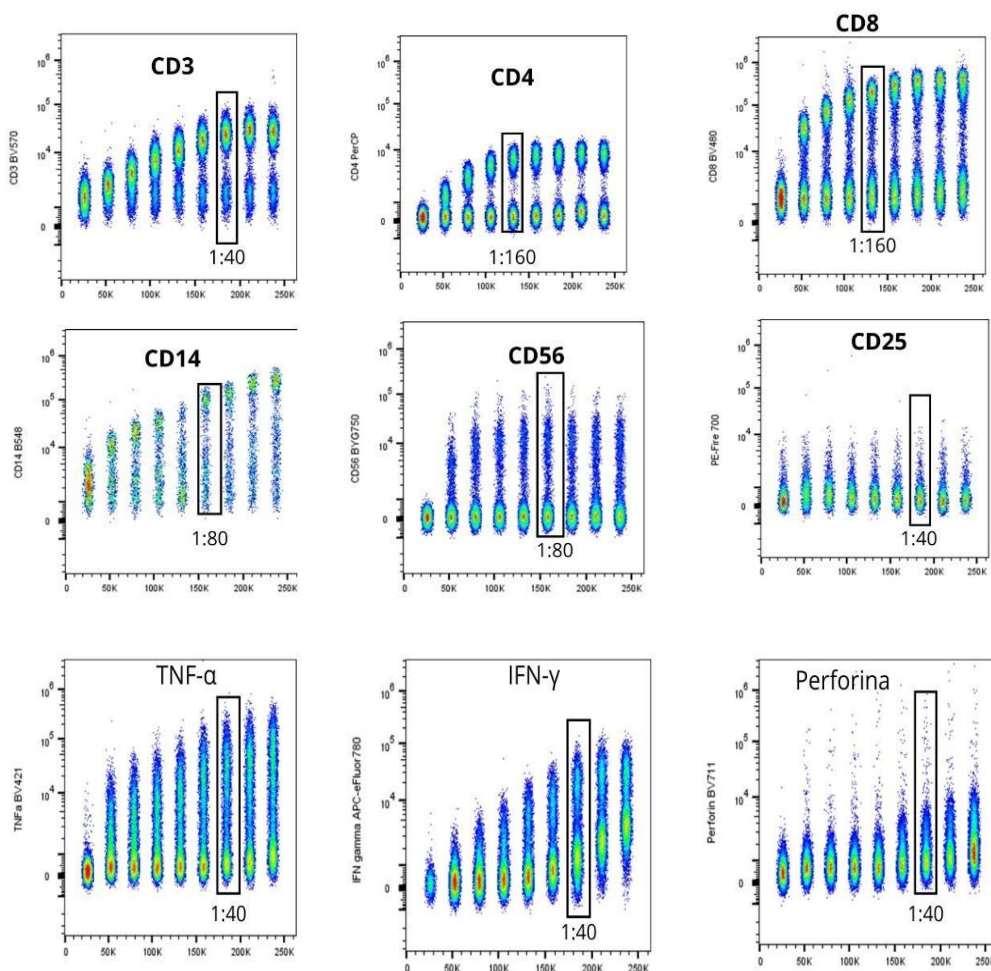
Con el objetivo de establecer un panel multiparamétrico para la caracterización fenotípica y funcional de las poblaciones inmunes involucradas en la respuesta frente a DENV-2 y DENV-4, se realizó la titulación individual de los anticuerpos incluidos en el panel de citometría de flujo espectral. La optimización se efectuó mediante tinciones seriadas y análisis por citometría espectral, seleccionando para cada anticuerpo la dilución que presentó la mejor resolución entre las poblaciones positivas y negativas, utilizando como criterio de selección el índice de tinción (Stain Index).

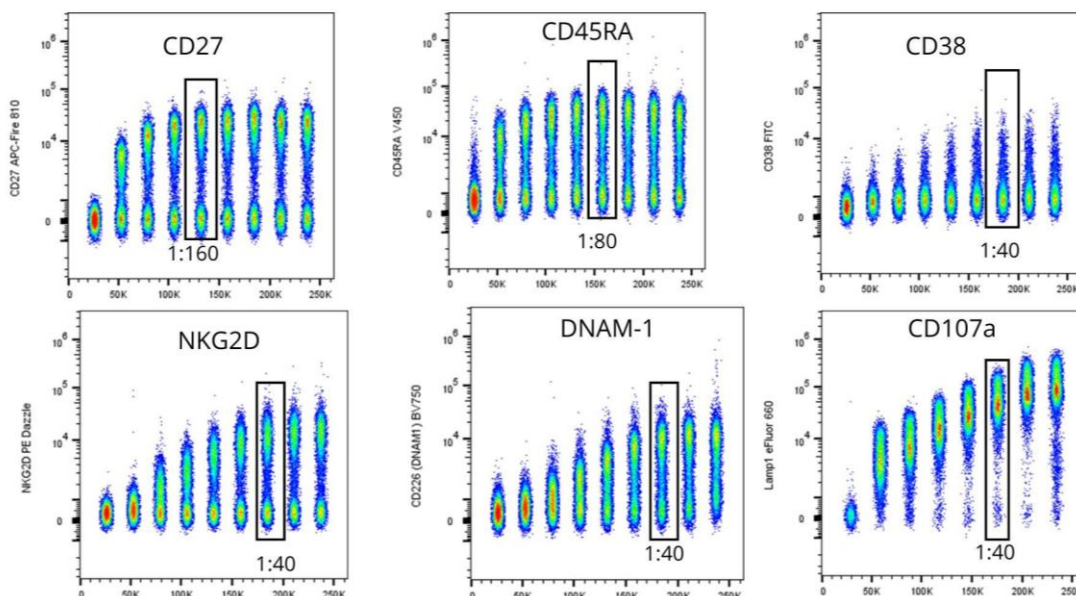
El análisis de los archivos adquiridos se realizó mediante concatenación de eventos en FlowJo™ versión 10.10.1, permitiendo comparar simultáneamente las diferentes diluciones evaluadas para cada marcador (Figura 23). Como resultado, se determinaron las concentraciones óptimas para los clústeres de identificación celular (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16 y CD56), diferenciación y activación (CD25, CD27, CD38 y CD45RA), receptores NK y CD8 citotóxicos y ligandos asociados a la función de células NK (NKp46, NKG2D, DNAM-1, CD112 y MICA/MICB), así como marcadores funcionales intracelulares relacionados con la respuesta antiviral, citotóxica (IFN- γ , TNF- α , perforina y CD107a) y anti-NS3 como marcador de confirmación de infección viral.

