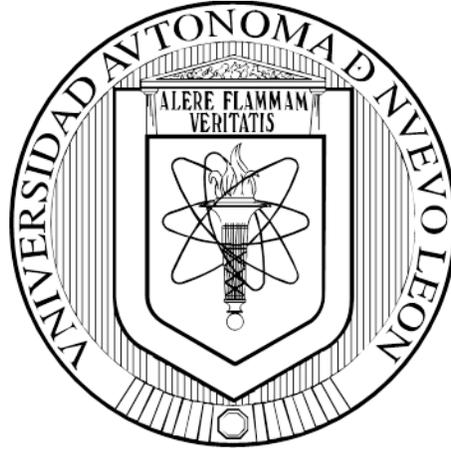


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DEL DENGUE EN LA
MODULACIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS)
Y SU ASOCIACIÓN CON DIABETES MELLITUS**

PRESENTA

MED. PED. VERÓNICA BRAVO DE LA CRUZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

NOVIEMBRE, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DEL DENGUE EN LA
MODULACIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS)
Y SU ASOCIACIÓN CON DIABETES MELLITUS**

PRESENTA

MED. PED. VERÓNICA BRAVO DE LA CRUZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR
E INGENIERÍA GENÉTICA**

ASESOR

DR.C. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2016

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Fue dirigido por la Dr.C.Ana María G. Rivas Estilla.

**EFFECTO DE LA INFECCION CON EL VIRUS DEL DENGUE EN LA
MODULACIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS) Y SU
ASOCIACIÓN CON DIABETES MELLITUS.**

Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla
Directora de Tesis



Dr. med. Javier Ramos Jiménez
Co-Director de Tesis



Dr. C. Carlos Córdova Fletes
Miembro de Tesis



Dra. med. Raquel Garza Guajardo
Subdirectora de Estudios de Posgrado

COLABORACIONES

Dr.Fernando Pérez Chávez
Dr. Rogelio Cázares Tamez
Dr. Felipe Mercado del Ángel
Banco de sangre
Departamento de Patología Clínica
Hospital Universitario “Dr.José E. González”

Dr.C. María de Jesús Loera Arias
Departamento de Histología
Facultad de Medicina, UANL

M.C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda
Dr.C. Daniel Arellanos Soto
M.C.Tanya Bernardette Salas Villalobos
Q.F.B. Gabriel Guerrero López
M.C. Kame Alberto Galán Huerta
M.C.P. Luis Pedro Ruiz Gómez
Est. Juan Luis Delgado Gallegos

Laboratorio de Infectología Molecular
Facultad de Medicina, UANL

AGRADECIMIENTOS

Todo este esfuerzo lo dedico a mis padres y hermano que me han apoyado en todas mis decisiones, siempre caminando a mi lado incondicionalmente y permitiendome compartir mis sueños con ellos. Eternamente les agradezco su amor y cariño.

A mis tutores la Dra. Ana y el Dr.Ramos por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar con ustedes , enseñarme del mundo laboral con sus consejos de experiencia y sobre todo por sus consejos de vida; los admiro mucho y agradezco su paciencia y comprensión.

A mis amigos del lab, con quienes he compartido muchas historias ; gracias por aguantarme en mis malos momentos y por estar conmigo apoyándome. Muchas gracias por todo Soni, Tanys, Gabriel ,Kame, Vero A. También quiero agradecer a Juanito por su apoyo invaluable y sus ganas de aprender. Mi Dani , gracias por tus consejos y apoyo como amigo y compañero. En pocas palabras lo mejor que he obtenido de este tiempo han sido todos ustedes.

A mis compañeros y amigos de otros laboratorios que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme cuando lo necesite. Anita, Alex y Aide muchas gracias por acudir a deshoras al laboratorio para prestarme su equipo. A todos los chicos del laboratorio de la Dra.Herminia , Carlitos, Elsa, Florencia, por su apoyo. Un agradecimiento especial a Don Lalo que siempre esta presente.

A las químicas Amalia y Vero del Banco de Sangre por su amabilidad y apoyo.

Se termina otra etapa académica y esta por demás decir todo lo que he aprendido, el conocimiento que he adquirido es invaluable ; sin embargo, me llevo también lo que he aprendido de mi misma , paciencia y tolerancia a la frustración. Finalmente, citó a Einstein: “Entre las dificultades se esconde la oportunidad”, esperando seguir teniendo muchos obstáculos que me fortalezcan.

ÍNDICE

ABREVIATURAS. FÓRMULAS Y SÍMBOLOS	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	
1.1. Epidemiología de la infección por el virus del dengue.....	1
1.2. Mecanismos de transmisión del virus del dengue.....	4
1.3. Biología molecular del virus del dengue	5
1.4. Ciclo de replicación viral	7
1.5. Respuesta del sistema inmunitario y estrategias de evasión viral	
1.5.1. Respuesta inmune innata.....	8
1.5.2. Respuesta inmune adaptativa.....	9
1.6. Fisiopatología de la infección por dengue	
1.6.1. Facilitación inmunológica mediada por anticuerpos.....	10
1.6.2. Respuesta de células T.....	11
1.6.3. Tormenta de citocinas, activación del complemento y extravasación vascular.....	11
1.6.4. Autoinmunidad.....	12
1.7. Factores de riesgo para el desarrollo de un cuadro clínico severo.....	12
1.8. Manifestaciones clínicas de la infección por dengue	13
1.9. Diagnóstico clínico diferencial	17
1.10. Diagnóstico	17
1.11. Tratamiento.....	20
Capítulo II. ANTECEDENTES	
2.1. Antecedentes directos.....	21
2.2. Biomarcadores de severidad.....	22
2.3 Sistema monocítico-macrófago como orquestador de la respuesta inmune innata ante la infección por DENV.....	23
2.4 Oxido nítrico sintasa inducible como moduladora de la respuesta al estrés oxidativo ante la infección por DENV	24
2.5 Asociación de la respuesta del sistema inmune innato y estrés oxidativo en la infección por dengue bajo el contexto de una enfermedad crónico degenerativa como DM2.....	29

Capítulo III. JUSTIFICACIÓN	35
Capítulo IV. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo general	
4.2. Objetivos específicos	
Capítulo V. MATERIALES	
5.1. Lugar de realización.....	37
5.2. Reactivos	37
5.3. Materiales	40
5.4. Equipo.....	42
5.5. Material biológico	
5.5.1. Cultivo de CMN	44
5.5.2. Líneas celulares	45
5.5.3. Virus	46
Capítulo VI. MÉTODOS	
6.1. Estrategia general.....	47
6.2. Métodos	
6.2.1. Aislamiento de células mononucleares (CMN) a partir de	47
concentrados leucocitarios de donadores de sangre y de sangre periférica	
6.2.2. Cultivo primario de células mononucleares.....	48
6.2.3. Ensayo de viabilidad celular con MTT	48
6.2.4. Cultivo de células C6/36.....	49
6.2.5. Cultivo de células Huh7.....	49
6.2.6. Infección de cultivos celulares con DENV.....	49
6.2.7. Preparación de stock viral.....	50
6.2.8. Extracción de RNA total por el método de Chomcynski y Sacchi.....	50
6.2.9. Extracción de RNA por columna.....	50
6.2.10. Retrotranscripción (RT-MMLV).....	51
6.2.11. Confirmación molecular y serotipificación de dengue.....	52
6.2.12. Inmunohistoquímica.....	54
6.2.13. Detección molecular de iNOS (PCR y qPCR).....	54
6.2.14. Inmunofluorescencia para cuantificación de iNOS.....	54
6.2.15. Análisis estadístico.....	55
Capítulo VII. RESULTADOS	
7.1. Aislamiento de CMN a partir de concentrados leucocitarios y sangre periférica.....	56
7.2. Caracterización del cultivo primario de células mononucleares.....	57
7.3. Preparación de stock viral para ensayos de infección.....	61
7.4. Caracterización de células mononucleares infectadas con DENV2	63

7.5.Evaluación de la capacidad infectiva de DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes.....	64
7.6.Evaluación de la regulación transcripcional de iNOS en células mononucleares de sujetos sanos infectadas con DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes.....	66
7.7.Evaluación de la expresión génica de iNOS en células mononucleares aisladas de pacientes con DM2 y sujetos sanos infectadas con DENV2 prototipo y cepas virales aisladas de pacientes.....	69
7.8.Cuantificación de niveles de la enzima iNOS en células mononucleares aisladas de voluntarios sanos y pacientes con DM2 infectadas con DENV2.....	73
7.9.Regulación de la expresión génica y traduccional de iNOS en una línea celular distinta, empleando células Huh7 infectadas con DENV2 para determinar si el efecto es tejido-específico.....	75
Capítulo VIII. DISCUSIÓN.....	77
Capítulo IX. CONCLUSIONES	81
Capítulo X. BIBLIOGRAFÍA.....	82
Capítulo XI. ANEXOS	
Técnicas y protocolos.....	92
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	122

ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y SÍMBOLOS

ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados centígrados
CD	Cluster of differentiation
Cel	Células
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
cm	Centímetros
CMN	Células mononucleares
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DENV	Virus del dengue
DENV-1	Dengue serotipo 1
DENV-2	Dengue serotipo 2
DENV-3	Dengue serotipo 3
DENV-4	Dengue serotipo 4
DENV	Virus del dengue
DH	Dengue hemorrágico
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FD	Fiebre por dengue
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue
h.p.i.	Horas post-infección
hrs	Horas
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina de isotipo G
IgM	Inmunoglobulina de isotipo M
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
Kb	Kilobases
M	Molar
μM	Micromolaridad
μL	Microlitros
mM	Milimolaridad
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MOI	Multiplicidad de infección
MWM	Marcador de peso molecular
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nM	Nanomolaridad
OMS	Organización Mundial de la Salud
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintasa
OPS	Organización Panamericana de Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno

qPCR	PCR cuantitativa/ PCR en tiempo real
RNA	Acido Ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa/ Retrotranscripción
s	segundos
SBF	Suero bovino fetal
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SSA	Secretaría de Salud
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TLR	Receptores tipo Toll
UI	Unidades Internacionales
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

