



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN LA LÍNEA
CELULAR RAJI Y EN CULTIVOS PRIMARIOS DE
LINFOCITOS B HUMANOS INFECTADOS CON
VIRUS DEL DENGUE SEROTIPO 2**

T E S I S

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

PRESENTA:

ANGÉLICA BERENICE VARGAS CASTILLO

**ASESORES: DR. ALEJANDRO ESCOBAR GUTIÉRREZ
DR. SALVADOR FONSECA CORONADO**

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

- ❖ A Dios, por ser la luz que guía mi camino, por ser mi apoyo y fortaleza, por acompañarme en cada momento de mi vida y darme siempre lo mejor, solo en Tu amor tiene sentido mi vida.
- ❖ A mis padres Francisco y Angélica, porque gracias a todo su amor, comprensión, valores, esfuerzo, confianza y cuidados he logrado todo lo que soy. Ustedes son mi ejemplo, orgullo y principal inspiración, son todo para mí.
- ❖ A mi hermana Conchita, gracias por siempre estar ahí, por los momentos que hemos vivido juntas, por hacerme reír, por ser única, simplemente por ser tú. Eres la mejor hermana que se puede pedir. Bff.
- ❖ A mis abuelitos Francisco, Raúl, Concepción y Carmen, que aunque ya no están aquí, siempre los tengo presentes en mi mente y en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Dr. Alejandro Escobar por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su interés, consejos y apoyo.
- ❖ Al Dr. Salvador Fonseca por su invaluable apoyo, asesoría y tiempo dedicado, por ser una guía para la realización de este trabajo.
- ❖ A Karina porque además de sus consejos, tiempo y ayuda en todo momento, me brindó su amistad, lo cual agradezco y valoro infinitamente.
- ❖ A las personas en el InDRE: Raque, Juan Alberto, Amelia, Lupita R., Pedro, Juan Carlos, Barbarita, Lupita G., Lupita T. y Fernando, por siempre tener un momento para ayudarme, por sus consejos y experiencia que me han hecho crecer como profesionista.
- ❖ A mis profesores que gracias a sus enseñanzas he logrado llegar hasta aquí y porque de alguna manera forman parte de lo que ahora soy.

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) con el apoyo de la beca S0008-08-01-87653-01-034 dentro del marco del proyecto CONACyT Salud-2008-C01-87653 “Desarrollo de una técnica de citometría de flujo para la determinación intracelular de la proteína NS1 (DV-NS1-CF) para el diagnóstico temprano de casos de dengue”

CONTENIDO

Introducción.....	1
Definición de la enfermedad	1
Epidemiología	2
Agente etiológico.....	2
Ciclo de replicación viral.....	3
Inmunopatología del dengue.....	5
Antecedentes	6
Las células B en el curso de la infección	6
Apoptosis e infección viral.....	7
Citometría de flujo	10
Justificación	11
Hipótesis	11
Objetivos	12
General	12
Específicos.....	12
Plan de trabajo.....	13
Materiales y métodos	14
Virus.....	14
Titulación del virus por el método de formación de placas líticas.....	14
Línea celular Raji	15
Purificación de PBMC de sangre periférica	15
Purificación de linfocitos B con perlas paramagnéticas	16
Infección celular	17
Comprobación de la infección por citometría de flujo	17

Determinación de sNS1 por ELISA	18
Determinación de viabilidad	18
Determinación de apoptosis por Caspasa-3 activa.....	18
Determinación de apoptosis por Anexina V-FITC	19
Análisis estadístico.....	19
Resultados	20
Discusión	35
Conclusiones.....	44
Perspectivas	44
Referencias	45

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo Monoclonal
ADE	Antibody-dependent enhancement (Infección facilitada anticuerpos)
ATCC	American Type Culture Collection (Colección americana tipos de cultivo)
BHK	Baby Hamster Kidney (Riñón de hamster bebé)
BSA	Bovine Serum Albumin (Albúmina Sérica Bovina)
CF	Citometría de Flujo
CO	Cut off (Valor umbral)
DC	Dengue Clásico
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin
DENV	Virus del dengue
DH	Dengue Hemorrágico
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidad óptica

ECP	Efecto Citopático
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EUA	Estados Unidos de América
FD	Fiebre del dengue
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)
FS	Fosfatidilserina
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico
hpi	Horas post-infección
kDa	Kilodalton
MEM	Minimum Essential Media (Medio Esencial Mínimo)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mNS1	Membrane Associated Non Structural Protein 1 (Proteína No Estructural 1 asociada a la membrana)

MOI	Multiplicity of infection (Multiplicidad de Infección)
NS1	Proteína No Estructural 1
PBA	Phosphate buffered saline added with sodium azide (Solución amortiguadora de fosfatos adicionado con azida de sodio)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células Mononucleares de Sangre Periférica)
PBS	Phosphate buffered saline (Solución amortiguadora de fosfatos)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase (3-fosfatidil-inositol cinasa)
PE	Phycoerythrin (Ficoeritrina)
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (Regulado en la activación, expresado y secretado en las células T normales)
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
RE	Retículo Endoplásmico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Instituto Conmemorativo Parque Roswell)
sNS1	secreted Non Structural Protein 1 soluble (Proteína No Estructural 1 secretada)

SCD	Síndrome de Choque por dengue
S/CO	Relación muestra
SFB	Suero Fetal Bovino
TNF	Tumor Necrosis Factor (Factor de necrosis tumoral)
UFP	Unidad Formadora de Placas
xg	Gravedades
µg	Microgramo

INTRODUCCIÓN

Definición de la enfermedad

El dengue es una enfermedad con cuadro febril agudo producida por el virus del dengue (DENV) el cual es transmitido al ser humano por dos especies de mosquitos vectores, Aedes aegypti y Ae. albopictus (figura 1).



Figura 1. *Ae. aegypti*.

La infección con cualquiera de los cuatro serotipos del DENV (DENV-1, -2, -3 y -4) puede ser asintomática en la mayoría de los casos o dar lugar a un amplio espectro de signos y síntomas clínicos que comúnmente se caracterizan por la rápida aparición de fiebre en combinación con dolor de cabeza intenso, dolor retro-orbitario, mialgias, artralgias, malestar gastrointestinal y en algunos casos, exantema; el cuadro anterior describe la fiebre por dengue o dengue clásico (FD o DC). La forma más grave de la enfermedad, el dengue hemorrágico (DH), se caracteriza por todos los síntomas de FD, en combinación con manifestaciones hemorrágicas (prueba de torniquete positiva o sangrado espontáneo), trombocitopenia, y evidencia de aumento de la permeabilidad vascular (hemoconcentración mayor o derrame de líquido en el pecho o las cavidades abdominales), lo que puede progresar a síndrome de choque por dengue (SCD), caracterizado por un cuadro de choque hipovolémico, durante el cual, si los pacientes no reciben un rápido y adecuado tratamiento, puede iniciarse una etapa de choque profundo, en la que el pulso y la presión arterial llega a ser indetectable resultando en la muerte dentro de 12 a 36 horas después del inicio del choque (Harris y col. 2000; WHO, 1997).

Epidemiología

La distribución geográfica del vector incluye zonas tropicales y subtropicales del mundo que reúnen los requisitos indispensables de clima para la sobrevivencia del mismo, entre las cuales además se encuentran las naciones con mayores carencias económicas y de salud. Se estima que cada año se presentan entre 50-100 millones de casos de FD y de 250,000 a 500,000 casos de DH dependiendo de la actividad epidémica (Guzmán y Kouri, 2002). En México, la distribución del vector y por tanto, el mayor riesgo de transmisión de dengue se presentan en los estados que se localizan en las costas del país (figura 2). Hasta agosto de 2010, en la República Mexicana se reportaron 12,240 casos de dengue confirmados, de los cuales 9,720 fueron casos de FD y 2,520 de DH.



Figura 2. Riesgo de transmisión de dengue en México

Agente Etiológico

El DENV es miembro del género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*), que se caracteriza por tener una cápside icosaédrica cubierta por una membrana lipídica o envoltura que da lugar a una apariencia esférica de la partícula viral y posee un diámetro aproximado de 50 nm (figura 3). En su interior contiene como genoma una molécula

de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de 10.7kb que codifica para tres proteínas estructurales: la proteína de envoltura (E), la proteína asociada a la membrana (M), y la proteína de cápside (C), así como para siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) que se expresan y participan durante el proceso de replicación viral (Lindenbach y Rice., 2003).

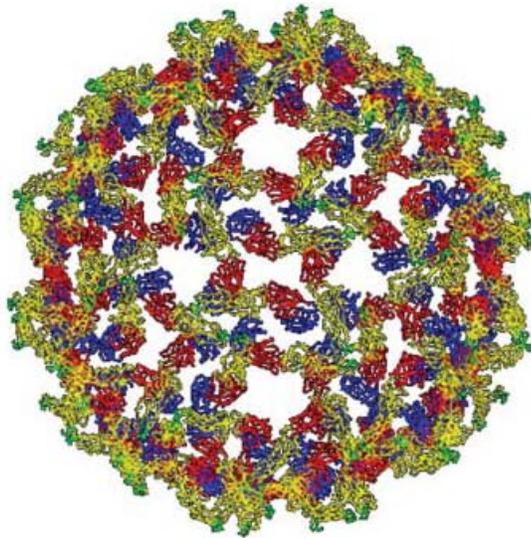


Figura 3. Virus del dengue

Ciclo de replicación viral

El DENV entra a su célula blanco mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor, el único receptor descrito hasta el momento es DC-SIGN, del inglés *Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin*, el cual se expresa en células dendríticas (Tassaneetrithep y col., 2003), que inicialmente captura al virus en la superficie celular y es internalizado a la célula mediante transporte endosomal, donde el bajo pH induce la trimerización de la proteína E viral, exponiendo el péptido fusogénico y promoviendo la fusión de las membranas viral y celular. Posteriormente, la nucleocápside es liberada al citoplasma y tras sufrir un proceso de desnudamiento, el RNA de polaridad positiva es liberado e inicia el proceso de replicación ya que este puede actuar como RNA mensajero para la traducción de una poliproteína, que es procesada por proteasas tanto del virus como del hospedero. El proceso de

replicación se da mediante la síntesis de una molécula de RNA de doble cadena (forma replicativa), donde se forma la cadena negativa complementaria (intermediario de replicación) que es empleada como molde para la producción de nuevas moléculas de RNA positivo. Subsecuentemente, varias etapas de traducción son seguidas por ensamblaje del virión en el retículo endoplásmico (RE). Inicialmente, las partículas inmaduras son llevadas al lumen del RE, estas partículas contienen las proteínas E y prM, así como la membrana lipídica y la nucleocápside pero no son infecciosas. El virión madura en el aparato de Golgi y es liberado mediante exocitosis (Lindenbach y Rice, 1997; Devappa y Satchidanandam, 2003; Del Ángel, 2006).

Se ha demostrado que durante la replicación viral hay expresión de proteína E en la superficie de las células infectadas y simultáneamente se lleva a cabo la secreción de la glicoproteína NS1 al medio extracelular, lo que ha sugerido que esta proteína tiene importancia en los fenómenos inmunopatológicos del dengue. La proteína NS1 es una glicoproteína de 46-50 kDa que, aunque está ausente en la partícula viral infecciosa, es esencial dentro de las células infectadas ya que funciona como un cofactor para la replicación del RNA viral interactuando con la forma replicativa de este (Lindenbach y Rice, 1999) y se ha demostrado que participa en las primeras fases de la replicación viral de acuerdo con su retención en los organelos de la célula infectada y con su capacidad para interactuar con las membranas (Flamand y col., 1999). Esta proteína se sintetiza en una célula infectada como monómero soluble y rápidamente se dimeriza en el lumen del RE, con posterior transporte a la superficie celular (NS1 asociada a la membrana [mNS1]) y liberación al medio extracelular (NS1 secretada [sNS1]) (Winkler y col., 1989) en forma de hexámero (Flamand y col., 1999), acumulándose en grandes cantidades (hasta 50 µg/mL) en el suero de los pacientes (Libraty y col., 2002), lo que sirve de fundamento para realizar el diagnóstico de laboratorio mediante la identificación de la NS1 mediante ELISA y en ensayos de infección "in vitro" para comprobar replicación viral activa.

Inmunopatología del Dengue

El concepto más común de la inmunopatología del DH recae en la evidencia epidemiológica que indica un mayor riesgo de desarrollar esta forma severa en una infección secundaria de dengue, para lo cual se ha propuesto el modelo de infección facilitada por anticuerpos (ADE del inglés *antibody-dependent enhancement*) que postula que algunos anticuerpos específicos para DENV, ya sea anticuerpos de reactividad cruzada de una infección previa o niveles sub-neutralizantes de anticuerpos específicos de un serotipo, pueden interactuar con el virus sin neutralizarlo pero tienen la capacidad de formar complejos inmunes con las partículas virales, por tanto, el reconocimiento de estos complejos por los receptores Fc presentes en monocitos/macrófagos, tiene como efecto un aumento de la internalización y por lo tanto, en la infección por el virus de estas células blanco. (Halstead, 2003).

Además del fenómeno de facilitación, se ha descrito que los anticuerpos anti-DENV tienen reacción cruzada con las plaquetas y células endoteliales en humanos y ratones (Falconar y Young, 1990), lo que puede contribuir a la patogénesis durante la infección por DENV mediante la destrucción de estas células por activación de la vía clásica del complemento (Clyde y col., 2006).

Los factores de riesgo involucrados con la severidad de la enfermedad son la edad, el serotipo viral y el genotipo, así como los antecedentes genéticos del hospedero, entre otros. Algunos estudios retrospectivos y prospectivos en humanos han demostrado que la infección secundaria por un serotipo heterólogo es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de DH/SCD, aunque se ha establecido que determinados genotipos de DENV-2 y DENV-3 se asocian con DH en infecciones primarias (Clyde y col., 2006).

Se ha sugerido que los niveles de sNS1 también podrían estar relacionados con la severidad de la enfermedad. Avirutnan y col. (2006) reportaron que hay niveles más altos de sNS1 en el plasma de individuos que desarrollaron DH que en el de los

pacientes con FD, lo que indica que la medición de este antígeno puede ser de utilidad pronóstica en el desarrollo DH. Este grupo también demostró que los componentes del complemento en el suero humano normal fueron activados por la adición de NS1 y anticuerpos anti-NS1, lo que sugiere un efecto inmunopatológico directo de los complejos sNS1-anticuerpo en la activación inapropiada de la respuesta inmune.

Además, se ha propuesto un mecanismo de mimetismo molecular en el que los anticuerpos anti-NS1 tienen una reacción cruzada con las células endoteliales, resultando en una activación de éstas, lo que provoca altos niveles de citocinas, quimiocinas y expresión de moléculas de adhesión con una subsecuente adhesión de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) a las mismas. La activación puede favorecer la vasculopatía observada en la infección por DENV vía factor de transcripción NF- κ B en DH/SCD (Lin y col., 2005; Lin y col., 2003).