Las diluciones óptimas seleccionadas para la mayoría de los anticuerpos incluidos en el panel oscilaron entre 1:40 y 1:160 (Figura 23). Por su parte, el anticuerpo dirigido contra la proteína no estructural NS3 del virus del dengue mostró el mejor desempeño a una dilución de 1:200, mientras que el anticuerpo anti-HLA-ABC alcanzó una titulación óptima a una dilución de 1:300.

Figura 23.

Análisis representativo de la titulación de anticuerpos, mediante concatenación de archivos FCS en flowJo





Nota. Las diferentes diluciones evaluadas fueron comparadas para determinar la concentración óptima de tinción utilizando el índice de tinción como criterio de selección. Figura generada utilizando el software FlowJo™ v10.10.1 (BD Life Sciences). Figura generada utilizando el software FlowJo™ v10.10.1 (BD Life Sciences).

Durante la evaluación espectral utilizando beads de control, se observó que la combinación del marcador HLA-ABC con Streptavidin PerCP-eFluor 710 generaba una interferencia significativa en múltiples detectores, afectando la adecuada resolución de otros fluorocromos incluidos en el panel. Dado que esta interferencia persistió incluso después del proceso de desconvolución espectral, se decidió excluir dicho marcador de la configuración final del panel para preservar la calidad de los datos y el desempeño global del ensayo.

Adicionalmente, el colorante de viabilidad Via Dye Red fue estandarizado empleando 2,5 µL de una solución preparada a una dilución de 1:500. Esta condición permitió una adecuada discriminación entre células viables y no viables,

garantizando la exclusión eficiente de eventos correspondientes a células muertas durante el análisis citométrico (Tabla 4).

Tras la selección de las diluciones óptimas y la exclusión del marcador HLA-ABC, se estableció la configuración final del panel multiparamétrico. Las muestras teñidas fueron adquiridas en el citómetro de flujo espectral Cytex Northern Lights®. La evaluación de los datos obtenidos demostró una adecuada separación de las poblaciones positivas y negativas, así como una correcta resolución espectral de los fluorocromos incluidos en el panel, permitiendo la identificación confiable de los marcadores de superficie e intracelulares seleccionados para el estudio.

4.0.4. Caracterización fenotípica de la respuesta inmune frente a DENV-2 y DENV-4

Con el fin de evaluar los cambios fenotípicos y funcionales inducidos por la infección con DENV-2 y DENV-4, se analizó la intensidad media de fluorescencia (MFI) de marcadores asociados con activación, citotoxicidad y reconocimiento inmunológico en diferentes poblaciones celulares.

En los monocitos clásicos, la expresión de Nectin-2 mostró la variación más evidente entre las condiciones experimentales, con valores promedio de MFI de 20 660,9 en NI, 19 611,9 en DENV-2 y 24 675,1 en DENV-4. Asimismo, la detección intracelular de la proteína viral NS3 presentó valores promedio de 17 344,3 en NI, 16 103,9 en DENV-2 y 16 930,9 en DENV-4. No obstante, las diferencias observadas no alcanzaron significancia estadística (Figura 24 A, B).

En los linfocitos T CD8+, la expresión de LAMP-1 presentó valores promedio de MFI de 47 486,7 en las condiciones no infectadas (NI), 47 328,4 en DENV-2 y 48 722,0 en DENV-4. De manera similar, la expresión de perforina mostró valores de 26 568,6, 26 341,3 y 26 538,7 para NI, DENV-2 y DENV-4, respectivamente. Aunque se observó una ligera tendencia hacia mayores niveles de expresión en las células expuestas a DENV-4, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$) (Figura 24 C, D).

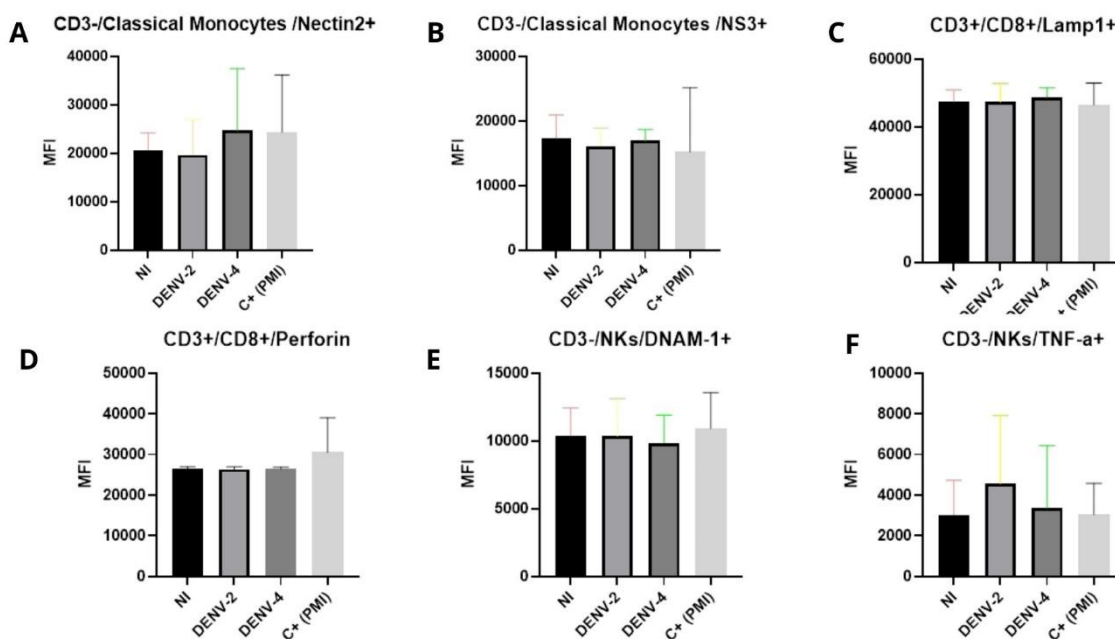
Por otra parte, las células NK mostraron una expresión relativamente estable de DNAM-1 entre los grupos evaluados, registrándose valores promedio de MFI de 10 383,9 en NI, 10 359,4 en DENV-2 y 9 858,1 en DENV-4. De igual forma, la expresión de perforina se mantuvo comparable entre las condiciones analizadas. En contraste, TNF- α presentó una tendencia hacia valores superiores en las células infectadas con DENV-2 (MFI = 4 565,7) en comparación con NI (MFI = 3 535,2) y DENV-4 (MFI = 3 926,5); sin embargo, esta diferencia tampoco resultó estadísticamente significativa (Figura 25 E, F).