No	Título	Página
1	Aumento en los casos de infecciones con el virus del dengue a nivel mundial de 1943 a 2013	1
2	Presencia de la infección por dengue a nivel mundial	2
3	Número de casos de dengue en Nuevo León desglosados por semana epidemiológica durante el periodo 2008-2013	3
4	Número de casos de dengue en Nuevo León en el periodo 2008-2013 desglosados por semana epidemiológica y representados en orden de año de registro	3
5	Dinámica de transmisión del dengue	4
6	Estructura de la partícula viral del dengue	5
7	Estructura del genoma viral del dengue y sus productos proteicos	6
8	Distribución geográfica de los distintos genotipos del dengue a nivel mundial	7
9	Patogénesis de la infección por el virus del dengue de acuerdo a la fase de la enfermedad	10
10	Clasificación clínica de la infección por dengue (OMS 2009)	14
11	Curso clínico de la infección por dengue	15
12	Esquema comparativo de los diferentes métodos de diagnóstico del dengue	18
13	Vías de inducción de iNOS por los agonistas TLR y citocinas	26
14	Vías de activación de la actividad anti-inflamatoria y pro-inflamatoria de macrófagos M1 y M2	27
15	Proceso inflamatorio crónico de baja intensidad en DM2	33
16	Fotomicrografía de monocapa de células mononucleares	44
17	Fotomicrografía de monocapa de células C6/36	45
18	Fotomicrografía de monocapa de células Huh7 parental	46
19	Estrategia general	47
20	Separación de células sanguíneas con polisucrosa-diatrizoato de sodio	56
21	Fotomicrografía de CMN teñidas con líquido de Türk	57
22	Placa de ELISA mostrando el ensayo de MTT en CMN	58
23	Ensayo de viabilidad celular y adhesión celular en CMN posterior al retiro de medio de cultivo a diferentes tiempos (hrs)	59
24	Ensayo de viabilidad celular en CMN con retiro de medio a las 12hrs	59
25	Caracterización de cultivo primario de CMN	61
26	Cultivo de DENV en células C6/36	62
27	Evaluación molecular de DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes	63
28	Fotomicrografía de CMN a las 24 h.p.i. con DENV2	64
29	Inmunohistoquímica de CMN infectadas (24 h.p.i.) con DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes marcadas con anticuerpo 4G2	65
30	Estandarización de PCR punto final de iNOS en CMN de 24 hrs de adherencia	67
31	Curva de eficiencia RT-qPCR iNOS	68
32	Evaluación de la expresión transcripcional de iNOS en células mononucleares de donadores sanos	69
33	Análisis transcripcional de iNOS en CMN de sujetos sanos y diabéticos infectadas con DENV2 y aislado viral de paciente	72
34	Evaluación traduccional de iNOS en CMN de sujetos sanos y diabéticos infectadas con DENV2	74
35	Caracterización de células Huh7 parental infectadas con DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes a las 48 h.p.i.	75
36	Análisis transcripcional de iNOS en la línea celular Huh7 parental a las 48 h.p.i.	76
37	Análisis traduccional de iNOS en la línea celular Huh7 parental a las 48 h.p.i.	76

LISTA DE TABLAS

No	Título	Página
1	Comparación de las técnicas para el diagnóstico de dengue	18
2	Condiciones de reacción para la retrotranscripción (Primer mezcla)	51
3	Condiciones de reacción para la retrotranscripción (Segunda mezcla)	51
4	Programa de reacción de RT	52
5	Secuencia de primers empleados para la PCR de Lanciotti	52
6	Condiciones de reacción para la detección molecular de DENV	53
7	Programa de reacción para la detección molecular de DENV	53
8	Condiciones de reacción para PCR punto final de iNOS	67
9	Condiciones de la reacción de RT-qPCR para iNOS y RSP18 empleando SybrGreen	68
10	Características sociodemográficas, parámetros clínicos y bioquímicos de sujetos sanos y pacientes diabéticos	71

RESUMEN

EFFECTO DE LA INFECCION CON EL VIRUS DEL DENGUE EN LA MODULACIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS) Y SU ASOCIACIÓN CON DIABETES MELLITUS

Introducción: La infección por el virus del dengue es endémica en más de 100 países a nivel mundial. Hasta el momento, no están bien esclarecidos los factores de riesgo que conllevan a una persona a un cuadro clínico severo por dengue. En años recientes, algunos estudios han revelado una mayor incidencia de casos graves en sujetos diabéticos. Tanto en la infección por dengue como en la fisiopatología de la DM2, existe un incremento de la respuesta inmune innata siendo las células del sistema monocítico macrófago las principales efectoras de la inflamación. Los monocitos tienen una función dual (anti-inflamatoria y pro-inflamatoria) durante el proceso infeccioso siendo su función pro-inflamatoria la principal en las primeras etapas de la infección. Esta función está regulada por la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible que regula la producción de óxido nítrico. En este sentido, consideramos que existe una expresión diferencial a nivel génico y traduccional de la enzima iNOS en células mononucleares infectadas con el DENV.

Objetivo: Evaluar la regulación de la expresión de la enzima iNOS en células mononucleares, de sujetos sanos y pacientes con diagnóstico de DM2, infectadas con DENV 2 prototipo y de aislados virales de pacientes.

Material y métodos: Se emplearon concentrados leucocitarios para el aislamiento de CMN y la estandarización del cultivo primario de las mismas. Se reclutaron 12 sujetos sanos y 12 pacientes diabéticos entre 40 a 65 años, de los cuales se obtuvo sangre periférica y aislaron las CMN por gradiente de densidad empleando Ficoll-Hypaque. Las CMN se cultivaron e infectaron con DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes. En las células con y sin infección se evaluó la expresión génica del gen de iNOS por RT-qPCR, además; se analizó la expresión de la enzima iNOS por inmunofluorescencia.

Para demostrar si el efecto de la expresión de iNOS era tejido específica, se evaluó iNOS a nivel transcripcional y traduccional en células Huh7 parental infectadas con las diferentes cepas de DENV2.

Resultados: En el análisis de regresión lineal entre sujetos sanos y diabéticos no hubo diferencia estadística en la expresión génica y traduccional de iNOS, existiendo una alta variabilidad en la expresión génica entre los sujetos de estudio. Se observó mayor expresión de iNOS en CMN infectadas con DENV2 prototipo. A nivel traduccional, hubo mayor expresión en los sanos comparados con los diabéticos. Al realizar el análisis del subgrupo de diabéticos, se encontró menor expresión de iNOS a nivel transcripcional y traduccional en sujetos diabéticos con glicemia $>400\text{mg/dL}$ y $\text{HbA1c} >10$.

Bajo la premisa de un mismo origen genético, se encontró que existe una diferencia significativa en la expresión de iNOS dependiente de la cepa viral en células Huh7 parental.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de la infección por el virus del dengue

El dengue se distribuye globalmente entre los paralelos 30° N y 40° S condicionado por la existencia del vector, siendo una enfermedad endémica en el Sudeste Asiático, el Pacífico, África, el Caribe y las Américas. La transmisión se produce durante todo el año en las áreas endémicas tropicales, sin embargo en la mayoría de los países existe un patrón estacional con una mayor incidencia en la época de lluvias. La OMS reporta un incremento de 30 veces en la incidencia de la infección por dengue en los últimos 60 años (Figura 1) ¹.

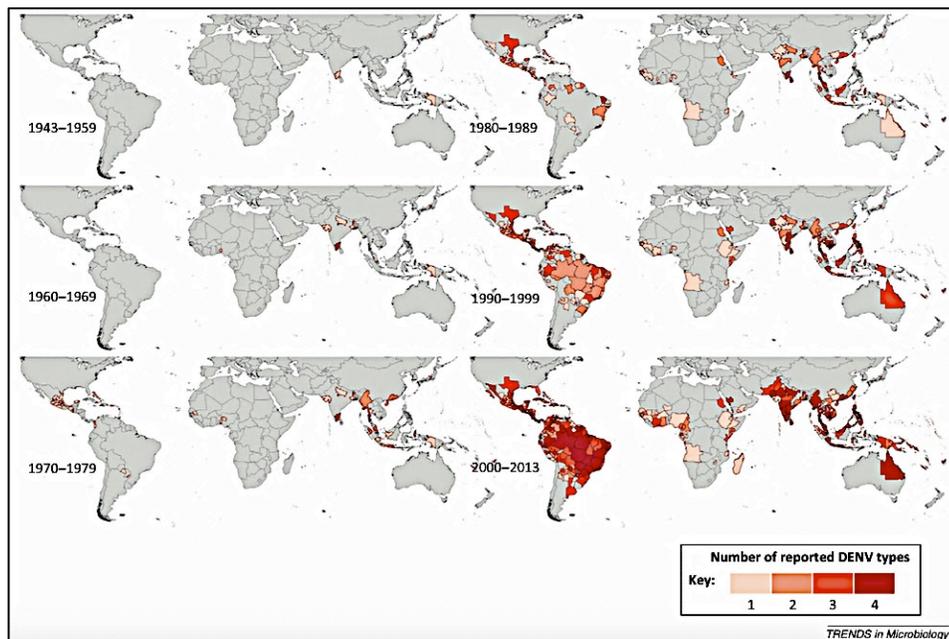


Figura 1. Aumento en los casos de infecciones con el virus del dengue a nivel mundial de 1943 a 2013¹.

Se estima que existen anualmente mas de 50-100 millones de infecciones mundialmente, siendo endémicos más de 100 países (Figura 2) , considerandose que al menos la mitad de la población mundial se encuentra en riesgo de infección ².

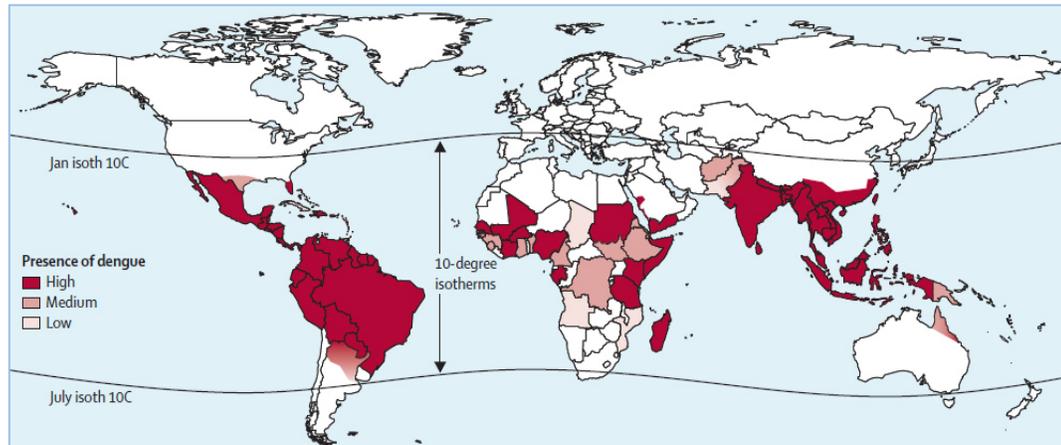


Figura 2. Presencia de la infección por dengue a nivel mundial².

En México la incidencia del dengue ha aumentado en más del 600 por ciento desde el 2001 hasta la fecha ³; desde el 2004 circulan los cuatro serotipos del virus del dengue (predominantemente tipo 2 y 3) ⁴. Se reporta un mayor número de casos en regiones que cuentan con las condiciones ecológicas para su transmisión principalmente en la costa del Golfo y el Sureste mexicano ⁵. En el reporte de la OPS del 2015, en México se reportaron en total 26,665 casos confirmados por laboratorio (incidencia 22.4 /100000 habitantes) con 5464 casos severos y 42 defunciones ⁶.

Con base en los datos de revisión epidemiológica (2008-2013) , Arellanos y colaboradores (datos no publicados) señalan a Nuevo León como el cuarto lugar nacional en reporte de casos considerándose endémico para la transmisión de esta arbovirosis, observándose un aumento del número de casos de forma estacional (periodo de finales y verano y otoño) y cíclica (cada 3 años) (Figura 3 y 4) ⁷. Además se ha reportado la circulación de los cuatro serotipos , siendo los serotipos 1 y 2 los de mayor incidencia⁸.