La inmunopatogenia del DENV también incluye respuestas de memoria de células B y T y algunos marcadores de la severidad del dengue encontrados en sangre periférica que correlacionan con la extravasación de plasma en pacientes con DH incluyen varias citocinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión que se encuentran expresadas en altos niveles, productos de activación del complemento, incremento en la activación de células y un gran número de células que son inducidas a apoptosis. (Clyde y col., 2006).

ANTECEDENTES

Las células B en el curso de la infección

Durante la fase aguda de la infección por DENV, las partículas virales pueden ser detectadas en circulación y se ha establecido que de las PBMC humanas, solo las células B y los monocitos permiten la replicación del virus “in vivo” y en estos últimos se obtienen mayores títulos virales (Theofilopoulos y col., 1976). Sin embargo, “in vitro”, la mayoría de las PBMC, incluidos linfocitos T, pueden ser infectados por el

virus. En estudios previos se comprobó que la mayor replicación viral en las células B infectadas “in vitro” se da entre las 48 y 96 horas post-infección (Fonseca-Coronado, 2005). La importancia de que las células B sean capaces de ser infectadas por DENV radica en que tanto las células B como los monocitos tienen receptores Fc (Ravetch y col., 2001) y por lo tanto son blancos potenciales para la infección facilitada por anticuerpos, además, las células B secretan citocinas como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), causantes directos del aumento de la permeabilidad capilar durante el DH, cuyos niveles se han encontrado elevados específicamente en pacientes con DH y con SCD (Hirano, 1994; Tracey, 1994); lo anterior indica una participación importante de estas células en la patogenia del dengue pudiendo ser más eficientes que los monocitos en la expansión del virus en los ganglios linfáticos y la circulación. Además, en pacientes con infección por DENV, el aumento en los niveles de IL-6 ha mostrado correlación con una deficiencia del factor XII de la coagulación y con niveles elevados de anticuerpos contra plaquetas y células endoteliales, así como con componentes fibrinolíticos, como el activador de plasminógeno tisular, (Citarella y col., 1997; Lei y col., 2001).

Apoptosis e infección viral

La apoptosis se define como una forma de muerte celular programada que está codificada genéticamente en todas las células, la cual se activa una vez que han agotado sus ciclos metabólicos funcionales. Las primeras descripciones sobre este fenómeno las realizó Councilman en 1890 (Rathmell y Thompson, 1999). Es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica (Ameisen, 1996).

Las características típicas de una célula apoptótica son la disminución en el tamaño celular debido a la condensación del citoplasma, la fragmentación del núcleo, la condensación de la cromatina y la exposición de fosfatidilserina (FS) en la superficie, normalmente presente en la cara interna de la membrana celular. No hay ruptura de membrana, lo cual previene la liberación de los componentes celulares hacia el

exterior, lo que previene la actividad proinflamatoria. Estos eventos llevan a la generación de cuerpos apoptóticos, que están limitados por una membrana y contienen citoplasma, fragmentos del núcleo y organelos. Los procesos bioquímicos involucrados en la inducción de apoptosis incluyen la activación de endonucleasas, degradación del DNA en fragmentos oligonucleosomales y la activación de la familia de cisteína-proteasas llamadas caspasas que son las encargadas directas de la degradación o la activación de otras proteínas degradantes. La mayoría de los cambios morfológicos se deben a estas caspasas, las cuales han sido divididas en familias de acuerdo a la preferencia del sustrato, al grado de identidad y similitudes estructurales (Jacotot y col., 1999; Hengartner, 2000). En la figura 4 se esquematizan las principales rutas de activación de la apoptosis y las moléculas y organelos involucrados.

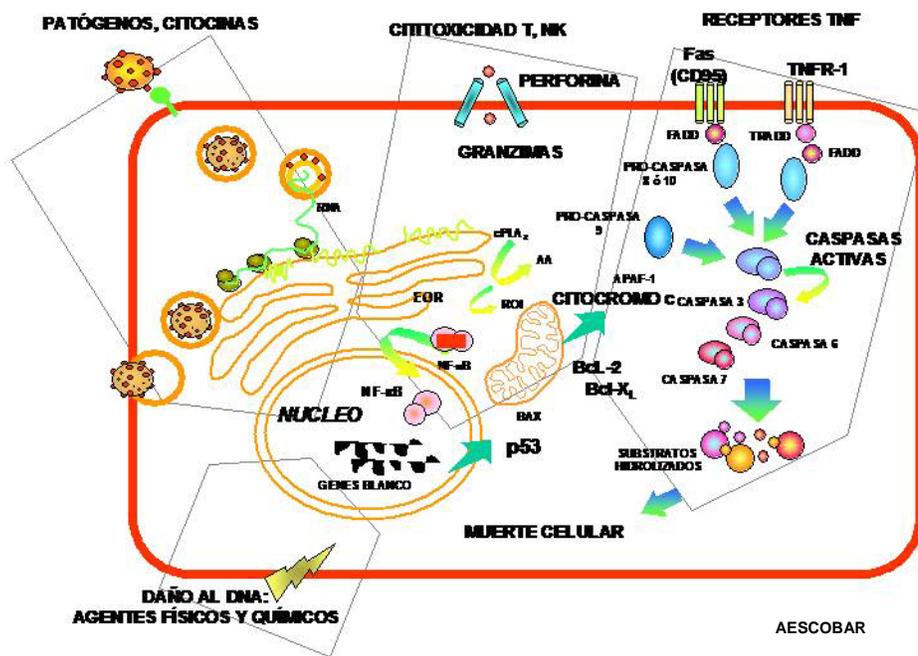


Figura 4. Principales vías de inducción de apoptosis.

El proceso apoptótico puede ser iniciado por agentes extracelulares como hormonas, citocinas, agentes químicos, físicos y microbiológicos, entre ellos los virus. Durante una infección, los virus se replican en presencia de los mecanismos de protección del

hospedero y las perturbaciones celulares causadas pueden activar sistemas de señalización específicos que inician la vía de apoptosis, proporcionando protección al hospedero contra el virus (Mongkolsapaya y col, 2003).

La apoptosis ha sido descrita como un mecanismo por el cual la infección por DENV puede causar muerte celular; se cree que el DENV puede inducir apoptosis para conseguir la diseminación de la progenie viral a células vecinas a través de la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos que la contienen y que son resultantes del proceso de minimización de la respuesta inmune. (Courageot y col., 2003). La inducción de apoptosis por DENV ha sido descrita en células endoteliales tras la producción de IL-8, IL-6 y RANTES (del inglés *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*), (Avirutnan y col., 1998; Huang y col., 2000), además, las células endoteliales después de su interacción con anticuerpos de ratón anti-NS1 entran en apoptosis, en cuya inducción está involucrado el óxido nítrico (Lin y Wang, 2002). Los monocitos son inducidos a apoptosis y simultáneamente producen citocinas proinflamatorias como el TNF- α , lo cual implica un mecanismo en contra de la infección (Espina y col., 2003).

La capacidad proapoptótica intrínseca del virus también ha sido analizada demostrando que la producción intracelular de proteínas virales es esencial para la inducción de apoptosis por el DENV, (Courageot y col., 2003). Se tiene evidencia de que algunas proteínas virales poseen actividades pro-apoptóticas, como es el caso de la proteína viral M que tiene un ectodominio (denominado ApoptoM), en el cual los nueve aminoácidos carboxi-terminales son necesarios y suficientes para inducir la apoptosis ya que su expresión intracelular provoca la ruptura de la mitocondria y la activación de caspasas, principalmente caspasa-3 (Catteau y col., 2003; Navarro-Sánchez y col., 2005). Se ha descrito, además, que la acumulación de la proteína NS3 intracelular resulta en la escisión de moléculas inhibitoras de la apoptosis, lo que lleva a la activación de las vías apoptóticas. (Norazizah y AbuBakar, 2003).

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que se fundamenta en hacer pasar una suspensión de células alineadas una a una frente a un haz de láser focalizado mediante un flujo continuo. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la misma y que son recabados por detectores que convierten dichas señales en señales electrónicas para que sean visualizadas en forma de gráficas en una pantalla, lo que permite la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula mediante fluorocromos acoplados a anticuerpos específicos para dichas moléculas.

Las características celulares que se pueden medir por medio de citometría de flujo son:

- Tamaño: conforme a la dispersión frontal de la luz
- Complejidad: por la dispersión de la luz ortogonal proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula
- Características de expresión molecular de acuerdo a la intensidad de fluorescencia a diferentes longitudes de onda resultantes de la emisión de luz fluorescente a causa de la excitación láser a la que es sometida.

Esta técnica es utilizada en laboratorios clínicos y de investigación por su sencillez y debido a que proporciona resultados rápidos que pueden ser aplicables al diagnóstico. Ha sido usado para el estudio de la interacción virus-célula, para detectar la expresión de proteínas en células infectadas con partículas virales y para la demostración de apoptosis debida a infecciones por virus (Fonseca-Coronado, 2005).

JUSTIFICACIÓN

Los linfocitos B han sido identificados como células blanco de la infección por DENV; hasta ahora, la identificación de replicación viral activa en infecciones “in vitro” se ha realizado por técnicas moleculares o por cuantificación de los viriones obtenidos tras la infección. En este trabajo se planteó identificar la replicación viral activa del virus en PBMC y en linfocitos B purificados a partir de sangre periférica de donadores sanos, así como en una línea celular representativa de linfocitos B, mediante la determinación de la proteína NS1 soluble en los sobrenadantes de cultivo, utilizando el equipo comercial para diagnóstico de la infección en suero (Platelia Dengue NS1 AG, Bio rad, Marnes-la-Coquette, Francia).

Por otro lado, la capacidad de inducción de apoptosis del DENV en linfocitos B no ha sido descrita por lo que, simultáneamente, se evaluó la capacidad de inducción de apoptosis en las células mencionadas, mediante la detección de caspasa-3 activa y de translocación de fosfatidilserina.

HIPÓTESIS

El virus del dengue es capaz de infectar y replicar en células B humanas provenientes tanto de cultivos primarios como de una línea celular establecida, lo que desencadena el fenómeno apoptótico como respuesta a dicha infección, fenómeno que en las primeras etapas de la infección por el virus se ve interrumpido, lo cual se determina mediante diferentes metodologías.

OBJETIVOS

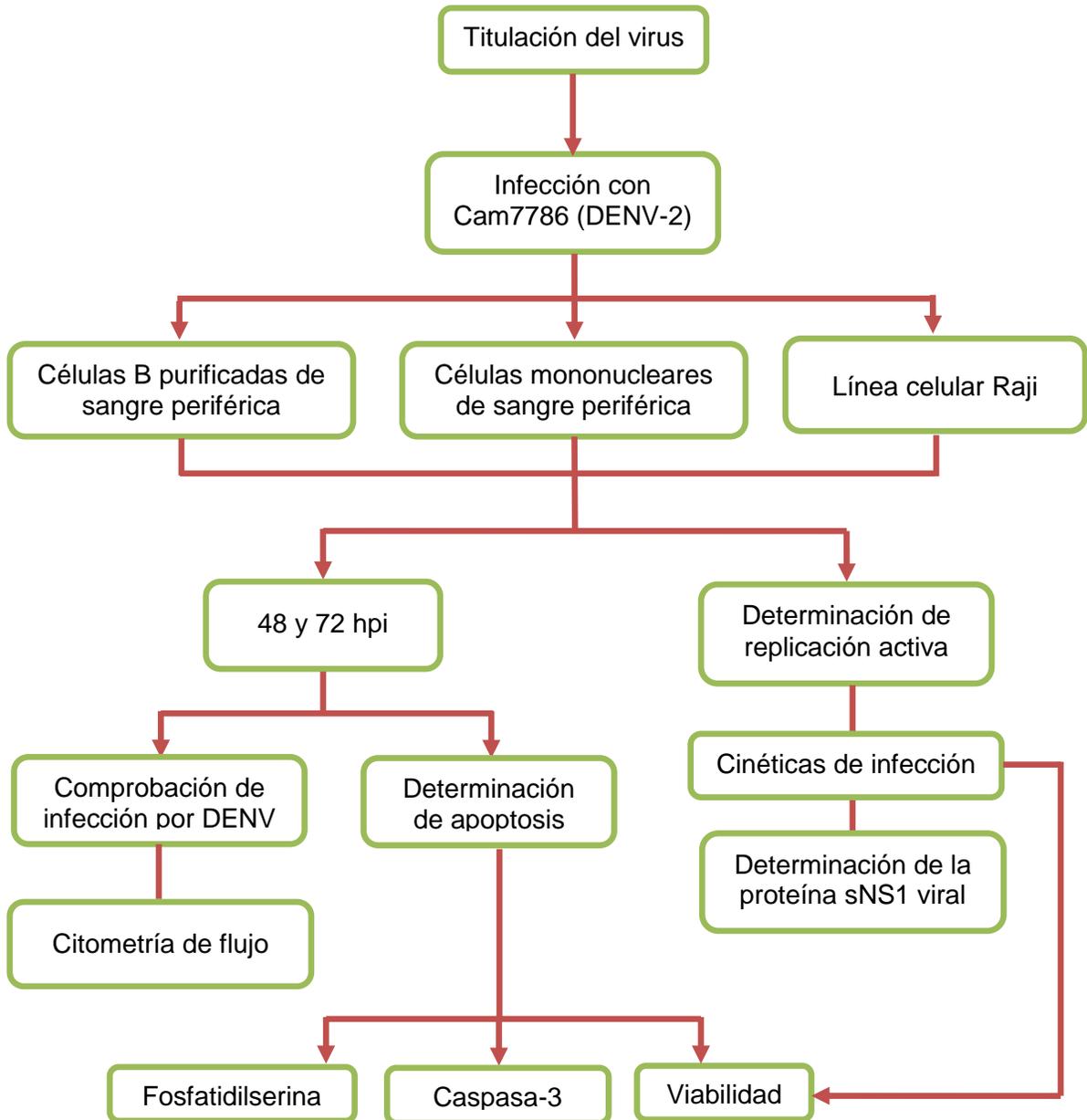
Objetivo General

Identificar la replicación viral activa mediante identificación de NS1 soluble y determinar inducción de apoptosis en linfocitos B (línea celular Raji y cultivos primarios de sangre periférica) infectados con una cepa prototipo mexicana del virus del dengue serotipo 2.

Objetivos Específicos

1. Obtener un abasto viral cuantificado de la cepa mexicana prototipo Cam7786 (DENV-2) y establecer las condiciones óptimas de infección de PBMC y linfocitos B humanos (línea celular Raji y cultivos primarios) con esta cepa.
2. Purificar linfocitos B a partir de PBMC mediante selección negativa con perlas magnéticas.
3. Demostrar la replicación viral activa mediante la detección de la proteína sNS1 viral por ELISA en el sobrenadante de cultivos celulares infectados con DENV-2 Cam7786.
4. Determinar si la cepa mexicana prototipo Cam7786 (DENV-2) es capaz de inducir apoptosis en cultivos celulares de linfocitos B mediante la detección de caspasa-3 activa y de fosfatidilserina por citometría de flujo.