En conjunto, los marcadores evaluados mostraron perfiles de expresión similares entre las condiciones no infectadas y las infectadas con DENV-2 y DENV-4. Aunque algunos marcadores, particularmente Nectin-2 en monocitos clásicos y TNF- α en células NK, evidenciaron tendencias de variación en sus valores de MFI, el análisis estadístico mediante la prueba de Friedman seguida de comparaciones

múltiples de Dunn no reveló diferencias significativas entre los grupos estudiados ($p > 0,05$)

Figura 24.

Marcadores asociados con reconocimiento inmunológico, activación y citotoxicidad tras infección con DENV-2 y DENV-4



Nota. (A) Nectin-2 en monocitos clásicos. (B) NS3 en monocitos clásicos. (C) LAMP-1 en linfocitos T CD8+. (D) Perforina en linfocitos T CD8+. (E) DNAM-1 en células NK. (F) TNF- α en células NK. Los datos se presentan como intensidad media de fluorescencia (MFI) para los grupos NI, DENV-2 y DENV-4. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba de Friedman seguida del test de Dunn. Figura generada utilizando el software FlowJo™ v10.10.1 (BD Life Science

Discusión

La citometría de flujo espectral representó una herramienta clave para la evaluación de la respuesta inmunitaria frente al virus del dengue, ya que permitió la identificación simultánea de distintas poblaciones celulares y la cuantificación de marcadores asociados con activación y función efectora. En el presente estudio se logró diseñar y estandarizar un panel multiparamétrico de 22 marcadores para la caracterización simultánea de monocitos (CD14+, CD16+), linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células NK (CD56+), así como sus perfiles funcionales durante la infección con los serotipos DENV-2 y DENV-4. La evaluación computacional del panel en Cytex Cloud arrojó un índice de tinción (Stain Index) global de 16.19, lo que indica una separación espectral adecuada y una relación señal-ruido favorable para distinguir poblaciones positivas y negativas. De acuerdo con (Mateus et al., 2013), confirman que este parámetro es esencial para garantizar la identificación confiable de las poblaciones de interés, minimizando interferencias derivadas de la superposición espectral entre fluorocromos, la autofluorescencia celular y otros factores que pueden comprometer la sensibilidad y precisión de la detección.

En este contexto, los controles de desconvolución espectral (unmixing) constituyeron un componente indispensable de la estandarización. A diferencia de la compensación convencional, la citometría de flujo espectral requiere caracterizar la distribución de emisión completa de cada fluorocromo para realizar la separación de señales, por lo que los controles de tinción permiten distinguir la emisión específica de cada fluorocromo del ruido de fondo y electrónico (Roca et al., 2021). La importancia de esta etapa quedó evidenciada durante la

optimización del panel, cuando se identificó que el marcador HLA-ABC conjugado con Streptavidin PerCP-eFluor 710 generaba interferencias espectrales persistentes en múltiples detectores que no pudieron resolverse incluso tras el proceso de desconvolución; esto motivó su exclusión del panel final para preservar la calidad de los datos. Este hallazgo permite comprender que el diseño computacional de paneles, aunque orientador, no sustituye la evaluación experimental del comportamiento real de los fluorocromos en el citómetro.

La titulación de anticuerpos constituyó una etapa fundamental en la estandarización del panel de citometría de flujo. La determinación de las diluciones óptimas permitió maximizar la relación señal-ruido, minimizando simultáneamente la unión inespecífica y la saturación de la señal. Para esta evaluación se consideró el índice de tinción, una herramienta ampliamente utilizada para establecer las concentraciones óptimas de anticuerpos (Kalser, 2023). Según (Mateus et al., 2013), el empleo de concentraciones inadecuadas puede comprometer la calidad de los datos obtenidos. Diluciones excesivas generan señales débiles y menos reproducibles, lo que puede conducir a una subestimación de la expresión de los marcadores; por el contrario, concentraciones elevadas favorecen la unión inespecífica, incrementan el consumo de reactivos y pueden provocar la saturación del detector, aumentando la dispersión de las mediciones (Bonilla et al., 2024). Asimismo, se ha descrito que el ruido de fondo puede contribuir a la obtención de resultados falsos positivos y falsos negativos (Mateus et al., 2013). En este contexto, la inclusión del marcador de viabilidad empleado en el panel

resulta esencial, ya que permite excluir células muertas con alta tendencia a presentar uniones inespecíficas a los anticuerpos fluorescentes, mejorando la precisión del análisis.

La evaluación de la MFI permitió comparar cuantitativamente la expresión de los marcadores entre las distintas condiciones experimentales. Sin embargo, se observó una considerable dispersión de los datos entre los siete donantes analizados, lo que sugiere la presencia de una elevada variabilidad biológica (Dendrou et al., 2009; Vissers et al., 2013). Esta variabilidad podría haber influido en la capacidad para detectar diferencias estadísticamente significativas en algunos de los marcadores evaluados, a pesar de observarse tendencias en la expresión asociadas a la infección por DENV. La variabilidad observada concuerda con lo descrito por Brodin y Davis (2017) quienes señalan que el sistema inmunitario humano presenta una alta variabilidad entre individuos, resultado de la interacción de factores genéticos, ambientales, microbiológicos y de la historia previa de exposiciones inmunológicas. Asimismo, otros estudios afirman que subpoblaciones inmunitarias, como las células T CD56⁺ y las células T CD4 TEMRA, mostraron una elevada heterogeneidad interindividual. Otro factor asociado es la edad en cambios significativos en la frecuencia de múltiples poblaciones celulares, incluyendo una disminución marcada de las células T vírgenes en individuos de mayor edad. De igual forma, se observaron diferencias relacionadas con la etnia, lo que pone de manifiesto la necesidad de considerar estas covariables al interpretar los resultados de estudios de perfilado inmunitario

(Burel et al., 2017). En consecuencia, la variabilidad interindividual puede incrementar la dispersión de los datos obtenidos mediante citometría de flujo y dificultar la detección de diferencias estadísticamente significativas cuando se trabaja con tamaños muestrales limitados.