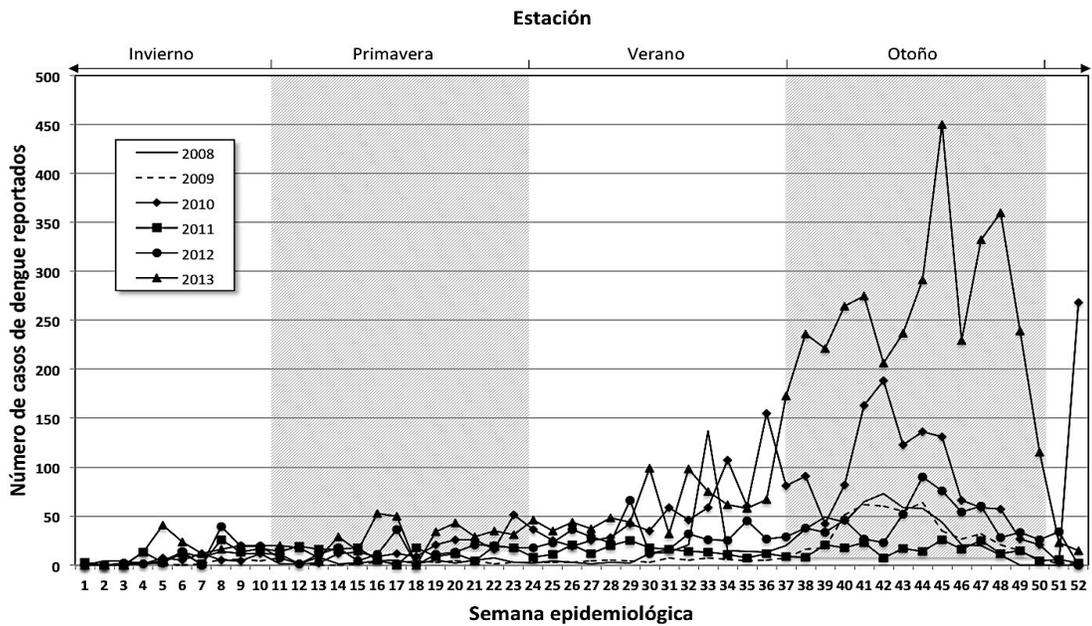


Figura 3. Número de casos de dengue en Nuevo León desglosados por semana epidemiológica durante el periodo 2008 – 2013⁷.

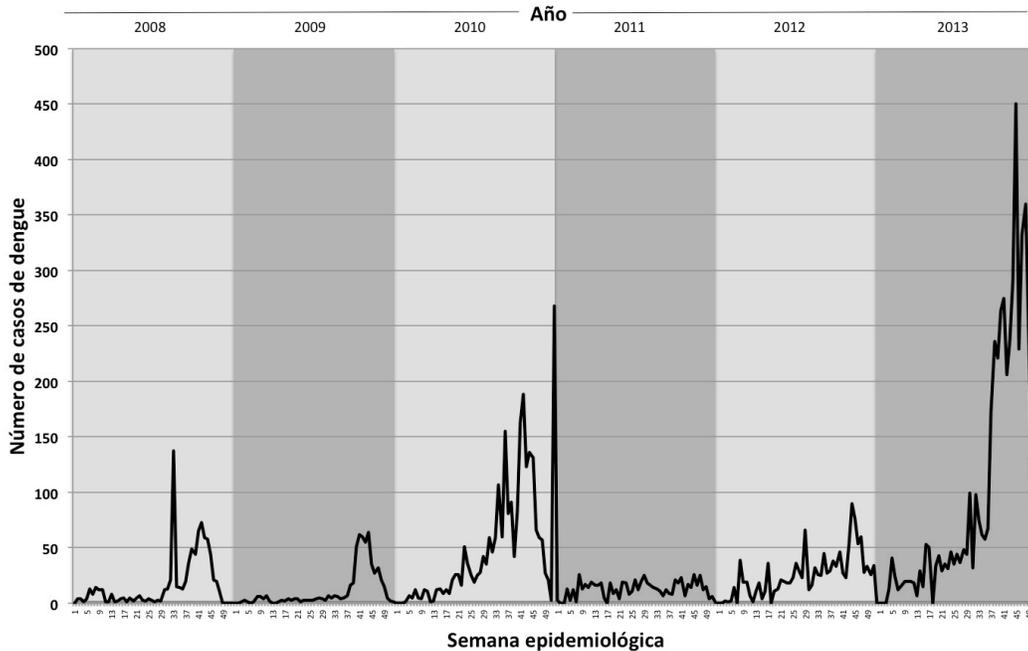


Figura 4. Número de casos de dengue en Nuevo León en el periodo 2008 – 2013 desglosados por semana epidemiológica y representados en orden de registro⁷.

1.2. Mecanismos de transmisión del virus del dengue

El principal mecanismo de transmisión del virus del dengue (DENV) es a través de la picadura de los artrópodos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*⁹. Existen reportes de un ciclo de transmisión enzoótico del virus del dengue en bosques y selvas de Asia y África que involucra a primates inferiores como hospederos¹⁰. Sin embargo, el ciclo de transmisión más importante es el urbano o epidémico. El humano es el hospedero de excelencia debido a la alta viremia sistémica que se produce, eliminando la necesidad de un hospedero enzoótico para amplificar al virus¹¹. Los mosquitos adquieren el virus cuando se alimentan de un humano virémico, y pueden transmitir el virus infectando a otro humano de 8 a 12 días después de la ingesta inicial¹¹. Este periodo se denomina *incubación extrínseca* y representa el tiempo en el cual el virus se replica en las glándulas salivales del vector, el cual permanece infectado durante el resto de su periodo de vida (15 a 65 días)¹² (Figura 5).

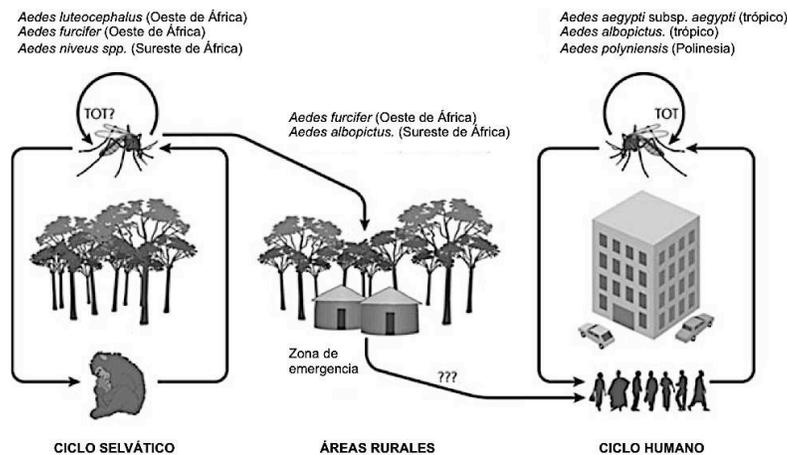


Figura 5. Dinámica de transmisión del dengue¹²

Las hembras se alimentan con mayor frecuencia durante el inicio de la mañana y en las últimas horas de la tarde. Una vez que el virus se ha inoculado en el humano, se replica entre 3 y 14 días en un periodo denominado *incubación intrínseca*, que antecede al cuadro clínico.^{12,13}

Aunque no se ha documentado la transmisión directa del virus de persona a persona, existen reportes de casos asociados a transplante de órganos¹⁴ y médula ósea, lesiones ocasionadas por punzocortantes y contacto con membrana mucosa contaminada.¹⁵ Se han reportado casos de infección congénita por transmisión vertical del dengue¹⁶.

1.3. Biología molecular del virus del dengue

El virus fue aislado en 1943 y años después la comunidad científica identificó que la enfermedad podía ser causada por cuatro serotipos diferentes.¹⁷

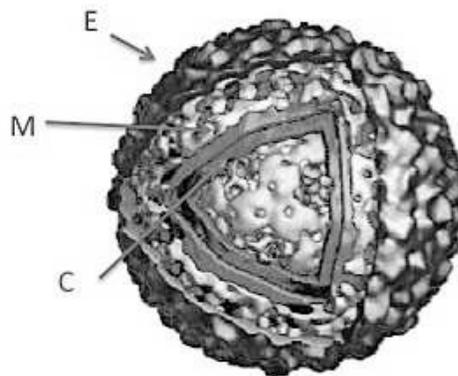


Figura 6. Estructura de la partícula viral del dengue¹⁸.

El virus del dengue es un miembro de la familia Flaviviridae y del género *Flavivirus*. El virus es esférico, con una membrana lipídica que envuelve al virión. Tiene un tamaño que varía de 40 a 50 nm de diámetro, presentando pequeñas proyecciones superficiales de 5 a 10 nm¹⁸ (Figura 7). Contiene un genoma de RNA con polaridad positiva, dentro de una cápside con simetría icosaédrica, y rodeado por una envoltura externa con las proteínas prM y E^{18,19}.

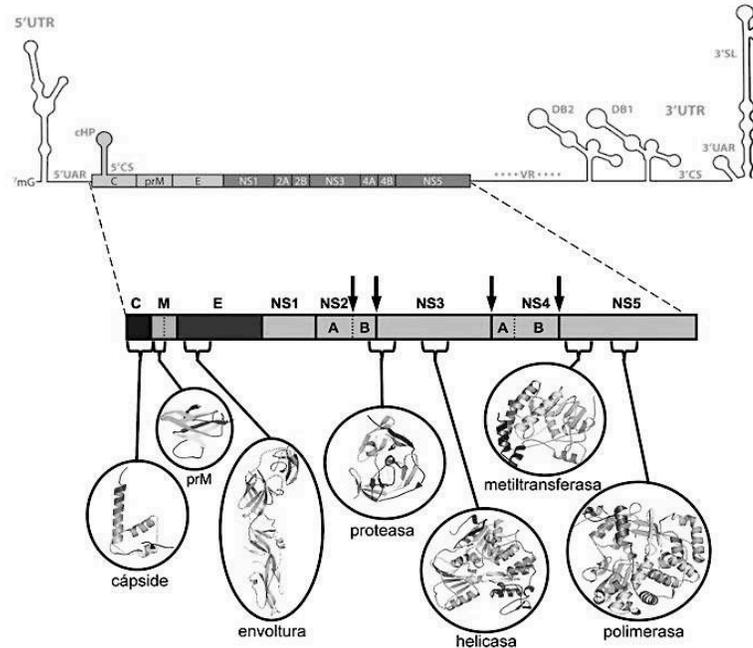


Figura 7. Estructura del genoma viral del dengue y sus productos proteicos²⁰.

El genoma del virión tiene un tamaño de aproximadamente 11Kb y un marco de lectura abierto (ORF) único, flanqueado por dos regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) que le proporcionan estabilidad y contienen regiones de control²⁰.

El ORF codifica para una única poliproteína, la cual sufre diversos procesos de corte para generar proteínas virales individuales. Las tres proteínas estructurales (C, M y E) están localizadas en el extremo amino terminal, mientras que las proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) se encuentran contenidas en el extremo carboxilo de la poliproteína²⁰ (Figura 7).