PLAN DE TRABAJO



MATERIALES Y MÉTODOS

Virus

Se utilizó la cepa Cam7786 (DENV-2), aislada y caracterizada en el InDRE de un caso positivo de dengue clásico; la secuencia del virus utilizado se encuentra incluida en el GeneBank con el número de acceso AY603661 y pertenece al genotipo denominado del Sureste de Asia asociado a una mayor incidencia de DH.

El virus se propagó en cultivos de células C6/36 con medio MEM (Minimum Essential Medium) al 2% de suero fetal bovino (SFB) (mantenimiento) e incubadas a 28°C hasta alcanzar el efecto citopático (ECP), posteriormente el sobrenadante del cultivo se cosechó y congeló a -70°C hasta su utilización.

Titulación del virus por el método de formación de placas líticas en células BHK-21

Se prepararon series de diluciones del virus (10^{-1} – 10^{-6}) con solución balanceada de sales de Hanks al 0.5% SFB (HyClone®, Thermo Scientific, Boston, MA, EUA) y se inocularon 50 μ L de cada dilución viral sobre una monocapa confluyente de células BHK-21 (que fueron cultivadas en medio MEM al 10% de SFB a 37°C) en placas de 24 pozos (Evergreen, Los Angeles, CA, EUA); las células se incubaron 2 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, después se añadieron 0.5 mL del medio semisólido Overlay (MEM 2x –SFB al 10% - Carboximetilcelulosa al 3%) y se incubaron 5 días bajo las mismas condiciones. Al término del tiempo de incubación, el medio se decantó y la placa se lavó con agua corriente. Para la visualización y conteo de placas líticas, las células se tiñeron con el colorante naftol azul-negro.

Se contaron las placas líticas en cada dilución y aquella en la que se encontraron entre 10 y 100 placas se tomó para hacer el cálculo de UFP (Unidades Formadoras de Placa) con la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/mL} = \text{No. de placas contadas} \times \text{dilución utilizada} \times \text{volumen}$$

Línea celular Raji

Esta línea celular fue establecida por R.J.V. Pulvertaft en 1963, a partir de un linfoma de Burkitt, el cual es un tipo de linfoma de las células B. En África, éste linfoma aparece con frecuencia en niños como una masa alrededor de un hueso facial y está asociado invariablemente con el virus de Epstein-Barr en las células del linfoma. También hay una alteración del cromosoma número 8, y se piensa que tanto la alteración del cromosoma como la infección viral juegan un papel causal en la aparición del linfoma de Burkitt. Fuera de África ecuatorial, el linfoma de Burkitt es mucho menos frecuente. Esta enfermedad aparece normalmente como masas tumorales abdominales de células de linfoma, y no se asocia uniformemente con el virus de Epstein-Barr. Puede ocurrir en personas de mayor edad y puede afectar la médula, la sangre, el SNC y otros órganos (The leukemia & lymphoma society).

Para el mantenimiento de la línea celular Raji se utilizó medio RPMI-1640 suplementado con 2% de SFB y para crecimiento al 10%, en ambos casos con 2 mM de L-glutamina, 1.5 g/L bicarbonato de sodio, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio antibiótico (mezcla penicilina/estreptomicina 50-100 U/mL) al 1%, antimicótico (anfotericina B) al 1%, tilosina al 0.1% y se incubaron a una temperatura de 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

Purificación de PBMC de sangre periférica

La obtención de PBMC se realizó a partir de paquetes de sangre periférica de sujetos sanos (de 500 mL), donados por el banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS y por medio de un gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA), para lo cual primero se realizó la toma de muestra de sangre completa la cual posteriormente se diluyó a razón de 1:1 con medio RPMI 1640 al 10% de SFB y se distribuyó en tubos cónicos de 15 mL que contenían 3 mL de Ficoll cada uno, teniendo cuidado de no mezclar las dos fases. Los tubos se centrifugaron a 400 xg por 30 min y después con ayuda de una pipeta Pasteur se retiró el anillo perteneciente a las PBMC (en el tubo se forman varias capas, de abajo hacia arriba la primera es la de los eritrocitos, la que sigue es la de ficoll, la siguiente es el anillo de PBMC y por último el plasma), la fase de PBMC se

depositó en otro tubo con medio RPMI 10% al SFB y se centrifugó a 250 xg por 10 min, al término de la centrifugación se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio RPMI al 10% SFB y nuevamente se centrifugaron; el sobrenadante se volvió a retirar y las células se resuspendieron en medio RPMI al 10% SFB para poder ser contadas y así establecer los cultivos celulares pertinentes.

Purificación de linfocitos B por perlas paramagnéticas

Para la purificación de linfocitos B humanos también se partió de paquetes de sangre periférica de sujetos sanos (de 500 mL), donados por el banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. A partir del concentrado leucocitario, se obtuvieron células mononucleares por dilución con medio de cultivo RPMI-1640 1:1 y se separaron por gradiente de densidad con Ficoll, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 20 mL de solución amortiguadora (PBS 1x pH 7.2, 0.5% albúmina bovina sérica (BSA), 2 Mm EDTA); la suspensión celular se filtró a través de una membrana de nylon de 30 μ m y se contaron las células, ajustando con la solución amortiguadora a 10^7 células totales/40 μ L. Para el marcaje se utilizó el equipo comercial *B cell Isolation II* (Miltenyi Biotec, Auburn CA, EUA); se adicionaron 10 μ L de la mezcla biotina-anticuerpo/ 10^7 células, se incubó por 10 minutos a 2-8°C, se adicionaron 30 μ L de amortiguador/ 10^7 células y después 20 μ L de las microesferas anti-biotina/ 10^7 células que se incubaron 15 minutos a 2-8°C. Las células se lavaron con 2 mL de amortiguador/ 10^7 células y se ajustaron a 10^8 células/500 μ L con la misma solución. La suspensión celular se hizo pasar por una columna magnética LD (Miltenyi Biotec, Auburn CA, EUA) lavándola 3 veces con amortiguador y se recolectaron las células B en un tubo estéril. La suspensión celular final se resuspendió en medio RPMI-1640 10% SFB y se realizó un ensayo de pureza utilizando el anticuerpo anti-CD19 por citometría de flujo (CF) en un citómetro FACSsort (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA); las células restantes se distribuyeron en placas de 24 pozos a razón de 1×10^6 células/pozo.

Infección celular

A la suspensión celular correspondiente se le adicionó el virus a una MOI (*Multiplicity of infection*) de 1:1 y se incubó durante 90 min a 37°C y atmósfera al 5% de CO₂, posteriormente las células se lavaron dos veces con medio base y se resuspendieron en medio de crecimiento para ser cultivadas en placas de 24 pozos (Corning, NY, EUA) a razón de 1x10⁶ células/mL de medio RPMI/pozo. A las 0, 24, 48, 72 y 96 horas post-infección (hpi), se cosecharon sobrenadante y células para realizar los ensayos de replicación viral activa, de inducción de apoptosis y a las 48hpi para comprobación de la infección.

Multiplicidad de infección (MOI)

Se define como la cantidad de virus inoculado por célula del cultivo celular y en este trabajo se tituló el virus para conocer la cantidad que se inoculó del mismo y lograr que coincidiera con el número de células que se colocaron en los sistemas a infectar a la MOI deseada (1, que se entiende como una partícula de virus por cada célula).

Comprobación de la infección por citometría de flujo

Las células infectadas se lavaron con PBS, se agregaron 300 µL de solución permeabilizadora Cytifix/Cytoperm™ (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, EUA) y se incubaron durante 20 minutos en hielo, después se lavaron con 500 µL de solución de lavado Perm/Wash™ (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, EUA). Se agregaron 3 µL del anticuerpo anti-E de DENV-2 (clona 3H7, ATCC) y se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente, después las células se lavaron con 500 µL de Perm/Wash™ y se agregaron 20 µL del anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a Ficoeritrina (PE) a una dilución 1:100 (Chemicon International, Temecula, CA, EUA), se incubó por 25 min a temperatura ambiente y en oscuridad; al término de éste tiempo las células se lavaron con 500 µL de Perm/Wash™ y por último se resuspendieron en 350 µL de la misma solución para su análisis en el citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Como control se utilizaron células sin tinción y células teñidas únicamente con el segundo anticuerpo.

Determinación de sNS1 por ELISA

Para la determinación de la proteína viral NS1 en el sobrenadante de los cultivos celulares, se utilizó el equipo comercial Platelia Dengue NS1 AG (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) y el procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante: las placas de 96 pozos vienen sensibilizadas con anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-NS1, en cada pozo se colocaron 50 μ L de solución diluyente (PBS-Tween 20- SFB), 50 μ L de los sobrenadantes de cultivo o controles y 100 μ L del conjugado diluido 1:50 (AcMo anti-NS1-peroxidasa), la placa se incubó durante 90min a 37°C. Posteriormente se lavó 6 veces con solución de lavado (Tris-NaCl, 1% Tween 20) y se adicionaron 160 μ L de solución de revelado (0.015% de H_2O_2 -4% de dimetilsulfóxido-0.25% de 3, 3',5, 5' tetrametilbenzidina), se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y finalmente se adicionaron 100 μ L de solución de paro (H_2SO_4 1N). La placa se leyó 30 min después de haber detenido la reacción en un lector de microplacas Multiskan® Plus (Labsystems, Vantaa, Finlandia) a 450nm y con las densidades ópticas (DO) obtenidas, se calculó el valor umbral (CO) que corresponde al valor medio de las DO de los duplicados del Control Valor Umbral. También se calculó la relación muestra ya que los resultados se expresan en forma de relación con la ayuda de la siguiente fórmula: Relación Muestra = S / CO, donde S es la DO obtenida para cada muestra.

Determinación de viabilidad

Se utilizó el colorante azul de tripán a una dilución 1:10 con las células y se depositaron 10 μ L de ésta dilución en la cámara de Neubauer, en donde se contaron las células vivas (refringentes) y las células muertas (de color azul) presentes en los cuatro cuadrantes de los extremos del hemocitómetro. Se obtuvo el número total de células y partiendo de éstas se obtuvo el porcentaje de células vivas o viables de cada sistema analizado.

Determinación de apoptosis por Caspasa-3 activa

Las células infectadas se colectaron a los tiempos señalados, se lavaron con 1 mL de PBA (PBS pH=7.2, Azida de sodio 0.05%) y se procedió a realizar la tinción para

caspasa-3 activa intracelular con el equipo FITC Active Caspase-3 Apoptosis (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, EUA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se permeabilizaron y fijaron con 500 μ L de Cytofix/Cytoperm™ / 1×10^6 células y se incubaron durante 20 min en hielo, después se lavaron con 500 μ L / 1×10^6 células con Perm/Wash™ y se determinó la cantidad de anticuerpo anti-Caspasa-3 activa requerida para las muestras diluyendo a razón de 1:5 con Perm/Wash™, se agregó a las muestras dejando incubar 30 min a temperatura ambiente protegidas de la luz. Las células se lavaron con Perm/Wash™ y se resuspendieron en 500 μ L del mismo amortiguador para su análisis en el citómetro de flujo FACSsort (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA).

Determinación de apoptosis por Anexina V-FITC

A los tiempos señalados, se colectaron las células, se lavaron con 1 mL de PBA y se utilizó el equipo Annexin V FITC Apoptosis (BioVision, Mountain View, CA, EUA) para detectar FS en superficie. Las células se resuspendieron en 500 μ L de amortiguador de unión y se adicionaron 5 μ L de Anexina V acoplada a FITC, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente protegidas de la luz y se continuó con su análisis por citometría de flujo.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con la prueba t de Student para determinar la significancia con un valor de $p \leq 0.05$ en el programa GraphPad Prism® versión 5.00 (2007).

RESULTADOS

Obtención de abasto viral

Se obtuvo un abasto viral propagando el virus DENV-2 Cam7786 en células C6/36 las cuales mostraron un efecto citopático (ECP) que fue evidente a las 48 horas post-infección al observarse la formación de sincicios (células gigantes y multinucleadas) (figura 5), en ese momento, el sobrenadante fue cosechado y titulado sobre células BHK-21, donde se obtuvo un título viral de 19×10^6 UFP/mL.

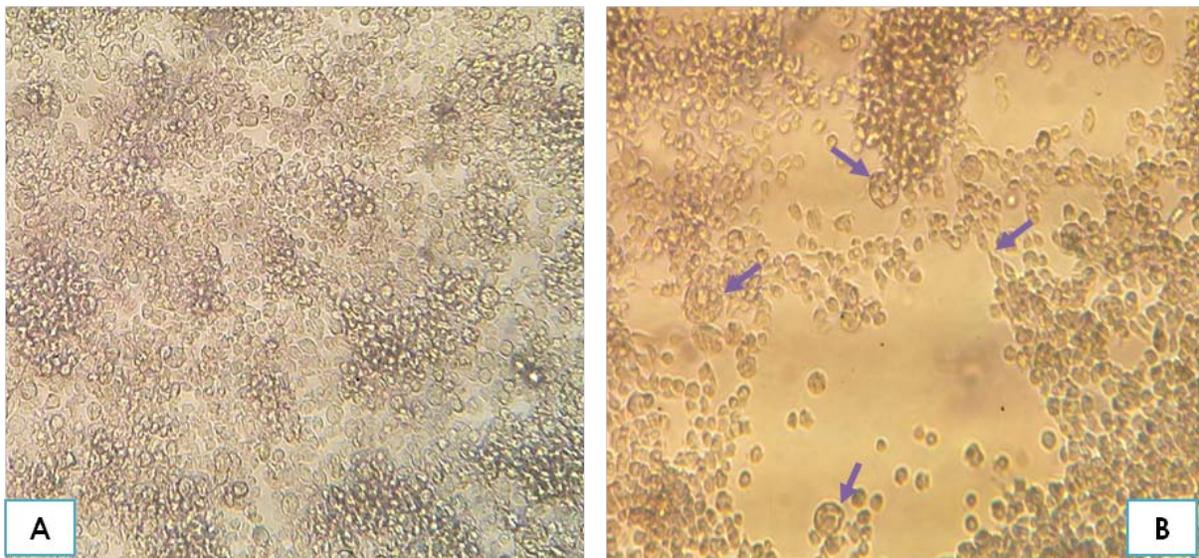


Figura 5. Células C6/36 sin infección (A) e infectadas con DENV-2 Cam7786 (72 hpi) (B). El ECP se indica con flechas.

Purificación de linfocitos B y PBMC

La purificación de linfocitos B de donadores sanos se llevó a cabo mediante selección negativa con perlas paramagnéticas, es decir, por eliminación de células no B. Para asegurar la pureza de las células, se realizó un ensayo de citometría de flujo en el que estas fueron marcadas con anti-CD19 FITC y anti-CD-14 PE y como puede observarse en la figura 6 se obtuvo un porcentaje superior al 95% de células CD19 positivas, CD14 negativas, correspondiente a los linfocitos B. Para la purificación de PBMC se utilizó un gradiente de densidad con Ficoll-hypaque, las células obtenidas se cultivaron en placas de 24 pozos.