El análisis de la MFI en distintas poblaciones celulares reveló que, si bien se observaron tendencias de variación en algunos marcadores, ninguna alcanzó significancia estadística, lo que sugiere una respuesta fenotípica y funcional de baja magnitud en las condiciones experimentales evaluadas.

Monocitos clásicos: La inclusión de los monocitos como población de interés se fundamentó en su papel como principal diana celular del DENV y en su participación en la amplificación de la respuesta inflamatoria mediante la detección del ARN viral y la secreción de IFN-1 y citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Naranjo-Gómez et al., 2019). En este contexto, Nectin-2 presentó la mayor variación entre condiciones con una tendencia al alza en DENV-4 respecto a NI y DENV-2, lo cual podría reflejar una modulación de los ligandos de estrés celular inducida por la infección, dado que este marcador es reconocido por receptores activadores de células NK como DNAM-1. No obstante, la ausencia de significancia estadística limita la interpretación de este hallazgo. Por su parte, NS3 proteína no estructural que constituye uno de los principales blancos del reconocimiento por linfocitos T CD8⁺ (Tian et al., 2019) no mostró variaciones relevantes en su detección intracelular entre grupos, lo que podría estar

relacionado con el nivel de replicación viral alcanzado en el modelo *in vitro* utilizado.

Linfocitos T CD8⁺: Estas células desempeñan un rol esencial en el control de la infección por DENV mediante el reconocimiento y eliminación de células infectadas, un proceso mediado en gran parte por moléculas citotóxicas como perforina y granzimas (Ma & Cheng, 2022). Asimismo, durante la infección se ha descrito una expansión de subpoblaciones T CD8⁺ con marcadores de activación y elevada expresión de moléculas efectoras (Dash et al., 2024). Sin embargo, en el presente estudio, tanto LAMP-1 como perforina mostraron valores de MFI prácticamente idénticos entre NI, DENV-2 y DENV-4, sin tendencias consistentes. Esto podría indicar que la infección “*in vitro*” no fue suficiente para desencadenar la degranulación o la activación citotóxica plena de estas células, o que el tiempo de evaluación no coincidió con el pico de respuesta efectora.

Células NK: La incorporación de este tipo celular respondió a su capacidad de ejercer funciones citotóxicas frente a células infectadas por DENV mediante receptores como DNAM-1 y NKG2D, cuya activación depende de la expresión de ligandos de estrés como Nectin-2 (Beltrán y López-Vergès, 2014). En los resultados obtenidos, DNAM-1 y perforina se mantuvieron estables entre grupos. En cambio, TNF- α mostró una tendencia hacia valores superiores en DENV-2 frente a NI y DENV-4, lo cual es consistente con la participación de las células NK en la producción de citocinas y quimiocinas durante la infección por dengue (John

et al., 2015). Aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística, podría reflejar una respuesta inflamatoria incipiente o serotipo-específica que merecería evaluación con mayor tamaño muestral.

En general, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en todos los marcadores evaluados puede atribuirse a múltiples factores, entre ellos la variabilidad interindividual inherente al uso de sangre periférica de donantes sanos, el nivel de infección alcanzado “in vitro”, y las limitaciones del tamaño muestral al aplicar la prueba de Friedman. A pesar de ello, las tendencias observadas, particularmente en Nectin-2 y TNF- α , son biológicamente plausibles y coherentes con la literatura, lo que refuerza la pertinencia del panel diseñado para caracterizar la respuesta inmune celular frente a DENV-2 y DENV-4.

Entre las principales fortalezas de este estudio destaca la estandarización de un panel multiparamétrico de citometría de flujo espectral capaz de evaluar simultáneamente marcadores fenotípicos, funcionales y virales asociados con la respuesta inmune frente al DENV. Asimismo, el uso de un modelo de co-cultivo autólogo monocito-linfocito permitió analizar la interacción entre diferentes poblaciones celulares involucradas en la respuesta antiviral.

No obstante, el estudio presenta algunas limitaciones. El reducido número de donantes pudo limitar la capacidad para detectar diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales. Además, la evaluación se

realizó en un único tiempo postinfección, lo que impidió analizar la dinámica temporal de la respuesta inmunológica. Finalmente, al tratarse de un modelo in vitro, los resultados obtenidos deben interpretarse considerando que no reproducen completamente la complejidad de la respuesta inmune observada durante la infección natural por el virus del dengue.

Conclusiones

- Se logró diseñar y estandarizar exitosamente un panel multiparamétrico de citometría de flujo espectral para la caracterización simultánea de monocitos, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y células NK. El panel fue optimizado mediante titulación de anticuerpos y evaluación computacional en Cytex Cloud, obteniendo un Stain Index global de 16,19, lo que garantizó una adecuada resolución de las poblaciones celulares y de los marcadores evaluados.
- Se estableció un modelo experimental de infección in vitro utilizando los serotipos DENV-2 y DENV-4 en co-cultivos autólogos de monocitos y linfocitos humanos, permitiendo la evaluación de marcadores asociados con activación celular, citotoxicidad y reconocimiento inmunológico.
- La detección de la proteína viral NS3 confirmó la presencia de infección viral en las poblaciones celulares analizadas, validando la utilidad del modelo experimental para el estudio de la interacción huésped-virus.
- El análisis de la intensidad media de fluorescencia (MFI) mostró tendencias de variación en algunos marcadores inmunológicos, particularmente Nectin-2 en monocitos clásicos y TNF- α en células NK. Sin embargo, dichas diferencias no alcanzaron significancia estadística entre las condiciones no infectadas, DENV-2 y DENV-4.
- Los resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales empleadas, la infección por DENV-2 y DENV-4 no indujo modificaciones detectables en la expresión de los marcadores evaluados, aunque las

tendencias observadas podrían reflejar procesos biológicos que requieren una mayor profundidad de análisis.

- El panel desarrollado constituye una herramienta útil para futuros estudios de inmunomonitorio y caracterización de la respuesta inmune frente al virus del dengue mediante citometría de flujo espectral.