Los cuatro serotipos de DENV son genéticamente diversos solo son idénticos en 60-75% a nivel de aminoácidos. Los virus del mismo serotipo son distintos en un 3% a nivel aminoacídico y 6% a nivel nucleotídico por lo que se dividen filogenéticamente en genotipos y clados . Los genotipos se

han definido dependiendo de la región geográfica que ocupan: americano, asiático/americano, asiático I, asiático II y cosmopolita (Figura 8) .Las variaciones genéticas entre serotipos y clados son determinantes para la virulencia y potencial epidémico²¹⁻²⁴ , también influyen en la interacción de la respuesta inmune del hospedero con el virus²⁴ y en la eficacia de la respuesta antiviral. Es por ello , que los diferentes serotipos se han asociado a presentaciones clínicas variadas^{24,25} .



Figura 8. Distribución geográfica de los distintos genotipos del dengue a nivel mundial²¹ .

1.4. Ciclo de replicación viral

Después de que el virus ha sido inoculado, es fagocitado por los macrófagos tisulares y llevado al sistema fagocítico mononuclear, en donde se replica principalmente. La célula blanco es el fagocito mononuclear y algunos estudios de casos severos y graves por dengue han identificado al antígeno del virus en monocitos de sangre periférica, en células mononucleares de la piel, el bazo, el timo, los ganglios linfáticos, células de Kupffer y macrófagos alveolares del pulmón y ocasionalmente en macrófagos del glomérulo renal y en la superficie de los linfocitos B³ .

La vía de entrada del virus del dengue a su célula blanco es por endocitosis mediada por clatrina²⁶. Se han identificado diversos receptores tanto en células humanas como de mosquito, un ejemplo es el receptor DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) en células dendríticas ²⁷. Después de la endocitosis, existe un cambio conformacional dependiente de pH que permite el escape del RNA viral del endosoma, posteriormente se transloca al retículo endoplásmico rugoso (RER) donde se replica y el RNA viral se invagina generando vesículas²⁸ con cápside proteica . Estas últimas, se liberan del RER adquiriendo una membrana lipídica recubierta por proteínas de membrana (prM y E), formando el virión que se secretará para infectar nuevas células permisivas.

El DENV emplea diversos mecanismos para utilizar la maquinaria celular del hospedero y así facilitar la replicación viral. La traducción y replicación del virus del dengue ocurre en el retículo endoplásmico de la célula , la cual lleva acabo rearrreglos y expansión durante la infección. Los rearrreglos son independientes a la respuesta con proteínas no plegadas (UPR unfolded protein response) . Las proteínas virales no estructurales (NS4A,NS2B/3) inducen la UPR para disminuir la muerte celular durante la replicación viral. Además, el virus induce autofagia y regula el metabolismo de los lípidos para incrementar la replicación ²⁹.La vía de la autofagia debe ser funcional ya que es necesaria para la maduración y producción de viriones infecciosos ³⁰.

1.5. Respuesta del sistema inmunitario y estrategias de evasión viral

1.5.1 Respuesta inmune innata

La primera línea de reconocimiento de RNA viral del sistema inmune innato son los receptores de reconocimiento de patrones (TLR) y los sensores intracelulares como MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) y RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1). El receptor TLR3 reconoce al virus

después de la acidificación por el endosoma e induce una respuesta de interferón α/β . Tanto RIG-I como MDA5 inducen la respuesta de interferón β ³¹ .

El interferón liberado por células infectadas actúa de forma autócrina o parácrina activando el receptor de interferón α/β de otras células y la vía de señalización antiviral STAT1/2. Sin embargo, las proteínas virales NS2A, NS4A y NS4B al expresarse en conjunto, inhiben la fosforilación de STAT1 interfiriendo en esta vía antiviral^{32,33}. La proteína viral NS5 se une a la proteína UBR-4 la cual interactúa con STAT2 y media la degradación de la misma por la vía del proteosoma³³ .

1.5.2. Respuesta inmune adaptativa

Después de una infección primaria, la mayoría de los anticuerpos neutralizantes van dirigidos a epítopes específicos del virión. La unión de estos anticuerpos neutralizantes al virus puede incrementar la captura de viriones por la línea celular monocítica a través de la interacción con receptores IgG de la superficie celular generándose un fenómeno conocido como “facilitación de la infección mediada por anticuerpos”³⁴ . Además, ocurre una respuesta masiva de plasmablastos³⁵, con un alto grado de reactividad cruzada entre serotipos.

Aunque no es un componente del virión, la proteína NS1 también representa un blanco importante para los anticuerpos. La proteína NS1 se expresa en la superficie de las células infectadas y es secretada también a la circulación como un multímero soluble. Los anticuerpos anti-NS1 causan lisis de las células infectadas por un mecanismo mediado por el complemento³⁶ .

En relación a las células T, la respuesta de las células T CD4+/CD8+ es dirigida contra múltiples proteínas virales, la proteína NS3 parece ser particularmente inmunogénica y reconocida por esta estirpe celular. La reacción de las células T con el virus del dengue produce altos niveles de

IFN γ (interferón γ) , TNF- α (tumor necrosis factor α)y TNF- β (tumor necrosis factor β) que finalmente producen lisis celular. Las células T CD8 además de su participación en la patogénesis también tienen actividad protectora³⁷.

1.6.Fisiopatología de la infección por dengue

La fisiopatología del dengue severo es multifactorial. El progreso de la infección depende del balance entre las condiciones genéticas e inmunológicas del individuo así como de los factores virales (Figura 9)³⁸.

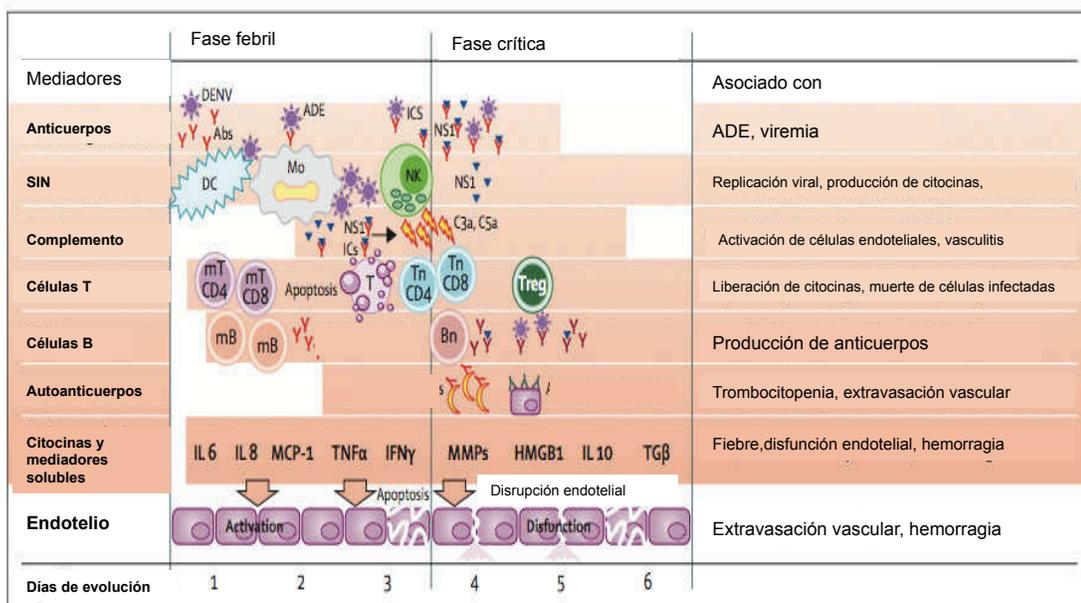


Figura 9. Patogénesis de la infección por el virus del dengue de acuerdo a la fase de la enfermedad³⁸. SIN: sistema inmune innato

1.6.1.Facilitación inmunológica mediada por anticuerpos

Los principales mecanismos por los cuales la infección por el virus del dengue causa fiebre hemorrágica por dengue (FHD) es tema de controversia desde la fecha en que el síndrome fue reconocido. A pesar de la plausibilidad biológica de la teoría de la facilitación mediada por anticuerpos, esta no explica adecuadamente todas las observaciones clínicas y epidemiológicas. En este sentido, se han identificado cuadros hemorrágicos en primoinfecciones, lo que implica que cargas virales altas o determinadas

cepas virales pueden tener una mayor virulencia produciendo infecciones más severas. Sin embargo, el análisis individual de genotipos virales dentro de una sola población, ha provisto poca evidencia de que los virus aislados de pacientes con FHD difieran de los aislados en pacientes no complicados^{39,40}.

1.6.2. Respuesta de células T

De acuerdo a la teoría de una respuesta inmunitaria heteróloga frente al nuevo serotipo esta promueve la opsonización de la partícula viral, favoreciendo su entrada y replicación en macrófagos y células dendríticas, induciendo una mayor carga viral y una fuerte activación de células T de memoria. Se ha demostrado que la activación de células T de memoria de baja afinidad para el serotipo infectante pero con alta afinidad para un serotipo infectante previo se correlaciona con severidad en la enfermedad. Debido a esta baja afinidad la actividad de eliminación de células infectadas es baja³⁸. Además, se ha reportado un patrón inmunológico regulatorio en el caso de infección secundaria homóloga y un patrón proinflamatorio en la infección secundaria heteróloga⁴¹.

1.6.3. Tormenta de citocinas , activación del complemento y extravasación vascular

Los mecanismos que llevan a la disfunción endotelial aún no se encuentran bien esclarecidos. Durante la infección, existe la liberación de un gran número de citocinas y mediadores químicos, ocasionando daño en el endotelio vascular con fuga de líquido extracelular⁴². Además, como parte del proceso inflamatorio, existe consumo de plaquetas y disminución de su actividad lo que lleva al aumento de la permeabilidad vascular, que aunado a la activación del sistema de coagulación por diferentes vías favorece los fenómenos hemorrágicos, característica principal del dengue severo⁴³.

La infección directa de células endoteliales no parece ser la causa de la extravasación vascular sino más bien de los factores solubles producidos por células T, macrófagos y mastocitos como TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, factor inhibidor de la migración de macrófago, HMGB1(High mobility group box 1 protein), MCP-1 y metaloproteinasas⁴⁴⁻⁴⁶

También se ha propuesto a la proteína NS1, anticuerpos anti-NS1 y a la activación del complemento (C3a y C5a) como participantes en la disfunción endotelial^{47,48} Se ha reportado una modulación directa de los factores del complemento por la proteína NS1 liberada por las células infectadas⁴⁹

1.6.4. Autoinmunidad

Es controversial la participación de autoanticuerpos en el desarrollo de dengue severo y choque por dengue. Se han descrito anticuerpos contra epítopes de la proteína viral E que se unen al plasminógeno e inhiben la actividad de la plasmina . La severidad se ha relacionado con la reactividad cruzada de anticuerpos anti-NS1 con células hepáticas y plaquetas, las cuales expresan incremento del óxido nítrico que conlleva a la apoptosis celular^{50,51}.

1.7. Factores de riesgo para el desarrollo de un cuadro clínico severo

Estudios epidemiológicos sugieren que el desarrollo de dengue hemorrágico/choque por dengue ocurre en individuos con una segunda infección por un serotipo diferente , infantes con infección primaria con madre inmune a dengue⁵² ,serotipo y genotipo viral; así como intervalo prolongado entre las infecciones⁵³.