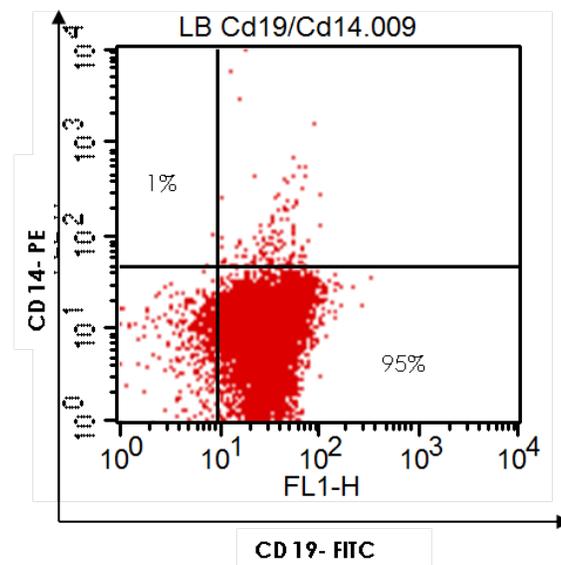


Figura 6. Purificación de linfocitos B de sangre periférica.

Identificación de la infección celular y replicación viral activa del DENV-2

Tanto los cultivos de PBMC como los de linfocitos B y células Raji fueron infectados con DENV-2 Cam7786 a una MOI=1 y a las 48 hpi, se realizó el monitoreo de la infección viral por citometría de flujo. Para ello se empleó un AcMo anti- E de DENV-2 para hacer evidente la expresión intracelular de esta proteína. Se identificó la infección celular por citometría de flujo sólo a este tiempo, debido a que de acuerdo a resultados experimentales, se tiene referencia previa de que por medio de ésta técnica, la infección por el virus del dengue comienza a ser evidente a partir de éste tiempo.

En la figura 7A se muestra un experimento representativo, donde se observa la distribución de las PBMC con respecto a su tamaño y granularidad, a partir de la cual se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos para determinar la eficiencia de la infección en esta población celular, a partir de esta gráfico se generó otro donde se encontró un 79.6% de células que expresaron la proteína E viral a las 48 hpi (figura 7B), poniendo en evidencia la efectividad de la infección en PBMC.

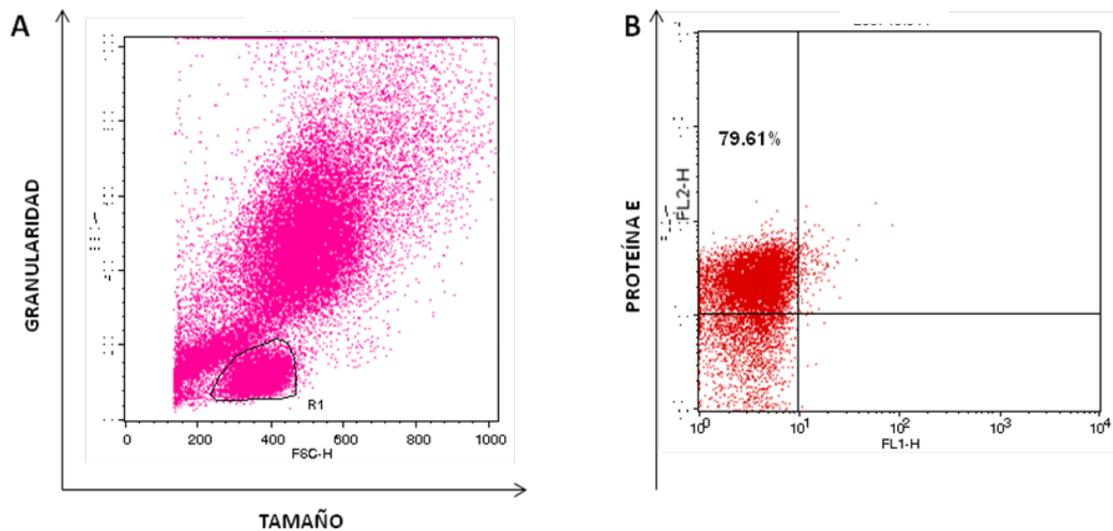


Figura 7. PBMC infectadas con DENV-2. (A) Gráfica de tamaño contra granularidad, se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos. (B) Porcentaje de células en la región de linfocitos que expresan proteína E viral detectada mediante tinción indirecta. La media del porcentaje de los experimentos realizados fue de 65.1, con una $P=0.0001$ respecto a los controles sin infección.

La figura 8 muestra los histogramas representativos de infección de las células Raji, a las 0 y a las 48 hpi, donde se observa un 18.79% de la expresión de la proteína E, poniendo de manifiesto la infección experimental de ésta línea celular con DENV-2 Cam7786.

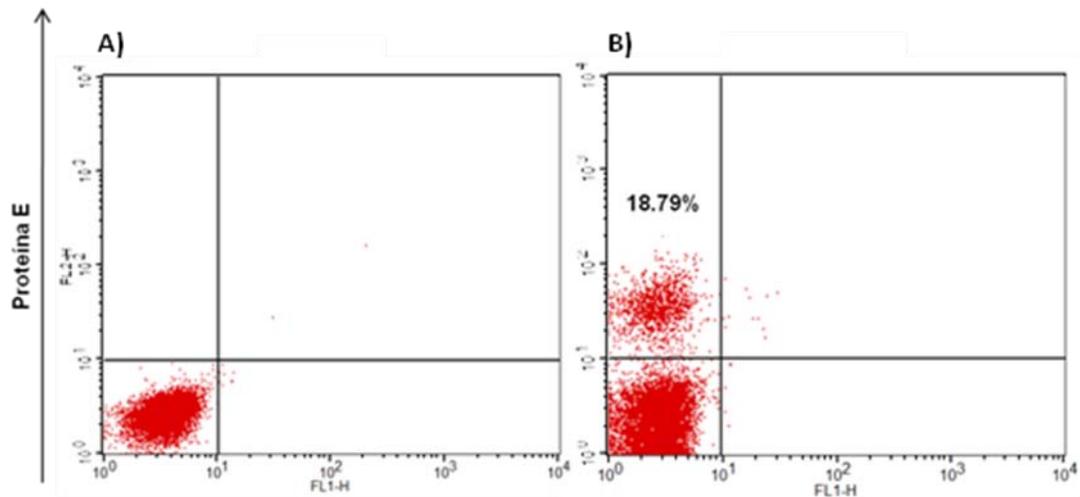
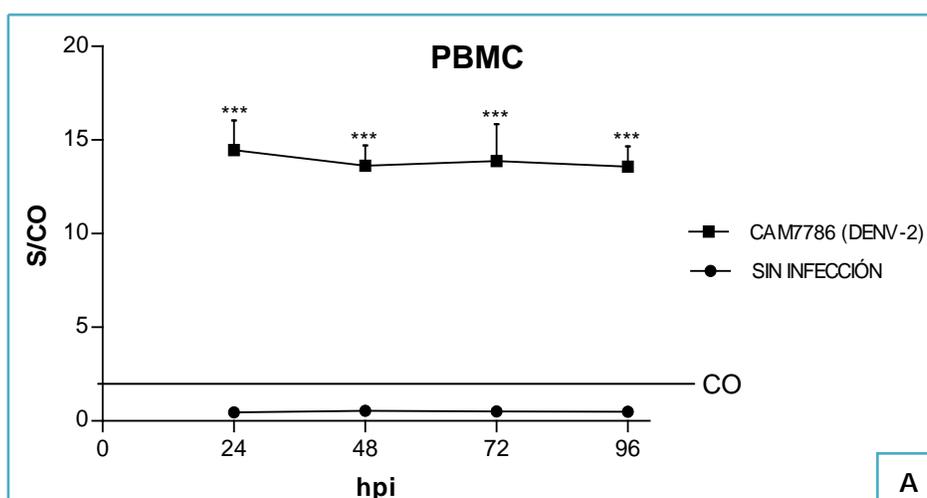


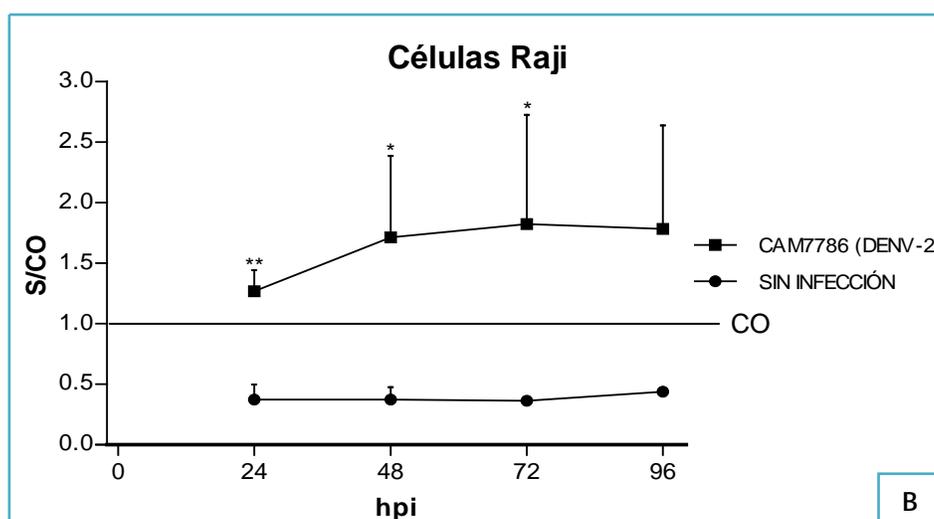
Figura 8. Las células B de la línea celular Raji se infectan con DENV-2 Cam7786. Histogramas representativos de las células Raji infectadas (A) las 0 hpi y (B) a las 48 hpi. La media del porcentaje de los experimentos realizados fue de 16.3, con una $P=0.0002$ respecto a los controles sin infección.

Una vez establecida y comprobada la factibilidad de la infección se decidió buscar otra forma de monitorear la infección de las células aprovechando que la glicoproteína viral NS1 tiene la característica de ser secretada por las células infectadas durante la replicación activa del DENV por lo que se procedió a determinar su presencia en el sobrenadante de los cultivos celulares infectados con el virus mediante el empleo de un equipo de ELISA comercial (Platelia Dengue NS1 AG, Bio rad).

Se realizaron cinéticas de infección a diferentes tiempos para determinar la expresión de la proteína sNS1 en los cultivos celulares. Ésta se determinó tanto en el sobrenadante de cultivos primarios de PBMC y de linfocitos B, como en cultivos de la línea celular Raji. En la figura 9 se muestra el patrón de secreción de proteína sNS1 con base en la relación S/CO obtenida del ELISA a diferentes hpi en los tres tipos de cultivo, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre las células infectadas y las que no lo están (control) desde las 24 hpi. El pico máximo de secreción de proteína NS1 se observó a las 24 hpi en las PBMC, a las 48 hpi en linfocitos B y a las 72 hpi en células Raji.



A



B

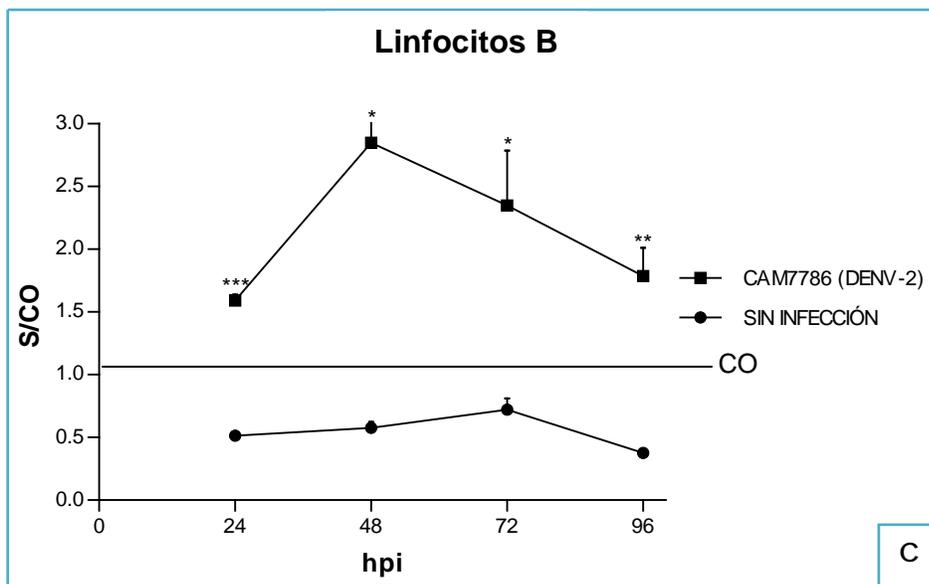


Figura 9. Determinación de sNS1 viral por ELISA en PBMC (A), células Raji (B) y linfocitos B purificados (C) (S/CO= Densidad óptica/valor de corte). (* P=0.0380; **P=0.0033; ***P=0.0001)

Determinación de Viabilidad

Para identificar si el DENV-2 Cam7786 tiene la capacidad de inducir apoptosis en linfocitos B, se utilizó como primer criterio la viabilidad de los cultivos celulares infectados, la cual fue evaluada mediante tinciones con el colorante supravital azul de Tripán y observadas en microscopio óptico mediante cámara de Neubauer, en todos los casos y tiempos de las cinéticas se calculó el porcentaje de células vivas o viables y el porcentaje de células muertas con base en el número total de células contadas.

Para obtener el control positivo de inducción de apoptosis las células fueron mantenidas en medio de cultivo sin ser suplementado con SFB. En la figura 10 se observa que a las 72 hpi las células Raji del control positivo se observan con granulaciones finas en su interior (sugiriendo cuerpos apoptóticos) y otras de color negro, a las 96 hpi se observan éstos cambios más una disminución del tamaño de una gran cantidad de células, así como restos celulares; este fenómeno se observó también con las PBMC y con los linfocitos B.

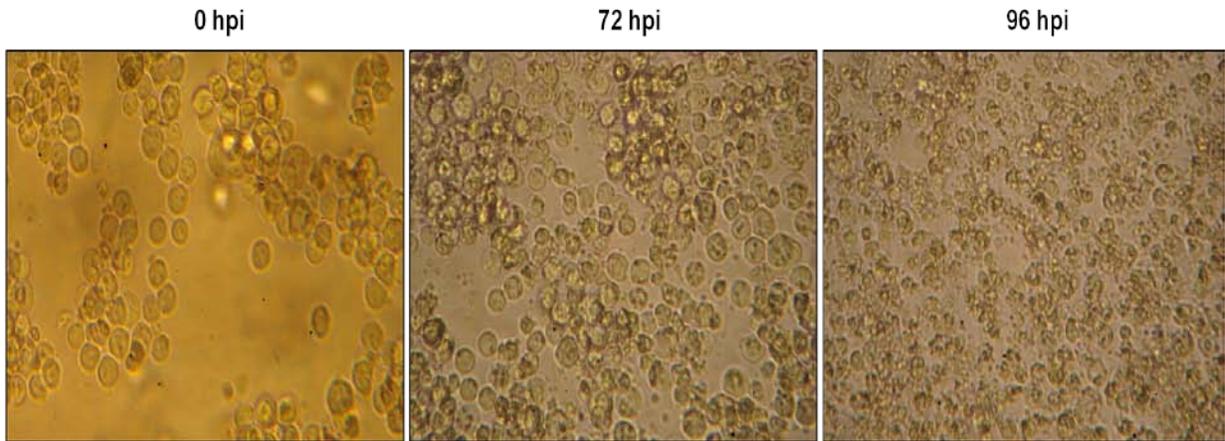


Figura 10. Control positivo de apoptosis (Células Raji) a las 0 (A), 72 (B) y 96 (C) hpi.