Recomendaciones

- Incrementar el número de donantes incluidos en futuros estudios con el fin de aumentar la potencia estadística y reducir el impacto de la variabilidad biológica individual.
- Incorporar marcadores adicionales asociados con la respuesta humoral la activación de células B y la producción de anticuerpos, con el propósito de profundizar en los mecanismos relacionados con la potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) y su posible contribución al desarrollo de formas graves de dengue.
- Ampliar el panel mediante la inclusión de citocinas proinflamatorias y reguladoras, tales como IL-6, IL-10 y MCP-1, con el fin de evaluar fenómenos asociados a la tormenta de citocinas y su relación con la severidad de la enfermedad.
- Extender la aplicación del panel a los cuatro serotipos del virus del dengue para comparar las respuestas inmunes inducidas por cada uno de ellos e identificar posibles diferencias en los mecanismos de activación y control viral.

Bibliografía

- Astakhova, E. A., Gubaeva, A. S., Naumova, D. A., Egorova, A. E., Maznina, A. A., Rybkina, I. G., Osmanov, I. M., Tabakov, D. V., Mityaeva, O. N., & Volchkov, P. Y. (2025). Spectral flow cytometry: The current state and future of the technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 5911. <https://doi.org/10.3390/ijms26125911>
- Baldi Mata, G., Hernández Redondo, S., & Gómez López, R. (2019). Actualización de la fiebre del Dengue. *Revista Medica Sinergia*, 5(1), e341. <https://doi.org/10.31434/rms.v5i1.341>
- Baquero, C. A. C., Estévez, D. A. B., & Hernández, E. C. (2022). Enfermedad mínima residual por citometría de flujo en pacientes con leucemia linfoblástica aguda. *Revista Nova*, 20(39), 163–180. <https://doi.org/10.22490/24629448.6593>
- Becton, Dickinson and Company. (2023). FlowJo™ software (Versión 10.10.1) [Software]. Ashland, OR: Becton, Dickinson and Company.
- BD Biosciences. (2023). BD Cytofix/Cytoperm™ fixation/permeabilization kit (Cat. No. 554714; RRID: AB_2869008) [Folleto de producto]. San Jose, CA: BD Biosciences. Recuperado de <https://www.bdbiosciences.com>
- BD Life Sciences. (2023). *FlowJo* (Version 10.10.1) [Software de análisis de citometría de flujo]. Ashland, OR, Estados Unidos. [FlowJo Official Website](https://www.flowjo.com/)
- Beltramello, M., Williams, K. L., Simmons, C. P., Macagno, A., Simonelli, L., Quyen, N. T. H., Sukupolvi-Petty, S., Navarro-Sanchez, E., Young, P. R., de Silva, A. M., Rey, F. A., Varani, L., Whitehead, S. S., Diamond, M. S.,

- Harris, E., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2010). The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host & Microbe*, 8(3), 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.08.007>
- Beltrán, D., & López-Vergès, S. (2014). NK cells during dengue disease and their recognition of dengue virus-infected cells. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00192>
- Bonilla, D. (2024). Evaluación de memoria celular utilizando citometría de flujo espectral de 45 colores [Tesis]. <https://cnbcolombia.com:8080/jspui/handle/123456789/322>
- Bonilla, D. L., Paul, A., Gil-Pulido, J., Park, L. M., & Jaimes, M. C. (2024). The power of reagent titration in flow cytometry. *Cells*, 13(20), 1677. <https://doi.org/10.3390/cells13201677>
- Bos, S., Graber, A. L., Cardona-Ospina, J. A., Bosch, W., Jaenisch, T., Screatton, G., Dejnirattisai, W., Mongkolsapaya, J., Moreira, R. A., Madera, L. S. B., Siber, G. R., Restrepo, B. N., de Silva, A. D., Bhatt, S., & Katzelnick, L. C. (2024). Protection against symptomatic dengue infection by neutralizing antibodies varies by infection history and infecting serotype. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44330-8>
- Brestoff, J. R. (2023). Full spectrum flow cytometry in the clinical laboratory. *International Journal of Laboratory Hematology*, 45(S2), 44–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.14098>

- Brodin, P., & Davis, M. M. (2017). Human immune system variation. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 21–29. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.125>
- Böyum, A. (1968). *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4179068/>
- Burel, J. G., Qian, Y., Arlehamn, C. L., Weiskopf, D., Zapardiel-Gonzalo, J., Taplitz, R., Gilman, R. H., Saito, M., de Silva, A. D., Vijayanand, P., Scheuermann, R. H., Sette, A., & Peters, B. (2017). An integrated workflow to assess technical and biological variability of cell population frequencies in human peripheral blood by flow cytometry. *Journal of Immunology*, 198(4), 1748–1758. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601750>
- Cáceres, B. A., Castellanos Parra, J. E., & Rodríguez Panduro, M. H. (2019). Amplificación de la infección dependiente de anticuerpos en la inmunopatogénesis del dengue grave, implicaciones para el desarrollo y uso de las vacunas. *Acta Biológica Colombiana*, 24(3), 439–451. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n3.79410>
- Cadena, A. R. (2020). Vacuna de dengue. *Acta Pediátrica de México*, 41(2), 99–104. <https://doi.org/10.18233/APM41No2pp99-1042015>
- Castillo, J. A., & Urcuqui, S. (2015). Dengue virus control of type I IFN responses: A history of manipulation and control. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 35(6), 421–430. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0129>

CDC. (2025, julio 7). Cómo se propaga el dengue. <https://www.cdc.gov/dengue/es/transmission/como-se-propaga-el-dengue.html>

Chen, J., Goss, C., Avecilla, S. T., Hong, H., Walsh, E., Wuest, D., Maslak, P., & Pessin, M. S. (2019). Evaluation of peripheral blood mononuclear cell collection by leukapheresis. *Transfusion*, 59(5), 1765-1772. <https://doi.org/10.1111/trf.15186>

Chen-Germán, M., Araúz, D., Aguilar, C., Vega, M., Gonzalez, C., Gondola, J., Moreno, L., Cerezo, L., Franco, L., Mendez-Rico, J., Pascale, J. M., López-Vergès, S., Martínez, A. A., & Moreno, B. (2024). Detection of dengue virus serotype 4 in Panama after 23 years without circulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1467465>

Contreras, M., Rincón, M., Vásquez, A., Moreira, R., & Callejas, D. (2021). Aspectos genéticos del virus del dengue. *Revista de Ciencias de la Salud*, 5, 79–88. <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/QhaliKay/article/view/3496>

Cordero, C. D. (2025). Análisis de la infectividad in vitro e in vivo de las vesículas extracelulares pequeñas (sEV) procedentes de células de mosquito C6/36 infectados con DENV [Tesis doctoral, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional]. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/5933>

Costa, V. V., Ye, W., Chen, Q., Teixeira, M. M., Preiser, P., Ooi, E. E., & Chen, J. (2017). Dengue virus-infected dendritic cells, but not monocytes, activate natural killer cells through a contact-dependent mechanism involving

adhesion molecules. mBio, 8(4), e00741-17.