Dado que sólo un 3% de las personas con reinfección por DENV desarrolla FHD parece que otros factores relacionados con el hospedero podrían estar implicados en el progreso de la enfermedad, tales como la edad, raza o la presencia de enfermedades crónicas, así como determinados defectos en la coagulación y fibrinólisis. También se ha postulado una predisposición

genética favorecida por determinados haplotipos del HLA, pero no existe una clara asociación. Los factores genéticos no HLA (ej. Receptor de vitamina D, receptor Fcγ IIA, deficiencia G6PD, TNFα, IL-10) se han asociado a severidad de la infección^{54,55}. Además, alelos en *MICA* y *MICB* se han asociado a pacientes sintomáticos contra asintomáticos; y los alelos *MICB* y *PLCE1* se han asociado a susceptibilidad a choque por dengue^{56,57}. Se ha reportado un menor riesgo de dengue severo en personas de etnia negra⁵⁸. Finalmente, existe mayor morbi-mortalidad en niños con dengue comparados con adultos, principalmente en el sureste asiático, estas diferencias parecen deberse en parte a diferencias en la permeabilidad microvascular^{59,60}.

1.8. Manifestaciones clínicas de la infección por dengue

La OMS publicó en el 2009 la nueva clasificación de caso por dengue, reemplazando a la clasificación tradicional de fiebre por dengue y dengue hemorrágico/choque por dengue en dengue con o sin signos de alarma y dengue severo (Figura 10)³. Esta nueva guía buscaba mejorar el diagnóstico oportuno y tratamiento apropiado⁶¹⁻⁶³ debido al reconocimiento de signos y síntomas de alarma; esto corroborado por diversos estudios que han demostrado incremento en la sensibilidad para la detección de casos graves. Sin embargo, algunos estudios reportan que puede reducir el énfasis en el síndrome de extravasación vascular, incrementar la carga de pacientes en países endémicos con bajos recursos e incremento en el reporte del número de casos⁶⁴. En nuestro país, las guías de práctica clínica de la Secretaría de Salud emplean la clasificación clínica del 2009.

Clasificación de casos de dengue y niveles de severidad

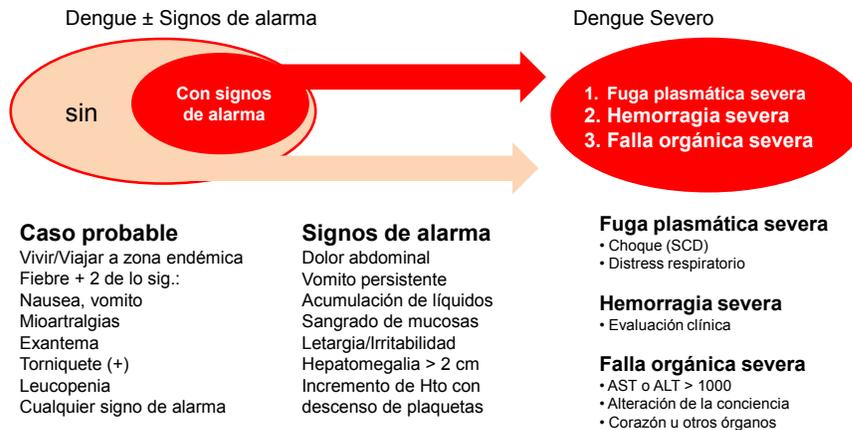


Figura 10 . Clasificación clínica de la infección por dengue (OMS 2009)³

Después de un periodo de incubación de 4-8 días, la infección por cualquier serotipo de dengue puede producir un amplio espectro de signos y síntomas, siendo las infecciones asintomáticas o subclínicas las más comunes. La mayoría de los pacientes cursan con un cuadro clínico autolimitado, sin embargo; un 10% progresa a un cuadro clínico severo. La enfermedad inicia de forma abrupta seguida de 3 fases : febril, crítica y de convalecencia (Figura 11).

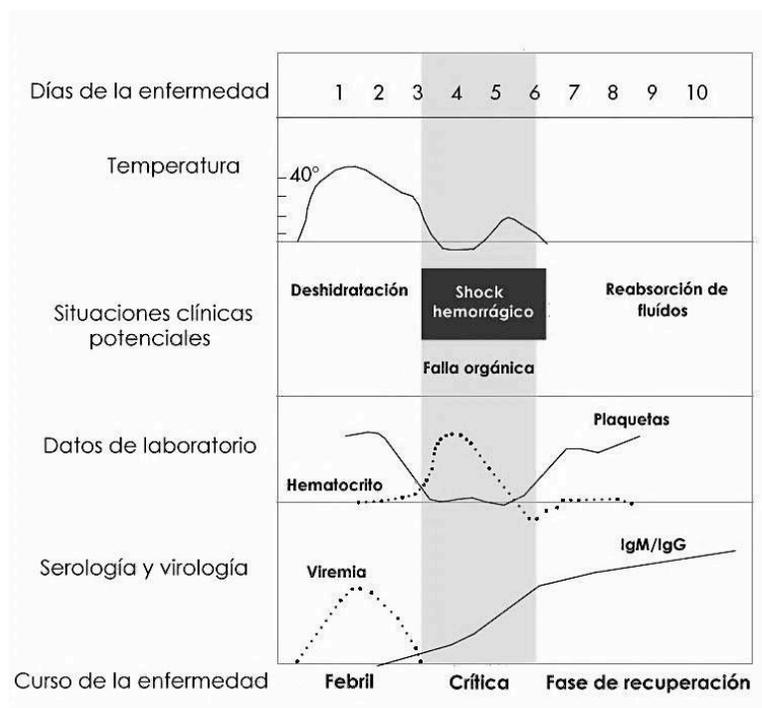


Figura 11. Curso clínico de la infección por dengue³.

La fase febril dura generalmente de dos a siete días y a menudo se acompaña de dolor retrocular, eritema facial, mialgias, artralgias y cefalea⁶⁵. Algunos pacientes pueden presentar odinofagia o conjuntivitis. También es común la presencia de anorexia, náusea y vómito. El diagnóstico diferencial con otras enfermedades febriles es difícil en la fase febril temprana⁶⁶. En este punto, se puede realizar la prueba de torniquete, la cual si es positiva hace más probable el diagnóstico de dengue, aunque no es útil para distinguir la fiebre por dengue de la fiebre hemorrágica por dengue⁶⁷.

Algunos pacientes pasan de la fase febril a la fase crítica alrededor de los días tercero a séptimo de evolución, cuando suele ocurrir la defervescencia de la fiebre. La fase crítica generalmente dura 24 a 48 horas. Los pacientes que mejoran en éste punto se consideran casos de dengue no grave. Se consideran casos graves aquellos pacientes que presentan un aumento en la permeabilidad capilar con incremento del hematocrito. Algunos casos

graves no presentan defervescencia en la transición de la fase febril a la fase crítica, y ésta sólo se puede sospechar mediante signos de alarma de laboratorio, derivados de la biometría hemática y perfil bioquímico³.

En los casos graves, al inicio de la fase crítica generalmente ocurre leucopenia y trombocitopenia antes de la fuga plasmática . La severidad de esta fase depende del grado de extravasación vascular y del volumen de líquidos administrados. Se pueden detectar derrame pleural y ascitis, ya sea clínicamente o mediante estudios radiológicos o ultrasonográficos⁶⁸ .La elevación del hematocrito generalmente refleja la gravedad de la fuga plasmática.

El choque sobreviene cuando se pierde un volumen crítico de plasma, generalmente esta situación va precedida de signos de alarma. Durante el choque, hay hipotermia e hipoperfusión de órganos vitales lo que resulta en falla orgánica progresiva, acidosis metabólica y coagulopatía por consumo⁶⁹. Tanto la falla orgánica grave y hemorragia grave, como algunas manifestaciones atípicas de la infección por dengue como la hepatitis, la encefalitis o la miocarditis , pueden desarrollarse sin manifestaciones evidentes de fuga plasmática o de choque⁶⁹⁻⁷¹ .

Si el paciente sobrevive a las 24 a 48 horas de la fase crítica, durante la fase de recuperación o convalecencia tiene lugar una reabsorción gradual de líquido del compartimento extravascular, que se traduce en: mejoría del bienestar general ,retorno del apetito ,desaparición de los síntomas gastrointestinales, estabilización hemodinámica ,recuperación de la diuresis, estabilización o disminución del hematocrito, elevación del recuento de leucocitos (fase temprana de recuperación) y recuperación del recuento plaquetario (mayor de 50 mil y en ascenso; fase tardía de recuperación)⁶⁹ .

Sin embargo, si se administraron inadecuadamente líquidos intravenosos durante la fase crítica en la convalecencia se puede presentar dificultad respiratoria por derrame pleural masivo, ascitis masiva, edema pulmonar o

insuficiencia cardiaca congestiva.

Si no se da manejo apropiado la mortalidad es hasta 20%, sin embargo; si se da el soporte adecuado esta disminuye a <1%³. Se han reportado 57% casos de adultos con síntomas persistentes (artralgias o fatiga) hasta más de 2 años después de la infección pero esta implicación clínica ha sido poco estudiada⁷².

1.9. Diagnóstico clínico diferencial

Este debe realizarse de acuerdo al perfil epidemiológico de cada región, pueden considerarse la leptospirosis, rickettsiosis, fiebre tifoidea, brucelosis, paludismo (*falciparum*), fiebre amarilla, púrpura trombocitopénica, leucemia aguda, aplasia medular, sepsis, meningococcemia, influenza, síndrome de HELLP (mujeres embarazadas), aborto y amenaza de aborto³.

1.10. Diagnóstico

Los métodos de laboratorio para el diagnóstico y confirmación del dengue pueden ser directos o indirectos. Los métodos directos son aquellos en donde se busca la presencia de la partícula viral ya sea detectando el genoma o antígenos de superficie del virión.¹⁰ Los métodos indirectos se basan en la detección de anticuerpos y permiten identificar entre infecciones primarias y secundarias. En general, las pruebas con alta sensibilidad y especificidad (directas) requieren tecnologías más complejas y mayor experiencia en el desarrollo de la técnica, mientras que las pruebas rápidas (indirectas) pueden tener sensibilidad y especificidad comprometidas pero el resultado se obtiene de forma rápida³ (Figura 12).

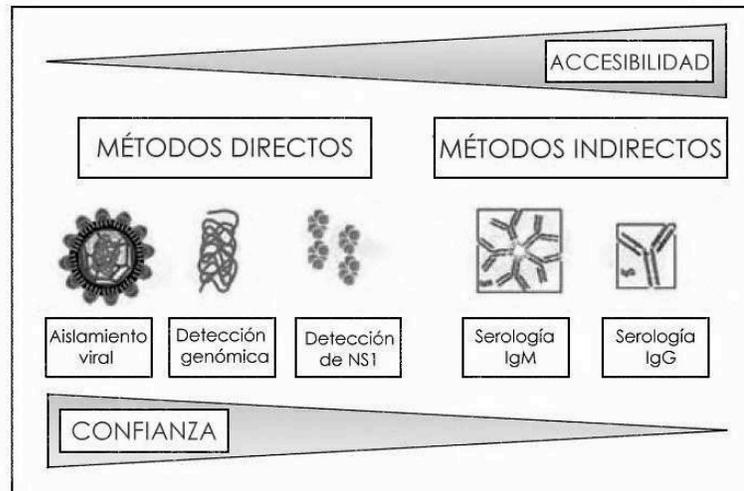


Figura 12. Esquema comparativo de los diferentes métodos de diagnóstico del dengue.