En la figura 11 se observa que la viabilidad en general de las células Raji durante los tiempos analizados es elevada (70-80% aproximadamente) tanto en las células sin infección (control negativo a apoptosis), como en las células infectadas con DENV-2 Cam7786. No se observó diferencia significativa entre las células sin infección y las infectadas sino hasta las 96 hpi en donde se observa que la viabilidad en las células infectadas es incluso ligeramente mayor que en las no infectadas lo que sugiere un mecanismo de inhibición de inducción de apoptosis en la células infectadas, en tanto que en las células usadas como control positivo si fue posible observar una diferencia significativa con respecto a las células sin infección e infectadas con DENV-2 Cam7786.

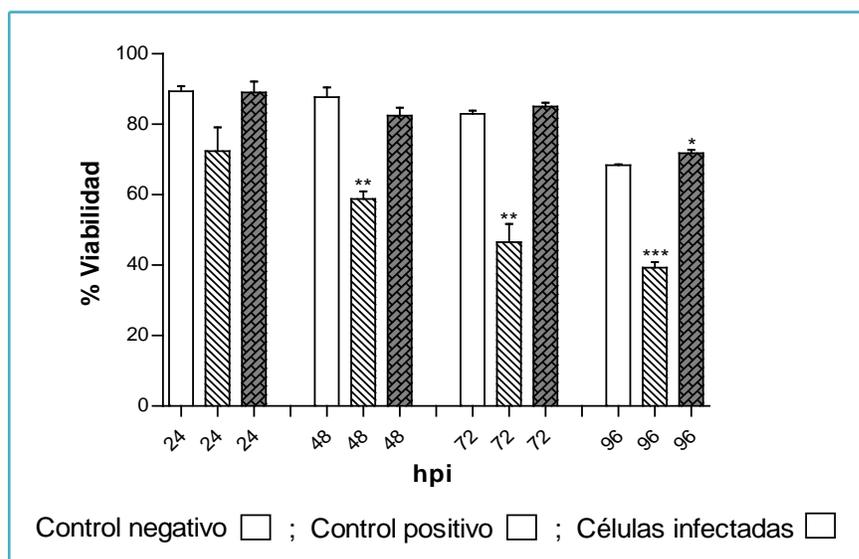


Figura 11. Viabilidad de las células Raji a diferentes hpi. (* P=0.0236; **P=0.0011; ***P<0.0001).

También se determinó la viabilidad de las células B con ayuda del colorante, y se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos (figura 12) donde se puede ver que desde las 24 hpi la viabilidad en todos los sistemas es baja comparada con la de las células Raji, sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las células infectadas y el control negativo excepto a las 24 hpi en donde la viabilidad de las células infectadas es menor, aunque la viabilidad de todos los sistemas va decayendo conforme pasa el tiempo en que estuvieron en cultivo lo que sugiere que el proceso de manipulación durante la purificación tuvo un efecto sobre la viabilidad ya que las células se lastiman durante los procesos de purificación y separación a las que son sometidos.

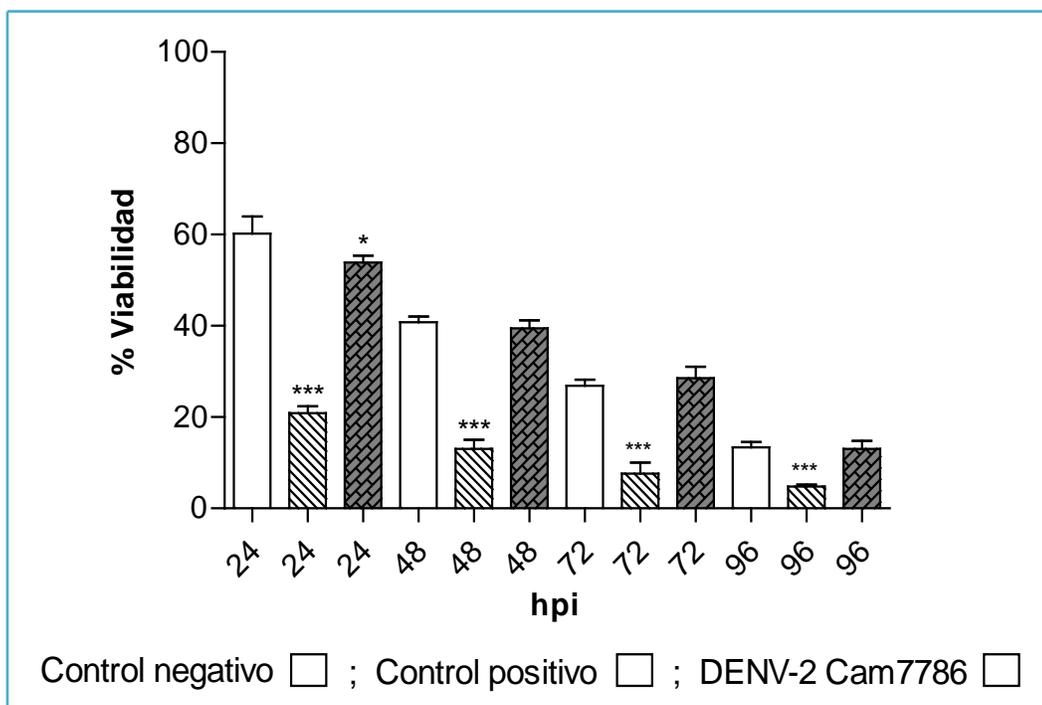


Figura 12. Viabilidad de las células B purificadas, a diferentes hpi. (* P=0.0324; ***P<0.0003).

Análisis citométrico de la morfología de las células infectadas

Las células bajo proceso apoptótico sufren varios cambios que pueden verse reflejados en su tamaño y complejidad al ser analizadas por citometría de flujo; en la figura 13 se muestran gráficas representativas de tamaño contra granularidad celular a las 48 y 72 hpi de células Raji infectadas con DENV-2 Cam7786 donde se hace evidente un desplazamiento de la población inducida a apoptosis hacia a izquierda (control positivo), lo que implica una disminución de tamaño característico de un proceso de muerte celular, mismo que no es evidente ni en las células no infectadas ni en las infectadas con DENV.

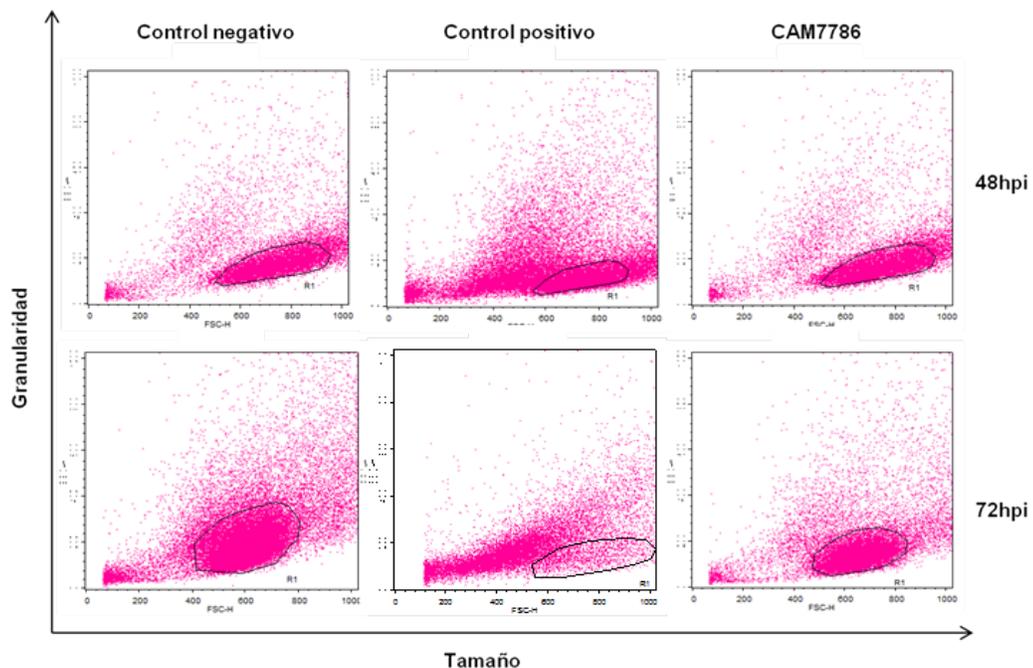


Fig 13. Morfología de células Raji determinada por citometría de flujo

Determinación de Caspasa-3 activa

Para determinar si DENV-2 Cam7786 es capaz de inducir el fenómeno apoptótico, se midió la expresión de Caspasa-3 activa en la línea celular Raji y en linfocitos B mediante una tinción intracelular con AcMo anti-caspasa-3 FITC y su posterior análisis por citometría de flujo.

Una vez que se comprobó que el virus DENV-2 Cam7786 replica activamente en las células B y demostrado que la mayor replicación del DENV en células B ocurre entre las 48 y 72 hpi, se tomaron estos tiempos para determinar la expresión de caspasa-3. En la figura 14 se representan los histogramas de una de las tres cinéticas que se realizaron para la determinación de ésta enzima, teniendo como control negativo células sin infección y como control positivo células sin SFB; se aprecia que la expresión de caspasa-3 en las células infectadas es muy bajo en comparación con el control positivo de apoptosis pero sigue un comportamiento muy parecido al del control negativo.

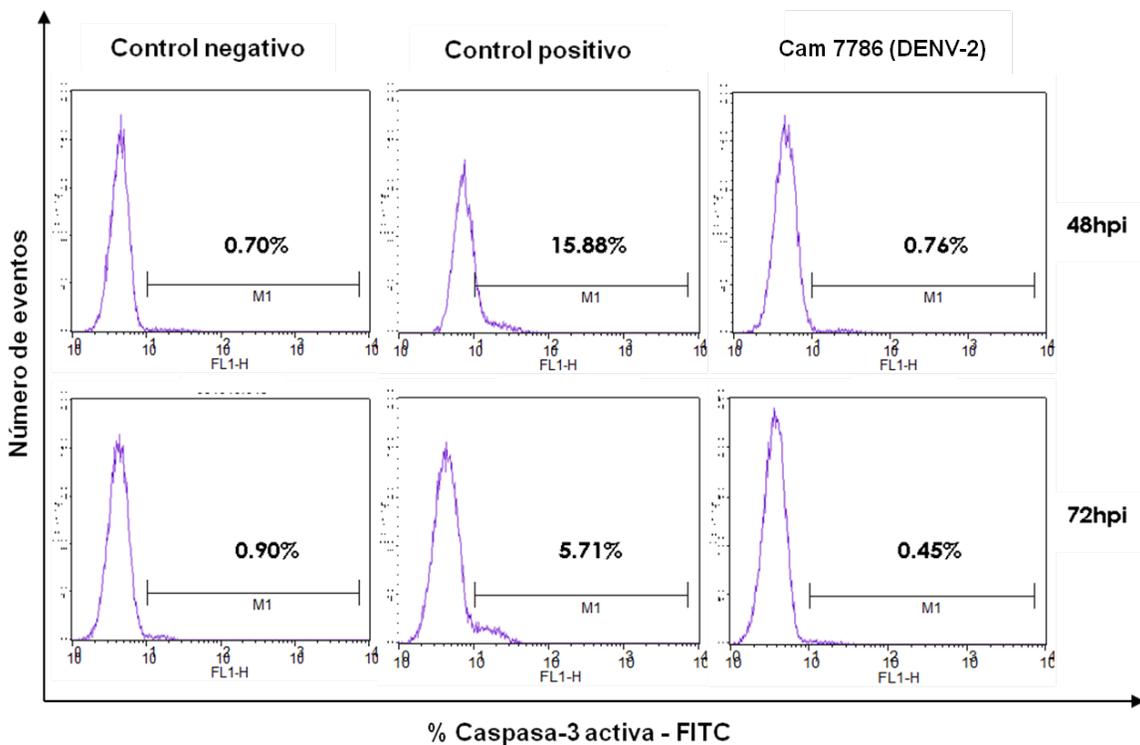


Figura 14. Histogramas representativos de la determinación de Caspasa-3 activa en células Raji a las 48 y 72 hpi.

Con las tres cinéticas se realizó el análisis estadístico de la expresión de caspasa-3 (figura 15) donde se puede apreciar que a los tiempos en que se da la mayor replicación viral, la expresión de caspasa-3 es limitada tanto en el control negativo como en las células infectadas, pero en el control positivo si existe una diferencia significativa en la expresión de caspasa-3 en comparación con los otros dos sistemas. Estos resultados concuerdan con lo observado en la determinación de viabilidad celular empleando las mismas condiciones. La disminución en el porcentaje de Caspasa-3 activa a las 72 hpi en el control positivo de apoptosis, se debe a que para las determinaciones por citometría, se tomó la región de las células viables y a este tiempo las células ya se encuentran en su mayoría muertas (fig. 13).

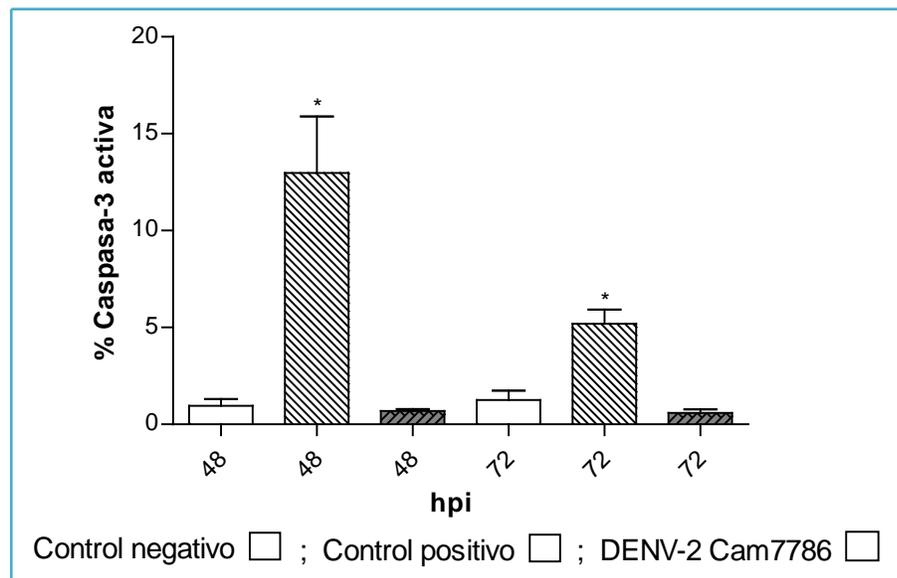


Figura 15. Expresión de Caspasa-3 activa en células Raji. Porcentaje de expresión de Caspasa-3 activa en las células Raji a las 48 y 72 hpi. (* P=0.0285).