<https://doi.org/10.1128/mBio.00741-17>

Czechowka, K., Bonilla, D., Cotty, A., Dankar, A., Mead, P. E., & Nash, V. (2025).

Más allá de los límites: ¿Cómo está transformando la citometría de flujo espectral el panorama clínico y qué nos depara el futuro? Cells. MDPI.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cells14130997>

Dash, M. K., Samal, S., Rout, S., Behera, C. K., Sahu, M. C., & Das, B. (2024).

Immunomodulation in dengue: Towards deciphering dengue severity markers. Cell Communication and Signaling, 22(1), 451.

<https://doi.org/10.1186/s12964-024-01779-4>

Delgado, F. G., Pérez Acosta, A. M., & Castellanos, J. E. (2014). Descripción de un

modelo de infección in vitro con virus dengue empleando células mononucleares humanas de sangre periférica. Iatreia, 27(3), 267–277.

Dendrou, C. A., Fung, E., Esposito, L., Todd, J. A., Wicker, L. S., & Plagnol, V.

(2009). Fluorescence Intensity Normalisation: Correcting for Time Effects in Large-Scale Flow Cytometric Analysis. *Advances in Bioinformatics*, 2009, 476106. <https://doi.org/10.1155/2009/476106>

Díaz, Y., Chen-Germán, M., Quiroz, E., Carrera, J.-P., Cisneros, J., Moreno, B.,

Cerezo, L., Martinez-Torres, A. O., Moreno, L., Barahona de Mosca, I.,

Armién, B., Chen, R., Vasilakis, N., & López-Vergès, S. (2019). Molecular

Epidemiology of Dengue in Panama: 25 Years of Circulation. *Viruses*, 11(8),

764. <https://doi.org/10.3390/v11080764>

- Dhole, P., Zaidi, A., Nariya, H. K., Sinha, S., Jinesh, S., & Srivastava, S. (2024). Host immune response to dengue virus infection: Friend or foe? *Immuno*, 4(4), 549–577. <https://doi.org/10.3390/immuno4040033>
- Fernandes, C., & Leal, E. (2022). Innate immune response to dengue virus: Toll-like receptors and antiviral response. *Viruses*, 14(5), 992. <https://doi.org/10.3390/v14050992>
- Galindo, M., Brito Portuondo, C. A., & Borroto Martínez, K. (2023). Dengue: Escenario actual. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 75(2). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602023000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- García, L. S., Camejo Roviralta, L., Concepción Parra, W., & Martínez Pupo, R. C. (2022). Comportamiento de los componentes del sistema inmune durante la enfermedad del dengue.
- Ghosh, A., Mondal, S., Sadhukhan, S., & Sadhukhan, P. C. (2025). Dengue virus and the host immune system: A battle of immune modulation, response and evasion. *Pathogens*, 14(11), 1132. <https://doi.org/10.3390/pathogens14111132>
- Guzmán, M. G., & Kourí, G. (2004). Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(2), 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.003>
- Hamlin, R. E., Rahman, A., Pak, T. R., Maringer, K., Mena, I., Bernal-Rubio, D., Potla, U., Maestre, A. M., Fredericks, A. C., Amir, E. D., Kasarskis, A., Ramos, I., Merad, M., & Fernandez-Sesma, A. (2017). High-dimensional

- CyTOF analysis of dengue virus–infected human DCs reveals distinct viral signatures. JCI Insight, 2(13), e92424. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92424>
- Holguín, L. N. A., & Duque Varela, J. P. (2020). Estandarización de una metodología para la cuantificación de títulos virales por citometría de flujo: Virus dengue y zika [Tesis de pregrado]. Universidad El Bosque.
- John, D. V., Lin, Y.-S., & Perng, G. C. (2015). Biomarkers of severe dengue disease – a review. Journal of Biomedical Science, 22, 83. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0191-6>
- Kalser, S. (2023). Stain index for flow cytometry—Explained. FluoroFinder. <https://fluorofinder.com/stain-index-flow-cytometry/>
- Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. Science, 358(6365), 929–932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
- Kayesh, M. E. H., & Tsukiyama-Kohara, K. (2022). Mammalian animal models for dengue virus infection: A recent overview. Archives of Virology, 167(1), 31–44. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05298-2>
- Khan, M. B., Yang, Z.-S., Lin, C.-Y., Hsu, M.-C., Urbina, A. N., Assavalapsakul, W., Wang, W.-H., Chen, Y.-H., & Wang, S.-F. (2023). Dengue overview: An updated systematic review. Journal of Infection and Public Health, 16(10), 1625–1642. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.08.001>

- Khanam, A., Gutiérrez-Barbosa, H., Lyke, K. E., & Chua, J. V. (2022). Immune-mediated pathogenesis in dengue virus infection. *Viruses*, 14(11), 2575. <https://doi.org/10.3390/v14112575>
- King, C. A., Wegman, A. D., & Endy, T. P. (2020). Mobilization and activation of the innate immune response to dengue virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.574417>
- Kularatne, S. A. M., & Dalugama, C. (2022). Dengue infection: Global importance, immunopathology and management. *Clinical Medicine*, 22(1), 9–13. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0791>
- Lauer, F. T., Denson, J. L., & Burchiel, S. W. (2017). Isolation, Cryopreservation, and Immunophenotyping of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Current protocols in toxicology*, 74, 18.20.1-18.20.16. <https://doi.org/10.1002/cptx.31>
- Lee, M. F., Voon, G. Z., Lim, H. X., Chua, M. L., & Poh, C. L. (2022). Innate and adaptive immune evasion by dengue virus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1004608. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1004608>
- Ma, E., & Cheng, G. (2022). Host immunity and vaccine development against dengue virus. *Infectious Medicine*, 1(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.imj.2021.12.003>
- Marrero, Y. T., Casado Hernández, I., Marsán Suárez, V., Pérez, Y. D., Ramos, E. H., Morán, O. O., Díaz, D. R., & Fornaris, L. E. G. (2025). Inmunofenotipo por