El método de diagnóstico depende de múltiples variables. La Tabla 1 muestra los métodos más empleados, siendo el momento de la toma de la muestra y el tipo de espécimen a recolectar los factores más importantes para la detección viral.

Método	Tiempo para obtención del resultado	Espécimen	Tiempo para colecta de muestra*	Observaciones
Aislamiento viral y serotificación	1-2 semanas	Sangre completa, suero, tejido	1-5 días	Aislamiento viral en cultivo celular: de uso exclusivo para investigación
Detección del genoma viral	1-2 días	Tejidos, sangre completa, suero, plasma	1-5 días	PCR o RT-qPCR
Detección de NS1	1 día	Suero	1-6 días	ELISA
Detección antigénica	> 1 día	Tejido para inmunohisto-química	No aplica	Tejido de biopsia o posmortem
IgM ELISA	1-2 días	Suero, plasma, sangre completa	> 5 días	ELISA
Test rápido IgM	30 minutos			
IgG con sueros pareados	7 días o más	Suero, plasma, sangre completa	Fase aguda: 1-5 días; Fase convalescente: > 15 días	Muestras pareadas en fase aguda y de convalescencia

* Después de la aparición de la sintomatología

Tabla 1. Comparación de las técnicas para el diagnóstico de dengue⁷

Los métodos serológicos tienen la ventaja de permitir la comparación entre muestras del mismo paciente obtenidas durante la fase aguda de la enfermedad contra muestras colectadas semanas o meses después. Un incremento de 4 veces en los niveles de IgG por ELISA o inhibición de la hemaglutinación indica una infección aguda o reciente. Sin embargo, el esperar para la obtención del suero de un paciente convalesciente no es útil para el diagnóstico y el manejo clínico y sólo es útil para la realización de análisis retrospectivos.

El ensayo de neutralización por reducción en placas se ha empleado para el desarrollo de las vacunas contra dengue, en estudios seroepidemiológicos y de patogenicidad. Actualmente, es considerado el método “gold standard” para la caracterización y cuantificación de los niveles de anticuerpos neutralizantes anti-DENV . Existen diversas variaciones del procedimiento por lo cual hasta el momento no existe estandarización de la técnica entre laboratorios. Además, se requiere de personal capacitado y de un laboratorio especializado para cultivo celular, lo cual hace esta técnica difícil de implementar de forma rutinaria⁷³.

Nuevas estrategias se han desarrollado con el paso del tiempo, como los inmunoensayos basados en microesferas, microarreglos y técnicas basadas en inmunoluminiscencia.⁷⁴ Sin embargo, no se encuentran disponibles en el ámbito clínico^{75,76}.

1.11. Tratamiento

Actualmente no existe un tratamiento específico para la infección por el virus del dengue. El manejo clínico del paciente requiere el control de la sintomatología presente, con estrategias que pueden ir desde el aumento en la ingesta de líquidos hasta la hospitalización. La admisión del paciente en el hospital es dependiente de la presencia de señales de alarma.

No se deben administrar antiinflamatorios no esteroideos (AINES) para evitar la evolución hacia cuadros hemorrágicos. Durante la fase de recuperación la restitución de líquidos debe detenerse para prevenir la sobrecarga de fluidos³.

Lo más importante es el reconocimiento temprano de los signos y síntomas de alarma para tratar oportunamente a los pacientes en fase crítica y con ello evitar desenlaces fatales.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes directos

Una de las características de la infección con DENV, es la alta variabilidad en la presentación del cuadro clínico. No todos los pacientes presentan una infección sintomática, algunos cursan con un cuadro febril autolimitado y otros evolucionan a cuadros severos que pueden culminar con la muerte del sujeto . Diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de entender la patogénesis de la infección, encontrando que es un proceso multifactorial donde el hospedero juega un rol primordial en la presentación del cuadro clínico.

En la actualidad contamos con una vacuna contra el DENV poco efectiva y no existen antivirales específicos, por lo que nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en conocer los mecanismos implicados en la replicación del DENV (serotipos1-4) que circulan en nuestro entorno y a su vez como es que las moléculas implicadas en dichos mecanismos influyen en la presentación clínica; todo lo anterior con la finalidad de fungir como marcadores moleculares de severidad e incluso como blancos terapéuticos antivirales .

A nivel molecular , aunque aún se desconocen en su conjunto los mecanismos que provocan el aumento de la permeabilidad vascular, se acepta el papel determinante de la tormenta de citocinas , esto demostrado en el estudio de Becerra y colaboradores en el cual se describen distintas citocinas cuyos niveles séricos pueden detectarse desde etapas tempranas de la enfermedad ⁷⁷ .

Uno de los mecanismos hipotéticos que explican la tormenta de citocinas es la reactividad cruzada de linfocitos T de memoria y el incremento de la infección de monocitos mediada por reactividad cruzada de anticuerpos adquiridos durante infecciones previas por distintos serotipos ^{78,79}. A pesar de lo anterior, esta hipótesis falla en explicar el cuadro clínico severo en pacientes con infección primaria por dengue ^{80,81}

2.2. Biomarcadores de severidad

Por tanto, como ya se mencionó, debido a que no se cuenta con un tratamiento ni profilaxis para la infección, en el ámbito clínico además de identificar los datos de alarma es preponderante contar con métodos de identificación viral de fácil acceso a la comunidad y biomarcadores de progreso a infección grave. En relación a los biomarcadores, se ha hecho un esfuerzo para identificar moléculas que permitan diferenciar entre infecciones no complicadas de las formas más severas. Se han identificado una amplia diversidad de citocinas, agonistas endoteliales o moléculas endoteliales solubles, sin embargo; existen discrepancias entre los estudios entre las cuales se incluyen: la clasificación clínica de los pacientes, la alta heterogeneidad entre las características de los mismos, así como variabilidad en las técnicas y los marcadores investigados, por lo que hasta el momento ninguna de las moléculas ha sido empleada como biomarcador ⁸²⁻⁸⁷.

A la par, recientes estudios de transcriptómica han tratado de definir los genes que se sobreexpresan o subexpresan en cada una de las etapas de la infección por dengue (principalmente genes de la respuesta inmune innata, de la respuesta de interferón, de apoptosis) en diferentes cohortes de pacientes de distintas regiones geográficas (en su mayoría del Sureste de Asia). En términos generales, la mayoría de estos estudios han reportado la sobreexpresión de genes del sistema inmunitario innato en los primeros días de la infección ⁸⁸⁻⁹⁰.

En este sentido, se puede inferir que la base inmunológica de cada individuo determinará el curso clínico de la enfermedad. Siendo el sistema inmune innato el principal elemento en la respuesta inicial a la infección, el cual tiene como efector principal el sistema fagocítico-mononuclear (SFM).

2.3.Sistema monocítico-macrófago como orquestador de la respuesta inmune innata ante la infección por DENV

El sistema monocítico-macrófago esta constituido por los monocitos circulantes y los macrófagos tisulares. Los promonocitos de la médula ósea, al madurar salen de ella, diferenciándose en monocitos circulantes, que al cabo de unas 8 horas emigran a distintos tejidos, donde se convierten en macrófagos.

Las células dendríticas, monocitos y macrófagos son un grupo heterogéneo de células derivadas de la médula ósea , son blancos de la infección por el DENV y participan en la diseminación del mismo. Sin embargo, los monocitos son los principales efectores en la respuesta inicial a la infección, son los leucocitos de mayor tamaño, llegando a medir 18 μm y representan del 4 al 8 % de los leucocitos totales en la sangre⁹¹.

Los monocitos infectados por DENV producen IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α y se han correlacionado con la producción máxima de virus. Sun y colaboradores demostraron en cultivo *in vitro* de monocitos, que la infección por dengue por el mecanismo de amplificación dependiente de anticuerpos (ADE: antibody dependent enhancement) induce la producción de IFN- α ,TNF- α e IL-10 ; así como la sobrerregulación de marcadores coestimulados CD40 y CD86 ⁹². *In vivo* , durante la etapa aguda de fiebre por dengue, se incrementa el número de monocitos CD14⁺ que expresan la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1),TLR2,TLR4 y CD16 ⁹³.

Existen dos subtipos principales de monocitos , $CD14^- / CD16^+$ y $CD14^+ / CD16^+$, los cuales muestran distinto fenotipo y función, siendo los $CD14^+ / CD16^+$ aquellos que expresan mayor actividad proinflamatoria e incrementan durante diversos procesos infecciosos. Aún no se define bien porque este subgrupo esta incrementado en pacientes con fiebre por dengue y no en los que presentan dengue severo⁹⁴.

2.4.Oxido nítrico sintasa inducible como moduladora de la respuesta al estrés oxidativo ante la infección por DENV

Esta demostrado que la infección por DENV induce el estrés oxidativo en humanos y a la vez esta respuesta controla los programas apoptóticos y antivirales en células dendríticas infectadas por DENV⁹⁵⁻⁹⁷.

Las células del sistema monocítico macrófago generan óxido nítrico y citocinas proinflamatorias, que en conjunto participan en la disfunción endotelial y extravasación vascular⁸⁶. La respuesta de estrés oxidativo mediada por estas células del sistema inmunitario esta regulada por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, NOS2).

La iNOS es una hemoproteína y una de las tres isoformas de óxido nítrico sintasas humanas. Es la proteína encargada de catalizar la oxidación de L-arginina a L-citrulina y óxido nítrico(NO). Para la síntesis de NO, además de la L-arginina como sustrato, se requiere de la presencia de calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (TBH) y de nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH). Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y puede ser inhibida por derivados estructurales de dicho aminoácido: la N-mono-metil-L-arginina (LNMMMA), la N-nitro-L-arginina metiléster (LNAME) y otros⁹⁸. Cuando la CaM no se encuentra unida a la enzima, los electrones donados por el NADPH no fluyen desde el dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa y son aceptados por el

citocromo C y otros aceptores de electrones. En presencia de la calmodulina los electrones donados por el NADPH son transportados por el FAD y por FMN hacia el grupo hemo. La L-arginina se convierte en N-hidroxialanina y luego en NO y L-citrulina⁹⁹. En estas condiciones, la NOS produce una mezcla de aniones superóxido (O) y óxido nítrico que reacciona con peroxinitritos (ONCO) y como resultado final tiene lugar la citotoxicidad¹⁰⁰. Los peroxinitritos inducen estrés nitrosativo, lo que conlleva la generación de lípidos nitrados, nitrotioles, nitrotriptofanos y nitrotirosinas.

Los productos finales del NO *in vivo* son: nitrito y nitrato. El mejor índice de óxido nítrico total es la suma de ambos productos, debido a que la proporción relativa de cada uno de ellos dentro de una misma muestra resulta variable. Estos pueden ser medidos por espectrometría¹⁰¹.