Posteriormente, se realizó la determinación de Caspasa-3 activa en las células B purificadas a partir de sangre periférica, en donde se incluyeron los controles positivo y negativo de apoptosis, así como las células infectadas con DENV-2. En la figura 16 se muestran los histogramas representativos de uno de los tres experimentos realizados para esta determinación en los cultivos primarios de células B humanas, en donde se puede observar que la expresión de Caspasa-3 activa en las células sin

infección es baja aún a las 72 hpi y es parecida a la de las células infectadas, también se ve la diferencia en comparación con las células privadas de alimento, en las cuales los niveles de la cisteín-proteasa se incrementan en función del tiempo.

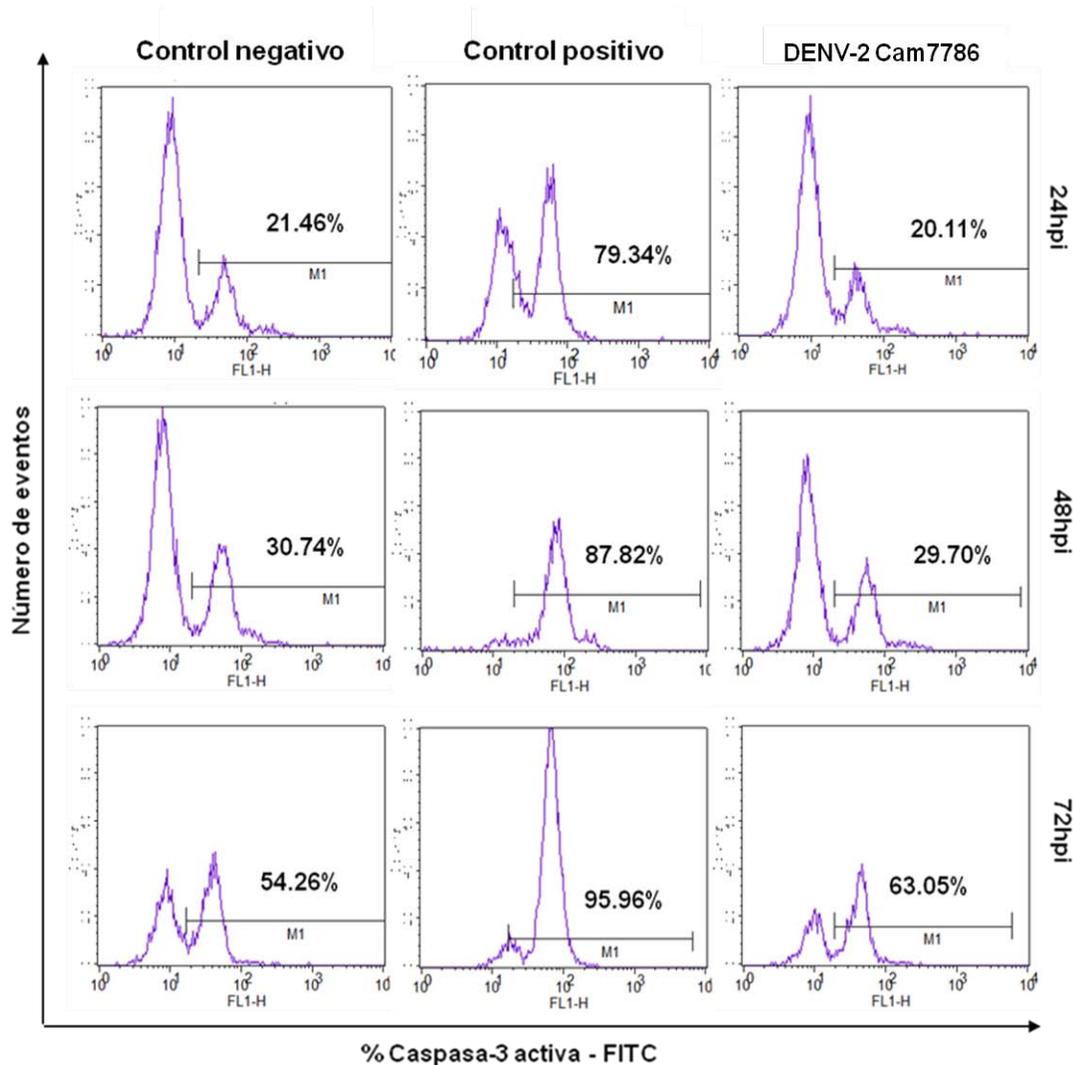


Figura 16. Histogramas representativos de la expresión de Caspasa-3 activa en células B.

Al tener los resultados de los histogramas de todos los experimentos, se realizó el análisis estadístico (figura 17) y de acuerdo a los resultados obtenidos de la expresión de Caspasa-3 en las células B, se puede ver una tendencia muy similar entre las células Raji y los cultivos primarios, aunque la diferencia entre el control negativo y las células infectadas es casi nula, se puede ver cómo aumentan los niveles de Caspasa-

3 al avanzar el tiempo en ambos sistemas. En las células utilizadas como control positivo se ven altos niveles desde las 24 horas y también van aumentando conforme al tiempo transcurrido, éste es el mismo comportamiento seguido por las células Raji.

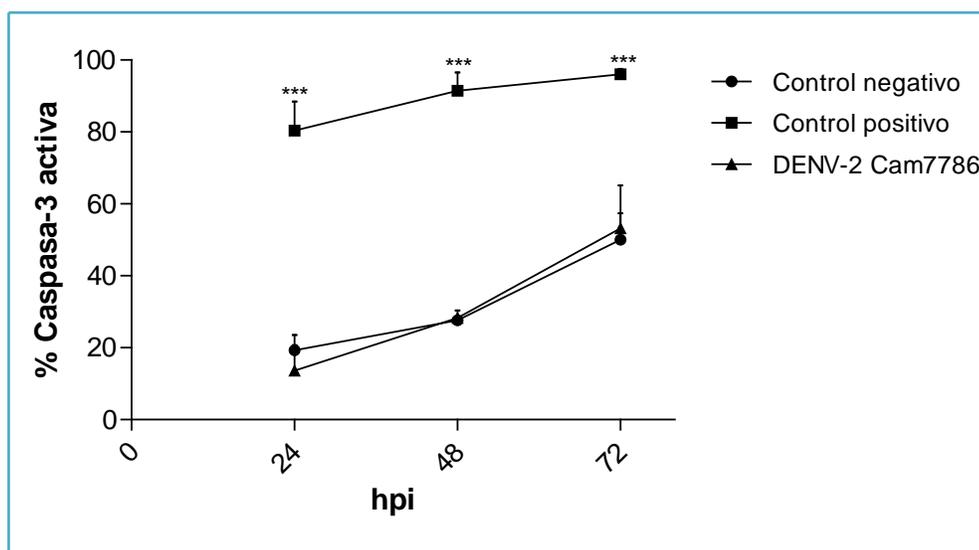


Figura 17. Expresión de caspasa-3 activa en células B purificadas de sangre humana periférica. (***) $P=0.0004$).

Identificación de las fases tempranas de la apoptosis por Anexina V-FITC

Uno de los primeros cambios morfológicos que suceden durante el proceso apoptótico es la translocación de la FS a la capa externa de la membrana celular, la cual se hace evidente mediante tinciones con Anexina V acoplada a un fluorocromo (FITC) para su posterior análisis por citometría de flujo. Se realizaron cinéticas de infección con DENV-2 Cam7786 de células B purificadas por perlas paramagnéticas y a los diferentes tiempos post-infección se realizó el ensayo de Anexina V. Como control negativo se utilizaron células sin infección y como control positivo células que se mantuvieron en medio RPMI-1640 al 0% de SFB.

En la figura 18 se observan los histogramas de uno de los tres experimentos realizados para la determinación de FS por medio de Anexina V en donde se puede observar que desde las 24 hpi los niveles de FS en el control positivo ya son altos y van aumentando de acuerdo al tiempo, no siendo así con el control negativo y las células infectadas, en donde al principio de la cinética se ven porcentajes más bajos pero que igual que en el control positivo, van aumentando conforme aumenta el tiempo. Es necesario destacar que, nuevamente, estos dos sistemas muestran porcentajes similares de ésta molécula, y el mismo comportamiento observado en la expresión de caspasa-3 activa.

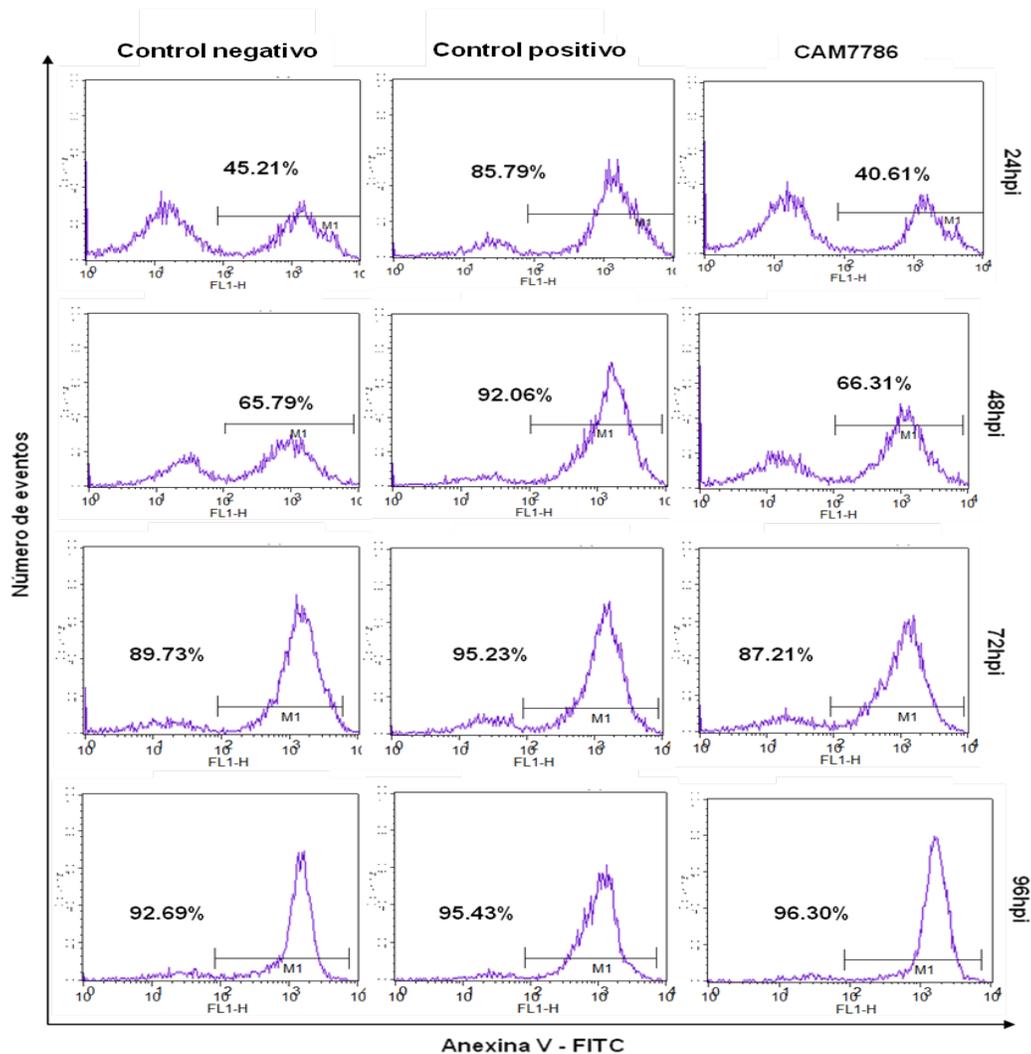


Figura 18. Histogramas representativos de 3 experimentos para la determinación de fosfatidilserina en células Raji a las 48 y 72 hpi.

En la figura 19 se ven los gráficos con el análisis estadístico que se realizó para los tres experimentos realizados, el porcentaje de Anexina V y por lo tanto de FS en las células infectadas es relativamente alto a las 24 hpi aunque menor que el del control positivo, lo que puede ser debido a que este un fenómeno observado en las etapas iniciales de la apoptosis; también se observa que las células infectadas se comportan igual que el control negativo, pero en todos los sistemas se nota una tendencia a aumentar los niveles de FS conforme aumenta el tiempo, siendo las 96 hpi el momento en donde se ven los porcentajes más altos, lo que significa que a este tiempo la mayoría de las células ya perdieron la simetría de la membrana. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la viabilidad de estas células (figura 12).

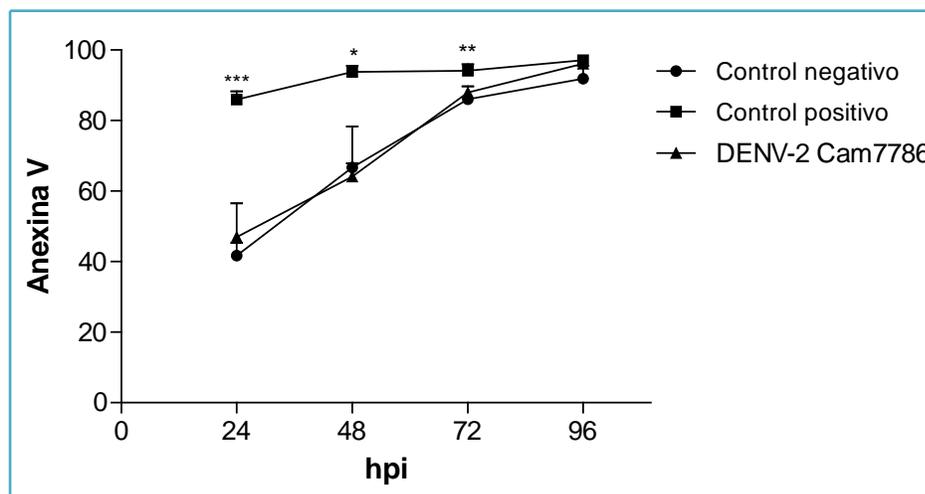


Fig. 19. Histogramas representativos de 3 experimentos para la determinación de fosfatidilserina en células Raji a las 24, 48, 72 y 96 hpi. (* P=0.0160; **P=0.0075; ***P<0.0001).

DISCUSIÓN

En este trabajo se consiguió infectar células B provenientes de una línea celular establecida (Raji) y de cultivos primarios (purificados de sangre periférica humana) con DENV-2 cepa Cam7786, pudiendo comprobar su replicación activa en las células infectadas mediante la determinación por ELISA de la proteína sNS1 viral en donde la máxima secreción de la proteína NS1 y por tanto la mayor tasa de replicación se da en las células B entre las 48 y 72 hpi. Así mismo se pudo determinar que durante los primeros tres días post-infección, la inducción de apoptosis de la línea celular Raji y de los linfocitos B humanos mediada por el DENV-2 es muy baja como se demostró por la determinación de caspasa-3, la translocación de fosfatidilserina y la viabilidad celular.