- citometría de flujo de un paciente con micosis fungoide. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 41. <https://revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/1853>
- Martina, B. E. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Dengue virus pathogenesis: An integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 564–581. <https://doi.org/10.1128/cmr.00035-09>
- Martínez, H. (2022). Conventional flow cytometry vs. spectral flow cytometry. Novus Biologicals. <https://www.novusbio.com/antibody-news/conventional-flow-cytometry-vs-spectral-flow-cytometry>
- Mateus, J., Lasso, P., González, J. M., Puerta, C. J., & Cuéllar, A. (2013). Diseño de un panel multicolor para evaluar moléculas intracelulares y de superficie mediante citometría de flujo. *Biomédica*, 33(4). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.1709>
- Mathew, A. (2018). Defining the role of NK cells during dengue virus infection. *Immunology*, 154(4), 557–562. <https://doi.org/10.1111/imm.12928>
- Mathew, A., Townsley, E., & Ennis, F. A. (2014). Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. *Future Microbiology*, 9(3), 411–425. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.171>
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., & Radbruch, A. (1990). *Separación celular magnética de alto gradiente con MACS - Miltenyi—1990—Citometría—Biblioteca en línea de Wiley*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cyto.990110203>

- MINSA. (2025). MINSA redobla medidas y estrategias para prevenir el dengue. Ministerio de Salud de la República de Panamá. <https://www.minsa.gob.pa/noticia/minsa-redobla-medidas-y-estrategias-para-prevenir-el-dengue>
- Morales, M. G., Delgado Longoria, V., & Contreras Cardenas, M. C. (2026). Panorama epidemiológico del dengue en la Unidad de Medicina Familiar No. 57 en Irapuato Guanajuato durante el periodo 2014–2024. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 10(1), 4844–4868. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v10i1.22594
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Nanaware, N., Banerjee, A., Mullick Bagchi, S., Bagchi, P., & Mukherjee, A. (2021). Dengue virus infection: A tale of viral exploitations and host responses. *Viruses*, 13(10), 1967. <https://doi.org/10.3390/v13101967>
- Naranjo, J. S., Castillo, J. A., Velilla-Hernández, P. A., & Castaño, D. M. (2019). Inmunopatología del dengue: Importancia y participación de los monocitos y sus subpoblaciones. *Iatreia*, 32(3), 204–216. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.09>
- Nylander, S., & Kalies, I. (1999). Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: Efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry.

- Journal of Immunological Methods, 224(1), 69–76.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00010-1)
- OPS. (2019, agosto 31). Diagrama: Clasificación modificada de la gravedad del dengue. Organización Panamericana de la Salud.
<https://www.paho.org/es/documentos/diagrama-clasificacion-modificada-gravedad-dengue-jpg>
- OPS. (2025a, abril 22). Dengue: Síntomas, prevención y tratamientos. Organización Panamericana de la Salud.
<https://www.paho.org/es/temas/dengue>
- OPS. (2025b). Orientaciones regionales para la vigilancia de seguridad de la vacuna contra dengue Qdenga – TAK-003. Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/documentos/orientaciones-regionales-para-vigilancia-seguridad-vacuna-contra-dengue-qdenga-tak-003>
- Paranavitane, S. A., Gomes, L., Kamaladasa, A., Adikari, T. N., Wickramasinghe, N., Jeewandara, C., Shyamali, N. L. A., Ogg, G. S., & Malavige, G. N. (2014). Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. BMC Infectious Diseases, 14, 570. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0570-8>
- Pardo, D., Ojeda Martínez, B., & Alonso Remedios, A. (2018). Dinámica de la respuesta inmune en la infección por virus del dengue. MediSur, 16(1), 76–84.
- Pedraza-Escalona, M., Izar-Marín, D., Muñoz-Herrera, J. C., & Pérez-Tapia, S. M. (2025). Humoral immune response to dengue virus serotypes: Challenges and emerging solutions. En Update on Orthoflavivirus - Understanding

- Orthoflavivirus, Potential Reemerging Pathogens. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.1012333>
- Peinado, R. dos S., Eberle, R. J., Pacca, C. C., Arni, R. K., & Coronado, M. A. (2022). Review of -omics studies on mosquito-borne viruses of the Flavivirus genus. *Virus Research*, 307, 198610.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198610>
- Perera, D. R., Ranadeva, N. D., Sirisena, K., & Wijesinghe, K. J. (2024). Roles of NS1 protein in flavivirus pathogenesis. *ACS Infectious Diseases*, 10(1), 20–56. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00566>
- Pérez, J. C., Santiago Cruz, W., Romero-Ramírez, H., & Rodríguez-Alba, J. C. (2018). Fundamentos de citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 18(2), 41–52. <https://doi.org/10.25009/rmuv.2018.2.59>
- Pradeep, S. P., Hoovina Venkatesh, P., Manchala, N. R., Moideen, A., Pawar, G., Vishnupriya, S., Boppana, V. K., Thomas, S., & Babu, S. (2021). Innate immune cytokine profiling and biomarker identification for outcome in dengue patients. *Frontiers in Immunology*, 12, 677874.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.677874>
- Ramírez Orellana, M. (2012). Citometría de flujo: Qué puede aportar al diagnóstico hematológico en pediatría. *Anales de Pediatría Continuada*, 10(5), 282–285.
[https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(12\)70099-9](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(12)70099-9)

- Rico-Hesse, R. (2009). Dengue virus virulence and transmission determinants. En *Dengue Virus* (Vol. 338, pp. 45–55). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02215-9_4
- Riedhammer, C., Halbritter, D., & Weissert, R. (2016). Peripheral blood mononuclear cells: Isolation, freezing, thawing, and culture. *Methods in Molecular Biology*, 1304, 53–61. https://doi.org/10.1007/7651_2014_99
- Robinson, J. P., Gmyrek, G. B., & Rajwa, B. (2026). Flow cytometry: Advances, challenges and trends. *BioEssays*, 48(1), e70091. <https://doi.org/10.1002/bies.70091>
- Robinson, J. P., Ostafe, R., Iyengar, S. N., Rajwa, B., & Fischer, R. (2023). Flow cytometry: The next revolution. *Cells*, 12(14), 1875. <https://doi.org/10.3390/cells12141875>
- Roca, C. P., Burton, O. T., Gergelits, V., Prezzemolo, T., Whyte, C. E., Halpert, R., Kreft, Ł., Collier, J., Botzki, A., Spidlen, J., Humblet-Baron, S., & Liston, A. (2021). AutoSpill is a principled framework that simplifies the analysis of multichromatic flow cytometry data. *Nature Communications*, 12(1), 2890. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23126-8>
- Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(16), 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
- Ross, T. M. (2010). Dengue virus. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.007>