La expresión de iNOS puede ser inducida por diversos estímulos como productos microbianos y citocinas. Los receptores tipo Toll (TLRs) se expresan principalmente en células inmunes y reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs). La activación de TLRs induce la señalización intracelular vía moléculas MyD88 (myeloid differentiation factor 88) e IRAK (interleukin 1 receptor associated kinase), la cual es la misma vía de señalización involucrada en IL-1R o vía TRIF (TIR domain containing adapter inducing IFN- γ). Estas vías convergen en la activación del factor de transcripción NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), que regula la transcripción de iNOS¹⁰².

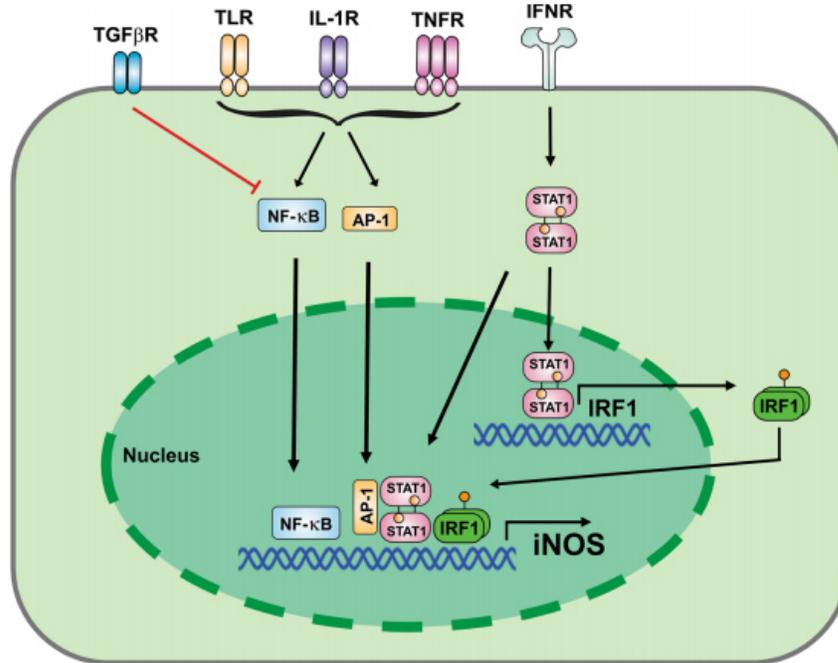


Figura 13. Vías de inducción de iNOS por los agonistas TLR y citocinas

Las citocinas como IL-1b también activa la vía de señalización MyD88 e IRAK; y TNF-α también induce la producción de iNOS activando NF-κB¹⁰³. El IFN-γ es también un inductor de iNOS y participa en una de las vías principales de respuesta a la infección por DENV, en la cual STAT1 fosforilado puede unirse directamente al promotor de iNOS o bien indirectamente promoviendo la síntesis del factor de transcripción IRF1 que regula positivamente la transcripción de iNOS¹⁰⁴. (Figura 13)

Por el contrario, la IL-4, IL-5, IL-10 y TGF-β (transforming growth factor) inhiben la expresión de iNOS y estimulan la vía de la arginasa. La arginasa compite con iNOS por la L-arginina, hidrolizándola en L-ornitina y urea; y por tanto, colaborando en la respuesta antiinflamatoria¹⁰⁵. Estos dos tipos de rutas de hidrólisis de la arginina permiten diferenciar a dos tipos de macrófagos (monocitos tisulares). Los macrófagos M1 o clásicos, activados por la vía TLR y tienen actividad proinflamatoria y antimicrobiana, además; secretan altas cantidades de NO. Los macrófagos M2 expresan altos niveles

de arginasa y por tanto, tienen actividad antiinflamatoria, siendo importantes en la reparación y remodelación tisular¹⁰⁵. (Figura 14)

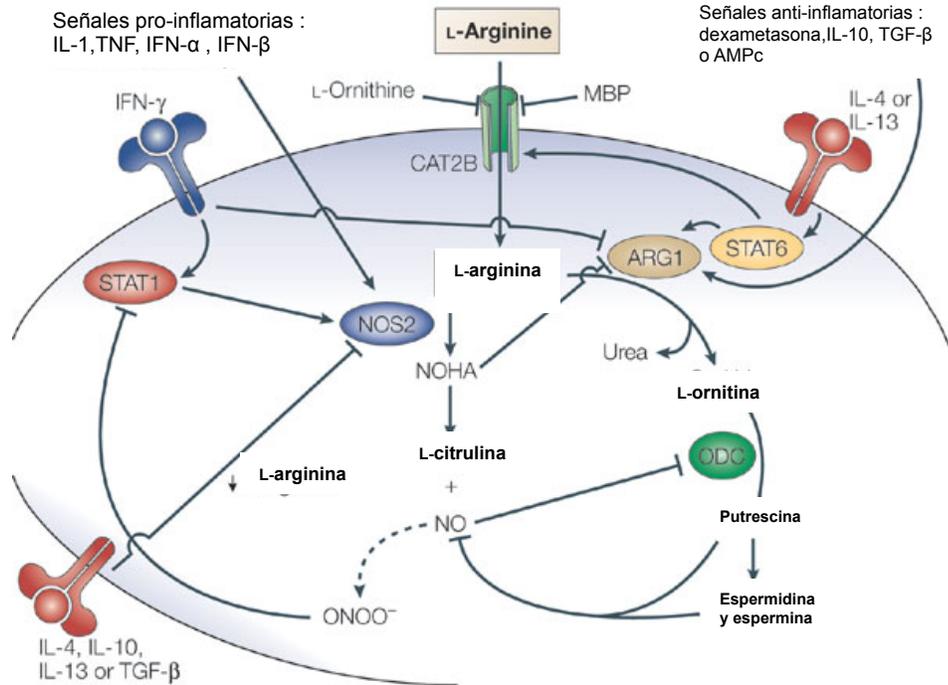


Figura 14 . Vías de activación de la actividad anti-inflamatoria y pro-inflamatoria de macrófagos M1 y M2

Como ya se mencionó, el producto principal de la vía de estrés oxidativo es el óxido nítrico (NO). Este es un gas soluble, altamente lábil y uno de los componentes más importantes del sistema inmune innato producido por una gran variedad de células inmunes (dendríticas, natural killer, monocitos/macrófagos, eosinófilos y neutrófilos), células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos y queratinocitos^{106,107}. Dentro de sus funciones más importantes es la relajación del endotelio vascular, actividad microbicida y antitumoral, inhibición de agregación plaquetaria, neurotransmisión en el sistema nervioso central, quimiotaxis y citotoxicidad. Por otra parte, elevadas concentraciones de NO están involucradas en ciertas situaciones fisiopatológicas como la hipotensión que acompaña al shock séptico y la respuesta inflamatoria inducida por daño tisular¹⁰⁸.

En resumen, la expresión de iNOS es el resultado de diversas respuestas inflamatorias difusas o localizadas resultantes de la infección o daño tisular. La respuesta inflamatoria es parte de una respuesta adaptativa, de manera que la expresión de iNOS es beneficiosa, sin embargo; cuando la expresión de iNOS es parte de una inflamación anormal, puede ser perjudicial (ejemplo, enfermedades autoinmunes). Como aspectos beneficiosos puede destacarse que la expresión de iNOS resulta en la inhibición del crecimiento de patógenos desde microorganismos hasta virus; además parece proteger a los tejidos del daño en respuestas agudas inflamatorias sistémicas como la sepsis. La vasodilatación resultante de la expresión de iNOS mejora la perfusión durante la sepsis, pero si ésta es excesiva la hipotensión resultante puede llegar a ser refractaria y por lo tanto, letal.

El papel de iNOS ha sido mejor estudiado como agente antimicrobiano ; sin embargo, existe evidencia paradójica, de su papel como efector antiviral. La tuberculosis es una de las infecciones comúnmente asociadas con un incremento significativo en la expresión de iNOS¹⁰⁹. Además su expresión se ha demostrado asociada a la resistencia a distintos microorganismos como las micobacterias, los hongos *Histoplasma capsulatum* y *Criptococcus neoformans* y protozoos como *Leishmania major*¹¹⁰.

En infecciones virales, la expresión de iNOS parece ser regulada indirectamente por IFN- γ o bien, por una vía directa (replicación viral) como ocurre en la infección causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1)¹¹¹⁻¹¹³. La actividad antiviral de NO ha sido previamente evidenciada en algunos ensayos *in vitro* en los cuales se observa un descenso en la severidad clínica de ciertas infecciones virales incluyendo al virus del herpes simple (VHS); también se ha demostrado supresión de la replicación de coxsackievirus al inactivarse la cistein proteasa viral por S-nitrosilación generada por la producción NO; además, existe evidencia de la inactivación del virus de la influenza en presencia de peroxinitritos¹¹⁴.

2.5 Asociación de la respuesta del sistema inmune innato y estrés oxidativo en la infección por dengue bajo el contexto de una enfermedad crónico degenerativa como DM2

Kobayashi y colaboradores reportaron que alteraciones en el sistema inmunitario influyen en el metabolismo oxidativo y viceversa¹⁰⁶. En este sentido, se ha demostrado un status de inmunosupresión ante agentes infecciosos en neonatos y adultos¹¹⁵⁻¹¹⁷; esto demostrado en un estudio reciente de Valero y colaboradores en el cual evaluaron la respuesta oxidativa dependiente de la edad en cultivo de monocitos de neonatos, ancianos y adultos que fueron infectados con los 4 serotipos del DENV, encontrando una respuesta oxidante/antioxidante reducida tanto en monocitos de neonatos como de ancianos¹¹⁸.

Con lo anterior ,podemos inferir que la respuesta de estrés oxidativo variará dependiendo de la base inmunológica de cada individuo teniendo en cuenta comorbilidades , como enfermedades crónico degenerativas, que afectan la respuesta del sistema inmune innato. Un ejemplo es la diabetes mellitus tipo 2 , la cual ha sido asociada a un incremento en la susceptibilidad a infecciones como tuberculosis; dicha susceptibilidad a micobacterias se ha atribuido a las alteraciones en el sistema inmune inato con incremento en la expresión de CCR2 (impide el tráfico de monocitos al pulmón) ; disminución de células CD11b (asociado a mayor edad) y sobreexpresión de RAGE (receptor for advanced glycated endproducts, el cual es un receptor de PAMPs que activa vías proinflamatorias). Por lo que concluyen, que los monocitos de diabéticos tipo 2 , obesos y de mayor edad tendrán mayor alteración viéndose afectada la actividad antituberculosa¹¹⁹.

En este sentido, es importante investigar la respuesta del sistema inmunitario innato en pacientes con infecciones virales con comorbilidad con enfermedad metabólica crónica .

La diabetes mellitus es proyectada por la OMS como la 7^a causa de muerte para el 2030, siendo la tipo 2 la más frecuente y el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La DM2 es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, su etiología es multifactorial y se caracteriza por niveles elevados de glucosa en plasma y alteración en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas como resultado del defecto de la secreción de insulina, acción de la insulina o ambas. La resistencia a la insulina se ha relacionado principalmente con obesidad y en ambas se ha documentado un estado inflamatorio crónico de baja intensidad^{120,121}.