Los linfocitos B tienen un papel importante dentro de la patogenia del dengue no solo como células blanco de la infección sino como responsables de la producción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes específicos pero también de anticuerpos sub-neutralizantes implicados en el fenómeno de infección facilitada así como de anticuerpos contra antígenos con alta homología con las plaquetas y células endoteliales, particularmente en los pacientes con DH y SCD, en los que pueden inducir ineficiencia de los procesos de coagulación y desordenes en la producción de citocinas que dan lugar a los cuadros clínicos graves de la enfermedad. (Citarella y col., 1997; Lei y col., 2001).

En la circulación sanguínea, el número de células B y de monocitos, así como su capacidad para permitir la amplificación de la replicación del DENV es similar. Debido a que los linfocitos B circulan entre el tejido linfático y la sangre, y los monocitos circulan desde la médula ósea hasta tejidos periféricos (King y col., 1999), se sugiere que los linfocitos B infectados pueden ser más eficientes que los monocitos al propagar el virus entre los linfonódulos y la circulación, que son dos de los lugares más comunes de recuperación del virus en pacientes infectados jugando un papel importante en la amplificación del virus y su diseminación durante la infección. (Lin y

Wang, 2002).

Debido a que hay pocos reportes en la literatura en los que se ha documentado la replicación del DENV en células B, en este proyecto se planteó la necesidad de establecer si esta infección es factible de realizar con un aislado de origen mexicano que actualmente es utilizado en varios estudios realizados a nivel nacional; aunado a esto, se planteó la posibilidad de evaluar si el equipo comercial más ampliamente utilizado para el diagnóstico de la infección por DENV, puede ser utilizado con fines de investigación al permitir identificar la replicación viral activa mediante la detección de la proteína sNS1 por ELISA, lo que representa una notable simplificación con respecto a los métodos tradicionales de identificación de la progenie viral por RT-PCR en tiempo real o por titulación por formación de placas líticas en cultivos celulares. Finalmente, se buscó describir si esta cepa de virus dengue 2 es capaz de inducir apoptosis en los linfocitos B analizados.

El primer paso de este proyecto fue la selección de un modelo de linfocitos B, para lo cual se optó por la línea celular Raji que fue establecida a partir de un caso de linfoma de Burkitt y ha servido como modelo experimental de referencia en varios trabajos experimentales (Lin y Wang, 2002; Boonpucknavig y col., 1976, Sung y col., 2003). Junto con las células Raji, se trabajó con PBMC y con linfocitos B purificados a partir de sangre de donadores sanos sin antecedentes de infección por virus del dengue. Estas células se infectaron con DENV-2 Cam7786 a una MOI de 1 debido a que en un estudio anterior, se estableció que era altamente eficiente para lograr una infección productiva (Fonseca-Coronado, 2005).

Existen diferentes maneras de identificar la replicación productiva del DENV, entre ellas están la identificación del intermediario de replicación, la cuantificación de partículas virales y la detección de la expresión de proteínas no estructurales en células infectadas (Fonseca-Coronado, 2005; Domínguez-Martínez, 2007), en éste trabajo se empleó como marcador de infección a la proteína sNS1 viral en sobrenadantes de cultivos celulares mediante su detección por ELISA. El equipo

utilizado (Platelia Dengue NS1 AG) es el que se emplea para el diagnóstico temprano de la enfermedad (Bessoff y col., 2008) y existe solo un reporte previo de su utilización en el monitoreo de cultivos celulares infectados (Ludert y col., 2008).

Los resultados de sNS1 en las cinéticas de infección de los tres tipos de células mostraron que el aislado mexicano Cam7786 (DENV-2) replica activamente en los linfocitos B, ya que las células secretan la proteína NS1, por lo tanto, se comprobó que mediante esta metodología es posible identificar la replicación viral activa del dengue en cultivo celular. Aunque la función exacta de la proteína NS1 todavía es desconocida. Se ha descrito que la cantidad de sNS1 en el suero de individuos infectados con el virus del dengue 2 de fase aguda tiene una relación directa con la viremia; además, se ha visto que existen niveles más altos de sNS1 en pacientes con DH, haciendo que el diagnóstico a través de la proteína NS1 sea una herramienta importante de pronóstico para la forma severa de la enfermedad (Besoff y col., 2008).

En los sobrenadantes de las células Raji se pudo determinar la presencia de sNS1, con un pico de secreción máxima a las 72 hpi, a diferencia de los linfocitos B que fue a las 48 hpi en tanto que en los sobrenadantes de PBMC los niveles máximos de sNS1 se detectaron a las 24 hpi; la capacidad de detección temprana de sNS1 en los PBMC sugiere que además de los linfocitos B, otras estirpes celulares fueron infectadas. Lo anterior se sustenta porque se sabe que “in vitro”, los monocitos y los linfocitos T son células blanco del DENV y por tanto también secretan a la proteína NS1 (Theofilopoulos y col., 1976). En el caso de las células Raji, aunque son un modelo de células B, los niveles de sNS1 detectados fueron menores en comparación a los de los cultivos primarios de linfocitos B, lo cual puede explicarse debido al número de pases celulares que sufre esta línea celular, lo que pudiera modificar algunas de sus características funcionales, incluidos los receptores de superficie para el DENV. Con respecto a los linfocitos B purificados, hasta donde sabemos, este es el primer reporte donde se identifica la replicación viral activa en estas células mediante la identificación de sNS1 y uno de los pocos que confirma la capacidad de replicación viral en células B “in vitro” (Fonseca-Coronado, 2005; Lin y Wang, 2002).

Otro punto importante a destacar es que existen reportes previos donde se logra la infección de la línea Raji únicamente después de adaptar una cepa de DENV-2 tras varios pases en la misma línea (Boonpucknavig y col., 1976); en este trabajo el virus utilizado nunca fue crecido o pasado en ningún tipo de línea celular de células B o en algún cultivo primario de células B lo que implica una capacidad intrínseca de replicación en estas células.

El siguiente paso fue investigar si la cepa Cam7786 (DENV-2) es capaz de inducir apoptosis en linfocitos B. La muerte celular programada es un proceso regulatorio esencial en el sistema inmune, durante la respuesta inmune a infecciones virales, la apoptosis puede presentarse como un mecanismo directamente patogénico de escape del virus, permitiendo que los cuerpos apoptóticos que contienen al virus, diseminen la infección a células vecinas. La apoptosis también puede ser utilizada como un mecanismo inmune que produce el efecto contrario, siendo capaz de eliminar a la progenie viral y representando una apropiada respuesta del hospedero para limitar la replicación viral (Torrentes-Carvalho y col., 2009).

A pesar de que ya existen una serie de reportes acerca del virus del dengue en donde se ha propuesto a la apoptosis como un mecanismo citopatológico en respuesta a la infección tanto "in vivo" como "in vitro" en varios tipos de células (Courageot y col., 2003), aún se requiere definir con detalle las vías apoptóticas involucradas, así como determinar si es que existe un beneficio potencial en la evolución de la enfermedad. En el caso de los linfocitos B no existe hasta el momento reporte de inducción de apoptosis por lo que en este trabajo se investigó si el virus puede inducir apoptosis a los tiempos en que se encontró una mayor replicación viral (48 y 72 hpi) tanto en células Raji como en cultivos primarios de células purificadas.

Existe evidencia creciente que muestra que las infecciones por flavivirus activan bioquímicamente distintas vías apoptóticas tanto intracelulares como por receptores; se ha visto que el DENV-2 puede producir apoptosis neuronal mediante la activación de la fosfolipasa A2, generación del anión superóxido, liberación del citocromo c,

activación de NF- κ B; todas estas vías con convergencia en la activación de la caspasa-3 (Jan y col., 2000); por lo que en este trabajo se utilizó la determinación de Caspasa-3 activa para la determinación de la apoptosis. En los resultados de la determinación de caspasa-3 activa se observó que a los tiempos analizados, tanto en las células Raji como en las células B purificadas, el porcentaje de caspasa-3 activa y por tanto de apoptosis en las células infectadas así como en las células no infectadas fue muy bajo, sin embargo, existió una ligera tendencia de disminución en las células infectadas con respecto al control no infectado, lo que sugiere una probable inhibición de la apoptosis.

Un aspecto más que debe ser considerado es la multiplicidad de infección (MOI) utilizada para la infección "in vitro", estudios preliminares han demostrado que las células B pueden permanecer viables una semana después de la infección con el virus del dengue a una MOI de 10 (Lin y Wang, 2002). Una perspectiva de este trabajo es ver la activación de apoptosis en función de la MOI utilizada.

Mientras la inducción de la apoptosis en la célula hospedera puede ayudar a la diseminación viral en un estado tardío de la infección, es de vital importancia para los virus inhibir la muerte celular programada en etapas tempranas del ciclo de infección para evitar la muerte prematura de las células y así permitir la replicación. Los virus han desarrollado una batería de homólogos a Bcl-2 por medio de la cual imitan el mayor sistema anti-apoptótico de la célula hospedera. Debido al importante papel que tienen las caspasas controlando el destino de la célula, son reguladas de diferentes formas, lo que convierte a las caspasas en un objetivo de inhibición por los virus, la cual puede llevarse a cabo mediante mecanismos indirectos como la baja expresión del receptor de muerte mediada por virus o la expresión de homólogos al receptor de TNF secretados por los virus, en ambos casos se previene la señalización de la superficie celular. Un importante mecanismo que utilizan los virus para deprimir la activación de las caspasas es la inhibición de la permeabilización de la membrana mitocondrial, evitando así la liberación del citocromo C. Los virus también pueden antagonizar directamente las funciones de algunas enzimas, al interactuar con el sitio

activo de las caspasas o actuando como un inhibidor competitivo de las moléculas de señalización requeridas para la activación de las caspasas (Best, 2008).

La interacción virus-célula hospedera es compleja en cuanto a los tipos de señalización que se activan tras esta interacción, en estudios recientes ha cobrado gran importancia la vía de activación celular de la 3-fosfatidil-inositol cinasa (PI3K *phosphatidylinositol 3-Kinase*) ya que se ha demostrado que los virus modulan la vía de señalización PI3K/Akt (Cooray, 2004). Esta vía regula varios procesos celulares, como el metabolismo, crecimiento, proliferación y supervivencia celular (Cantley, 2002, Franke y col., 2003). La consecuencia de la activación de PI3K es la generación de trifosfatofosfatidilinositol-3, 4 y 5 a partir de bifosfatofosfatidilinositol-4 y -5 en la membrana, que funciona como un segundo mensajero para reclutar al dominio homólogo a pleckstrina que contienen las proteínas, como lo son Akt y la cinasa-1 dependiente de fosfoinosítido. Akt es entonces activada por fosforilación de la cinasa-1 dependiente de fosfoinosítido (Brazil y col., 2004). Después de ser activada, Akt puede fosforilar varios sustratos, incluyendo proteínas asociadas con la muerte celular, como Bad (Datta, 1997; Del Peso, 1997), NF- κ B (Kane y col., 1999; Romashkova y Makarov, 1999), y caspasa-9 (Cardone y col., 1998). Sin embargo, el mecanismo por el cual Akt inhibe la apoptosis aun no se conoce con exactitud. Algunos de los virus asociados con oncogénesis como el virus del poliovirus, el virus de Epstein-Barr, el virus del papiloma humano, el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C han mostrado estimular la supervivencia celular mediada por PI3K/Akt y por tanto, bloquear la apoptosis de las células infectadas, lo que lleva a la supervivencia viral y a la transformación oncogénica (Chyan y col., 2005).

Además de su papel en la supervivencia a largo plazo, la vía PI3K/Akt también ha sido implicada en la supervivencia celular a corto plazo durante las etapas iniciales de la infección aguda, cuando se lleva a cabo la replicación del virus y la síntesis de proteínas. Esta activación a corto plazo de la señalización de PI3K/Akt prolonga la supervivencia celular en las infecciones con el virus de la encefalomiocarditis, el virus del herpes simple (Prejean, 2001), y el virus sincitial respiratorio (Thomas y col.,

2002). La vía de PI3K/Akt también ha sido involucrada en la replicación viral, ya que la activación de PI3K/Akt también podría crear un ambiente favorable para la replicación del virus y el ensamblaje del virión y parece ser favorable para la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 (Francois y Klotman, 2003) y el virus coxsackie B3 (Esfandiarei y col., 2004). Debido a que el DENV parece inducir la apoptosis en cultivos celulares en una fase avanzada de la infección (como se puede comprobar con éste trabajo ya que los tiempos a los que se analizó la inducción de apoptosis son relativamente tempranos), la posibilidad de que la vía de PI3K/Akt participe en la preservación de la célula hospedera durante la infección viral ha llevado a investigar la interacción entre el virus y ésta vía (Chyan y col., 2005).

En un estudio se mostró que Akt puede ser fosforilado después de la infección con DENV-2 en una forma dependiente de PI3K y de la formación de lípidos. Cuando PI3K fue bloqueado por inhibidores específicos, la infección por DENV-2 condujo a la apoptosis en una fase temprana de la infección, sin embargo estos inhibidores no afectaron la replicación viral. Además, esta apoptosis temprana podría ser superada en gran medida por inhibidores de la pancaspasa y caspasa-9 y parcialmente por la inhibición de la caspasa-6, aunque la activación de la vía PI3K/Akt en las células infectadas con DENV-2 parece ser transitoria (Chyan y col., 2005, Rokudai y col., 2000).

También se ha encontrado que cuando Bcl-2 se sobre-expresa, impide la pérdida de la proteína Akt observada en las células infectadas con DENV-2 y se mantiene un nivel constante de Akt fosforilada, que puede proteger después a las células de la apoptosis incluso cuando PI3K fue bloqueada. Éstos resultados proporcionan evidencia que sugiere que los flavivirus como el DENV-2 no solo inducen la señalización para la apoptosis celular, sino que también activan una señalización de sobrevivencia que involucra a la vía PI3K/Akt (Chyan y col., 2005).

Se ha encontrado que el DENV produce una señalización apoptótica para eliminar a las células infectadas, así como también inicia una señalización de sobrevivencia para mantener a las células en condiciones favorables para lograr una mayor producción

de la progenie viral. Al poco tiempo de que la célula se encuentra con el virus, Akt es fosforilada vía formación de lípidos y activación de PI3K, protegiendo a las células de la muerte por apoptosis mediada por caspasas durante un estado temprano de la infección, por lo que ésta puede ser la razón de que a los tiempos en que se realizaron las determinaciones en éste trabajo (tiempos en los que se da la mayor tasa de replicación), no se observó una expresión de caspasa-3 activa en las células B infectadas con DENV como se esperaba al sufrir un proceso apoptótico, ya que ésta enzima se activa durante la apoptosis celular independientemente de la vía en que se induce el proceso. Sin embargo, la señalización PI3K/Akt, no es esencial para la replicación del virus del dengue, ya que se ha demostrado que al agregar inhibidores de PI3K no se redujo la replicación del RNA viral, la expresión de proteínas virales o la producción de virus infecciosos, por lo que los resultados de las determinaciones de la proteína viral sNS1 no se verían afectados si es que el DENV induce la activación de esta vía para lograr la protección de las células infectadas ante la apoptosis (Chyan y col., 2005).