- Sánchez, L. E., Espinosa, A., & Diosdado, F. (2022). La citometría de flujo, un universo de posibilidades en el ámbito veterinario. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 13(3), 763–786. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i3.5985>
- Sarker, A., Dhama, N., & Gupta, R. D. (2023). Dengue virus neutralizing antibody: A review of targets, cross-reactivity, and antibody-dependent enhancement. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1200195>
- Schmid, M. A., Diamond, M. S., & Harris, E. (2014). Dendritic cells in dengue virus infection: Targets of virus replication and mediators of immunity. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00647>
- Segura, K., Martel, F., Franco, M. A., Perdomo-Celis, F., & Narváez, C. F. (2025). Virus-like particles and spectral flow cytometry for identification of dengue virus-specific B cells in mice and humans. *Viruses*, 18(1), 58. <https://doi.org/10.3390/v18010058>
- Taecharan, N., Scherwitzl, I., Supasa, P., Dejnirattisai, W., Sriurksa, K., Limpitikul, W., Malasit, P., Screaton, G. R., Mongkolsapaya, J., & Duangchinda, T. (2024). The alteration of NK cells phenotypes related to the functions and dengue disease outcomes. *Virus Research*, 345, 199382. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2024.199382>
- Tian, Y., Grifoni, A., Sette, A., & Weiskopf, D. (2019). Human T cell response to dengue virus infection. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02125>

- Uriostegui Patiño, L. N., & Velasquez, R. (2022). Fundamentos de citometría de flujo. *Mensaje Bioquímico*, 46, 66–77.
- Valdivieso, F. V., Palma Patiño, R. S., Peña Carillo, M. S., Tello, F., Loachamín, G., Romero, I., & Flores, J. (2022). Virus tropicales emergentes: Zika, dengue y chikungunya, una revisión enfocada en inmunología y el desarrollo de vacunas. *Revista de Investigación Talentos*, 9(2), 32–52. <https://doi.org/10.33789/talentos.9.2.168>
- Velasco, J. C., & Cano, A. L. (2024). Dengue: Estado del arte. *Journal of SIDVI*, 3, 19–24. <https://doi.org/10.57594/1047>
- Viettri, M., Rodríguez León, F., Zambrano, J. L., & Ludert, J. E. (2022). La replicación del virus del dengue induce respuestas de estrés en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi. *Universitas Medica*, 63(3). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed63-3.deng>
- Visser, M., Habets, M. N., Ahout, I. M. L., Jans, J., de Jonge, M. I., Diavatopoulos, D. A., & Ferwerda, G. (2013). An In vitro Model to Study Immune Responses of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells to Human Respiratory Syncytial Virus Infection. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (82), 50766. <https://doi.org/10.3791/50766>
- Waij, L. A., van Cranenbroek, B., & Koenen, H. J. P. M. (2025). OMIP-112: 42-parameter (40-color) spectral flow cytometry panel for comprehensive immunophenotyping of human peripheral blood leukocytes. *Cytometry Part A*, 107(4), 226–232. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24927>

- Wong, K. L., Chen, W., Balakrishnan, T., Toh, Y. X., Fink, K., & Wong, S.-C. (2012). Susceptibility and response of human blood monocyte subsets to primary dengue virus infection. *PLOS ONE*, 7(5), e36435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036435>
- Yung, C.-F., Lee, K.-S., Thein, T.-L., Tan, L. K., Gan, V. C., Wong, J. G., Lye, D. C., Ng, L.-C., & Leo, Y.-S. (2015). Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, Singapore. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(5), 999–1005. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0628>
- Zhou, Q.-Y., Song, J.-L., Wu, X., Qian, K., Hu, L.-L., Ma, X.-Y., Zhou, J.-M., Zhu, J.-J., Aimaiti, M., Huang, R.-T., Zhou, Q., Zhang, Y.-T., Guan, M., Lin, Y., & Chen, S.-Y. (2026). Advances in flow cytometry: Technological innovations and their expanding role in biomedical research and clinical practice. *LabMed Discovery*, 3(1), 100116. <https://doi.org/10.1016/j.lmd.2026.100116>
- Zimmer, C. L., Cornillet, M., Solà-Riera, C., Cheung, K.-W., Ivarsson, M. A., Lim, M. Q., Marquardt, N., Leo, Y.-S., Lye, D. C., Klingström, J., MacAry, P. A., Ljunggren, H.-G., Rivino, L., & Björkström, N. K. (2019). NK cells are activated and primed for skin-homing during acute dengue virus infection in humans. *Nature Communications*, 10(1), 3897. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11878-3>
- Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal models of dengue virus infection. *Viruses*, 4(1), 62–82. <https://doi.org/10.3390/v40100>

Anexos

Anexo 1: Aprobación del Protocolo EC CBITPC 267 por parte del Comité de Bioética en Investigación de The Panama Clinic.

FORMATO					
FORMULARIO DE NOTIFICACIÓN DE RESULTADO DE REVISIÓN					
Código	Versión	Fecha efectiva	Fecha de próxima revisión	Estado	
FR-CBI-031	1	17/OCT/2023	12/ENE/2026	Publicado	

Notificación de Resultado Revisión	
Fecha	06 febrero 2026
Tipo de Documento (Protocolo, Enmienda, Flyer, etc.)	protocolo
Número de Documento	5117
Código del Documento	EC CBITPC 267
Título de Documento	Caracterización de la respuesta inmune celular frente al virus del Dengue (DENV-2 y DENV-4), mediante Citometría de flujo espectral en co-cultivos autólogos de monocitos-linfocitos".
Patrocinador	n/a
Investigador Principal	Lic. Natasha Sánchez

Resultado de la Revisión
De acuerdo con la decisión de: Aprobado Atentamente,  Dr. Marcos Young Presidente Comité de Bioética en Investigación de The Panama Clinic.

Propiedad del Comité de Bioética en Investigación de The Panama Clinic. Confidencial. Prohibido cualquier uso, publicación y/o distribución sin autorización.
<https://thepanamaclinic.com/>

Anexo 2. Diseño del panel de citometría de flujo espectral en Cytel Cloud, mostrando la asignación de fluorocromos a cada marcador según su intensidad de expresión y compatibilidad espectral.