Por otra parte, la sobreexpresión de Bcl-2 supera a la muerte celular inducida por el virus, incluso cuando PI3K se encuentra bloqueada, indicando que Bcl-2 funciona como un importante mediador de la señalización PI3K/Akt inducido por el DENV (Chyan y col., 2005). Se ha demostrado que Akt inhibe la liberación del citocromo c mitocondrial (Kennedy y col., 1999), sugiriendo que Akt inhibe la apoptosis al mantener la integridad de la mitocondria. Los miembros de la familia de Bcl-2 mantienen o alteran la integridad de la membrana mitocondrial y por tanto, promueven o inhiben la liberación de moléculas pro-apoptóticas en el espacio intermembranal en la mitocondria. En un estudio, se observó que la infección por DENV-2 activa la señalización de PI3K/Akt para proteger la integridad mitocondrial a través de un mecanismo relacionado con Bcl-2, previniendo a las células de morir principalmente por una vía mediada por caspasa-9 durante las primeras etapas de la infección (Chyan y col., 2005), por lo que sería interesante determinar la expresión tanto de Bcl-2 como de caspasa-9 en cultivos celulares infectados con DENV para verificar si este proceso se lleva a cabo o no en las células B.

Por otra parte, uno de los mecanismos de reconocimiento más ampliamente estudiado y que al parecer es una señal que siempre está presente en los linfocitos apoptóticos (Fadok y col., 1992; Martin, 1995), es la pérdida de la asimetría de la membrana celular, la cual tiene como consecuencia la exposición en la capa externa de moléculas de FS, que de manera normal están restringidas a la parte interna, así que en éste trabajo se infectaron células B de sangre periférica con DENV-2 y se determinó por citometría de flujo Anexina V la cual está acoplada a FITC que se une específicamente a FS, donde nuevamente (al igual que en las determinaciones de caspasa-3 activa) las células infectadas siguen el mismo comportamiento que las células sin infección, al principio existe un menor porcentaje de FS en comparación con el control positivo de apoptosis, pero en este caso se puede ver como aumenta la expresión de FS en la superficie de las células gradualmente con el tiempo en todos los sistemas hasta llegar a porcentajes muy altos (96 hpi).

La translocación de la FS hacia la capa externa de la membrana plasmática sirve como una señal de reconocimiento para la fagocitosis de las células que están muriendo, siendo este un evento de apoptosis temprana, que ocurre mientras la membrana plasmática permanece intacta (Fadok, 1992). Éste evento ocurre de manera independiente a la expresión de caspasa por lo que no se pueden relacionar los resultados obtenidos en las determinaciones de FS y de caspasa-3 activa en las células B analizadas. La expresión de FS en la superficie celular es un cambio en la membrana que es observado en la apoptosis, aunque no es específico de éste tipo de muerte celular, ya que también se ha observado en células oncóticas y necróticas debido a que sólo muestra que existe un daño en la membrana plasmática (Lecoeur, 2001); por lo que puede ser que las células que presentan ésta alteración en la membrana estén muriendo por otra vía que no es la apoptótica, lo que podría explicar los altos niveles de FS en las células B que no se parecen a los de caspasa-3 activa.

Los resultados aquí obtenidos sirven de fundamento en futuras investigaciones para establecer la interacción virus-linfocitos B en función de tiempo, de la MOI y de los efectos involucrados en cada caso.

CONCLUSIONES

1. La cepa Cam7786 (DENV-2) es capaz de infectar a las células B tanto de cultivos primarios como de la línea celular Raji, así como también de replicar activamente en ellas.
2. El equipo comercial para identificación de sNS1 por ELISA es eficaz en la determinación de la replicación viral activa del virus del dengue serotipo 2 en cultivos celulares de células B.
3. La inducción de apoptosis tanto de la línea celular Raji como de los linfocitos B humanos mediada por el DENV-2 es muy baja en una etapa temprana de la infección.

PERSPECTIVAS

1. Realizar las determinaciones de apoptosis en células B a mayores tiempos post-infección para establecer si el proceso se lleva a cabo en una etapa tardía de la infección.
2. Comprobar si existe una inhibición de la apoptosis en las células B mediante la determinación de moléculas que indiquen la vía que se activa para permitir esta inducción.
3. Determinar las vías de inducción de apoptosis involucradas en la interacción virus-linfocitos B.

REFERENCIAS

- Ameisen J.C. The orogon of programmes cell death. *Science* 1996; 272, 278-1279.
- Avirutnam P., Malasit P., Seliger B., Bhakdi S., Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation and apoptosis. *J Immunol* 1998; 161, 6338-6346.
- Avirutnan P., Punyadee N., Noisakran S., Komoltri C., Thiemmecca S. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* 2006; 193, 1078–1088.
- Bessoff K., Delorey M., Sun W., Hunsperger E. Comparison of Two Commercially Available Dengue Virus (DENV) NS1 Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using a Single Clinical Sample for Diagnosis of Acute DENV Infection. *Clin. Vacc. Immunol.* 2008; 15, 1513-1518.
- Best Sonja M. Viral Subversion of Apoptotic Enzymes: Escape from Death Row. *Annu Rev Microbiol.* 2008; 62, 171–192.
- Boonpucknavig S., Bhamarapravati N., Nimmannitya S., Phalavadhtana A. y Siripont J. Immunofluorescent staining of the surfaces of lymphocytes in suspension from patients with dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Pathol.* 1976; 85, 37–48.
- Brazil D., Yang Z., Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29, 233–242.
- Cantley L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296, 1655–1657.
- Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S. y Reed J. C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282, 1318–1321.
- Catteau A., Kalinina O., Wagner M.C., Deubel V., Courageo M.P., Despre`s P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J. Gen. Virol.* 2003; 84, 2781–2793.
- Chyan L., Ching L., Yi L. Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase

- Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death at the Early Stage of Virus Infection. *J. Virol.* 2005; 79, 8388–8399.
- Citarella F., Felici A., Brouwer M., Wagstaff J., Fantoni A. y Hack. C.E. Interleukin-6 downregulates factor XII production by human hepatoma cell line (HepG2). *Blood* 1997; 90, 1501–1507.
 - Clyde K., Kyle J., Harris E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *J Vir*, 2006; 80, 11418–11431.
 - Cooray S. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *J. Gen. Virol.* 2004; 85, 1065–1076.
 - Courageot M.P., Catteau A., Despres P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. *Adv Virus Res* 2003; 60, 157–186.
 - Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. y Greenberg M. E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery cell 1997; 91, 231–241.
 - Del Ángel RM. Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenicidad viral. *CINVESTAV*. 2006; 38-43.
 - Del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R. y Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; 278, 687–689.
 - Devappa P y Satchidanandam V. Architecture of the Flaviviral Replication Complex. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 27, 24388-24398.
 - Domínguez-Martínez D. Evaluación de un método de citometría de flujo para la simplificación del diagnóstico de laboratorio de Dengue. Tesis de licenciatura, IPN. México, 2007.
 - Esfandiarei M., Luo H., Yanagawa B., Suarez A., Dabiri D., Zhang J. y McManus B. M. Protein kinase B/Akt regulates coxsackievirus B3 replication through a mechanism which is not caspase dependent. *J. Virol.* 2004; 78, 4289–4298.
 - Espina L., Valero J., Hernandez J., Mosquera J. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured

- human monocytes with dengue virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68, 48–53.
- Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148, 2207-2216.
 - Falconar A. y Young P. R. Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus nonstructural glycoprotein NS1. *J. Virol. Methods* 1990; 30, 323–332.
 - Flamand M., Megret F., Mathieu M., Lepault J., Rey F.A. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 1999; 73, 6104–6110.
 - Fonseca-Coronado S. Efectos de la infección por el virus del dengue sobre linfocitos B: Identificación de replicación viral activa, inducción de apoptosis y producción de citocinas. Tesis doctoral. ENCB-IPN. México. 2005.
 - Francois F. y Klotman M. E. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates human immunodeficiency virus type 1 replication following viral entry in primary CD4+ T lymphocytes and macrophages. *J. Virol.* 2003; 77, 2539–2549.
 - Franke T., Hornik C., Segev L., Shostak G., Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 2003; 22, 8983–8998.
 - Gonzalez A., Amador J. J., and Balmaseda A.. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63, 5–11.
 - Guzmán M. G. y Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Inf. Dis.* 2002; 2, 33-42.
 - Halstead, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv. Virus Res.* 2003; 60, 421–467.
 - Harris E., Videa E., Perez L., Sandoval E., Tellez Y., Perez M. L., Cuadra R., Rocha J., Idiaquez W., Alonso R. E., Delgado M. A., Campo L. A., Acevedo F.,
 - Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.
 - Hirano T. (1994). The cytokine handbook: Interleukin-6. A. W. Thomson (ed.), 2nd ed. Academic Press Inc., San Diego, Calif. p. 145–168.

- Huang Y.H., Lei H.Y., Liu H.S., Lin Y.S., Liu C.C., Yeh T.M., Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63, 71-75.
- Jacotot E., Cardona A., Rebouillat D., Terradillos O., Marianneau P., Thoulouze M.I., Lafon M., Deubel V., Edelman L. Combined use of radioimagers and radioactive 3 OH DNA nick end labelling to quantify apoptosis in cell lines and tissue sections: applications to virus- induced apoptosis. *Apoptosis* 1999; 4, 169-178.
- Jan J. T., Chen B. H., Ma S. H., Liu C. I., Tsai H. P., Wu H. C., Jiang S. Y., Yang K. D. y Shaio M. F.. Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF- κ B are sequentially involved. *J. Virol.* 2000; 74, 8680–8691.
- Kane L. P., Shapiro V. S., Stokoe D. y Weiss A. Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.* 1999; 9, 601–604.
- Kennedy S.G., Kandel E.S., Cross T.K. y Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19, 5800–5810.
- King A. D., Nisalak A., Kalayanrooj S., Myint K. S. A., Pattanapanyasat K., Nimmannitya S. y Innis B. L. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1999; 30, 718–728.
- Lecoeur H., Prevost M., Gougeon M. Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. *Cytometry* 2001; 44, 65-72.
- Libraty D., Young P., Pickering D., Endy T., Kalayanarooj S., Green S., Vaughn D., Nisalak A., Ennis F. y Rothman A. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *JID.* 2002; 186:1165–186:1168.
- Lin Y.W. y Wang K.J. Replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virology* 2002; 76, 12242-12249.

- Lin C. F., Lei H. Y., Shiau A. L., Liu C. C., Liu H. S., Yeh T. M., Chen S. H. y Lin Y. S. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J. Med. Virol.* 2003; 69, 82–90.
- Lin C.F., Chiu S.C., Hsiao Y.L., Wan S.W., Lei H.Y. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol* 2005; 174, 395–403.
- Lindenbach B.D. y Rice C.M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 1999; 73, 4611-4621.
- Lindenbach B. D. y Rice C. M. Trans-complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J. Virol.* 1997; 71:9608–9617.
- Lindenbach B.D. y Rice C.M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 2003, 59, 23-61.
- Lei H.Y., Yeh. T.M., Liu H.S., Lin Y.S., Chen S.H. y Liu C.C. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J. Biomed. Sci.* 2001; 8, 377–388.
- Ludert J.E., Mosso C., Ceballos-Olvera I. y Del Ángel RM. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Virol. J.* 2008; 5, 51.
- Martin S.J., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J., Rder J.A., van Schie R.C., LaFace D.M., Green D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182, 1545-1546.
- Mongkolsapaya J., Dejnirattisai W., Xu X., Vasanawathana S., Tangthawornchaikul N., Chairunsri A., Sawasdivorn S., Duangchinda T., Dong T., Rowland-Jones S., Yenchitsomanus P., McMichel A., Malasit P., Screaton G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2003; 9, 921-927.

- Navarro-Sánchez E., Despre`s P., Cedillo-Barrón L. Innate Immune Responses to Dengue virus. *ARCMED* 2005; 36, 425-435.
- Norazizah S. y AbuBakar S. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2BNS3 protease precursor induce apoptosis. *J. Gen. Virol.* 2003; 84, 2191–2195.
- Prejean C., Sarma T., Kurnasov O., Usacheva A., Hemmings B., Cantley L., Fruman D.A., Morrison L.A., Buller R.M. y Colamonici O.R. Phosphatidylinositol 3-kinase confers resistance to encephalomyocarditis and herpes simplex virus-induced cell death through the activation of distinct downstream effectors. *J. Immunol.* 2001; 167, 4553–4559.
- Rathmell J.C. y Thompson C.B. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1999; 17, 781-828.
- Ravetch, J. V. y Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19, 275–290.
- Rokudai S., Fujita N., Hashimoto Y. y Tsuruo T. Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis. *J. Cell Physiol.* 2000; 182, 290–296.
- Romashkova J. A. y Makarov S. S. NF- κ B is a target of AKT in antiapoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999; 401, 86–90.
- Sung V., Shimodaira S., Doughty A., Picchio G., Can H., Yen T., Lindsay K., Levine A., y Lai M. Establishment of B-Cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J. Virol.* 2003; 77, 2134-2146.
- Tassaneetrithep B., Burgess T.H., Granelli-Piperno A., Trumfheller C., Finke J., Sun W., Eller M.A., Pattanapanyasat K., Sarasombath S., Birx D.L., Steinman R.M., Schlesinger S., y Marovich M.A. DC-SIGN (CD209) mediates Dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 197, 823-829.
- Theofilopoulos A. N., Brandt W. E., Russell P. K. y Dixon F. T. Replication of dengue-2 virus in cultured human lymphoblastoid cells and subpopulations of human peripheral leukocytes. *J. Immunol.* 1976; 117, 953–961.
- Thomas K.W., Monick M. M., Staber J. M., Yarovinsky T., Carter A. B. y Hunninghake G. W. Respiratory syncytial virus inhibits apoptosis and induces

NF- κ B activity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 492–501.

- Torrentes-Carvalho A., Azeredo E., Reis S., Miranda A., Gandini M., Barbosa L., Kubelka C. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104, 1091-1099.
- Tracey K. J. 1994. Tumour necrosis factor, *The cytokine handbook*, 2nd ed. Academic Press Inc., San Diego, Calif. p. 289–318.
- Winkler G., Maxwell S.E., Ruemmler C., Stoller V. Newly synthesized dengue-2 virus non-structural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane associated after dimerization. *Virology* 1989; 171, 302–305.
- World Health Organization. 1997. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*, 2nd ed. WHO, Geneva, Switzerland.

URL'S

- http://www.lis.org/attachments/National/br_1154009602.pdf, consultado el 20/02/2011.
- <http://www.upc.com.mx/pdfs/citometria.pdf>, consultado el 13/12/2010.
- <http://www.cenave.gob.mx/dengue>, consultado el 27/08/2010.