En la obesidad, la acumulación excesiva de triglicéridos conduce a una hipertrofia de los adipocitos y a una desregulación en la secreción de adipocinas, tales como: adiponectina, resistina, leptina, MCP-1, IL-8, IL-6, IL-1, TNF- α e IL-10. Esto conduce a una infiltración de numerosas células del sistema inmune al tejido adiposo, así como un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias. Estas alteraciones del sistema inmune pueden participar en la inducción de la resistencia a la insulina por la inhibición en las proteínas de sustrato del receptor de insulina o inducir la lipólisis con posterior liberación de ácidos grasos saturados de los adipocitos. De esta manera se desencadena un proceso que activa a los macrófagos a través de TLR2 y TLR4^{120,121}.

Recientes evidencias demuestran la participación de las células del sistema inmune tanto innato como adaptativo en la patología de la DM2 y la obesidad. Las células más estudiadas involucradas en el desarrollo de la inflamación del tejido adiposo son los macrófagos del tejido adiposo, los cuales se infiltran en procesos obesogénicos. Estas células se han clasificado en dos categorías basadas principalmente en el perfil de citocinas que secretan. Los macrófagos M1 (activados clásicamente) producen citocinas como TNF- α e IL-6. En contraste, con los macrófagos M2 (activados alternativamente)

secretan citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β . Las citocinas estimuladoras de macrófagos M1 son IFN- γ y lipopolisacárido (LPS), mientras que de los macrófagos M2 son IL-4 IL-13. En la obesidad, se ha encontrado un incremento importante de los macrófagos M1 en el tejido adiposo; esto, aunado a una reducción en los niveles de moléculas antiinflamatorias como IL-10 y arginasa, con un consecuente incremento de citocinas proinflamatorias como TNF- α , que ha sido ampliamente descrito como factor proinflamatorio en obesidad, resistencia a la insulina y DM2. El mecanismo por el cual se incrementan los macrófagos M1 no ha sido descrito completamente, pero se ha propuesto que el aumento de peso induce inflamación local y producción de citocinas que promueven el reclutamiento de monocitos proinflamatorios circulantes los cuales en el tejido adiposo se diferencian a macrófagos M1 y su acumulación produce un desbalance entre las poblaciones de M1 y M2. Los macrófagos M1 inducen un estado inflamatorio y de resistencia a la insulina a través de la inhibición de la señalización de la insulina, producido indirectamente por las citocinas TNF- α e IL-6¹²², mientras que los macrófagos M2 protegen de la resistencia a la insulina a través de un mecanismo dependiente de IL-10; a este respecto se ha descrito que en adipocitos 3T3-L1, la IL-10 bloquea la sobreexpresión de genes proinflamatorios inducidos por TNF- α , incluyendo IL-6 y RANTES (Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)¹²³. Por otro lado, la IL-10 también reduce la expresión de MCP-1 y protege contra la resistencia a la insulina en el hígado¹²⁴.

La acumulación de macrófagos en el tejido adiposo blanco (WAT) parece estar relacionada con dos procesos. En primer lugar, los adipocitos y macrófagos residentes en el tejido adiposo de ratas obesas secretan citocinas como MCP-1 que promueven el reclutamiento de monocitos circulantes Ly6C⁺¹²⁵, así como citocinas implicadas en la acumulación de macrófagos e intolerancia a la glucosa como LTB4 (leucotrieno B4), MIP (macrophage inflammatory protein), MIF (macrophage migration inhibitory

factor) y MCP3 (monocyte chemotactic protein 3)¹²⁶. Además de la secreción de citocinas en el tejido adiposo de ratas obesas, las células CD11c⁺ (macrófagos, células dendríticas y neutrófilos) producen IL1b promoviendo la mielopoyesis perpetuando la inflamación en el tejido adiposo¹²⁷. En segundo lugar, los macrófagos tienen una alta capacidad de proliferación; esto demostrado por Jenkins y colaboradores, quienes demostraron que la IL-4 es un fuerte promotor de la proliferación de macrófagos y mantiene la población de M2¹²⁸.

Estudios en sujetos obesos, han encontrado acumulación de macrófagos en tejido adiposo¹²⁹ y de macrófagos CD11c asociados a resistencia a la insulina¹³⁰.

A pesar de las evidencias presentadas de la participación de macrófagos en el desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina y en consecuencia de diabetes mellitus, existen inconsistencias en los resultados de las funciones de los dos fenotipos de macrófagos en tejido adiposo (M1 y M2) en modelos murino y humano. Sin embargo, en términos generales, los estudios más recientes sugieren los efectos positivos de la subpoblación M2 en la obesidad y DM2^{131,132}.

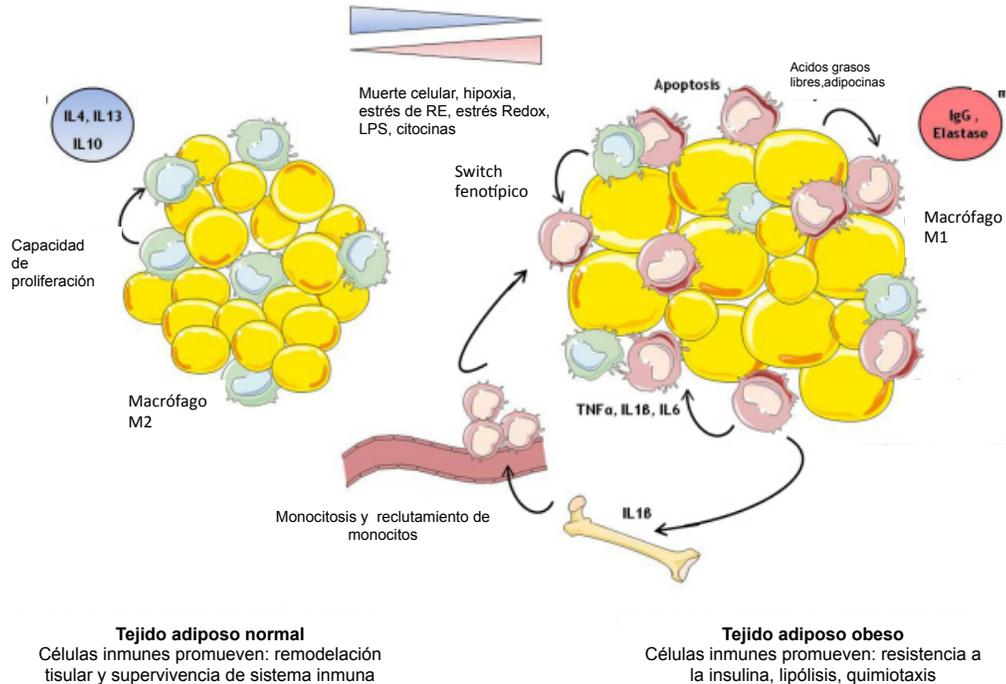


Figura 15. Proceso inflamatorio crónico de baja intensidad en DM2

En resumen, se puede inferir que la diabetes mellitus comparte con la presentación clínica severa de dengue las alteraciones en la respuesta del sistema inmune innato como la disfunción del estado proinflamatorio .

Diversos investigadores en el campo del estudio de la infección por DENV, han planteado la posibilidad de que la diabetes mellitus sea un factor de riesgo para el desarrollo de una presentación clínica severa de dengue. Htun y colaboradores publicaron un metaanálisis de pacientes diabéticos infectados por DENV; en el cual se incluyeron solo 10 estudios de los 32 estudios arrojados inicialmente por la base de datos Pubmed. De los incluidos en el análisis, cinco estudios fueron casos y controles (únicamente un estudio fue basado en dos poblaciones en Brasil)comparando prevalencia de DM en personas con infección aguda sin o con datos de alarma; y los otros 5 estudios fueron serie de casos en los cuales se caracterizaba clínicamente a los pacientes diabéticos con manifestaciones clínicas severas¹³³. Sin embargo, existen pocos estudios que permitan elucidar una

vía de señalización implicada en la probable susceptibilidad a desarrollo de dengue grave en pacientes diabéticos. Podemos citar algunos estudios como el de Lee y colaboradores en el cual se infectaron células mononucleares de diabéticos con DENV encontrando un incremento en la producción de IL-4 y de IL-10, IL-4 y GM-CSF (factor estimulador de colonia de granulocitos-macrofagos) al primer y tercer día postinfección, respectivamente¹³⁴.

Limonta y colaboradores reportaron los hallazgos de autopsias realizadas a pacientes que fallecieron por dengue severo y choque por dengue; dentro de las cuales se encontró , a diferencia de las otras muertes, un paciente diabético con ascitis, alteración en la serosa intestinal y datos de apoptosis en las células endoteliales de la microvasculatura¹³⁵. Bajo esta premisa, se han sugerido que el daño en la microvasculatura de los pacientes diabéticos puede incrementar el riesgo de extravasación de líquidos en la infección por dengue; por otro lado, se ha sugerido que la hiperglicemia genera hipovolemia lo cual eleva el hematocrito ; este es considerado un parámetro de alarma y puede clasificar a los diabéticos como dengue grave sin tener evidencia clínica de extravasación de líquidos, por tanto, es muy importante determinar los lineamientos de administración de líquidos en pacientes con comorbilidades vasculares, pero hasta el momento no existen estudios que definan el tratamiento en pacientes con comorbilidades como DM2.

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN

La infección por dengue es endémica en nuestro país, siendo el espectro clínico variado desde una infección asintomática hasta un cuadro clínico severo con choque y muerte. Esta variabilidad depende en parte de la base genética individual que influye en la respuesta a la infección ; en particular en la respuesta del sistema inmune innato, cuyas células son los principales blancos del virus.

En los últimos años , se han publicado estudios que han asociado la infección severa por dengue con algunas comorbilidades como asma, hipertensión arterial, alergias y DM2. Siendo de importancia que esta última enfermedad afecta a 1 de cada 10 mexicanos .

La DM2 y la infección por DENV son dos patologías de importancia en salud pública ; siendo un binomio de presentación clínica común en países en vías de desarrollo. Por lo que es importante evaluar los efectos moleculares de la infección sobre el contexto de una enfermedad crónico degenerativa que puedan estar implicados en la resolución de la infección y le confieran a los pacientes susceptibilidad de progresión a una presentación clínica severa de dengue.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la regulación de la expresión de la enzima iNOS en células mononucleares, de sujetos sanos y pacientes con diagnóstico de DM2, infectadas con DENV 2 prototipo y de aislados virales de pacientes.

4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* la capacidad infectiva del DENV2 prototipo y de aislados virales de pacientes en células mononucleares de sujetos sanos.
1. Investigar la existencia de una regulación transcripcional de iNOS en células mononucleares de sujetos sanos infectadas con DENV 2 prototipo y de aislados virales de pacientes.
2. Comparar la expresión de iNOS en células mononucleares aisladas de pacientes con DM2 y sujetos sanos infectadas con DENV 2 prototipo y cepas virales aisladas de pacientes.
3. Cuantificar y comparar los niveles de la enzima iNOS en células mononucleares aisladas de voluntarios sanos y pacientes con DM2 infectadas con distintas cepas virales .
4. Evaluar la regulación de la expresión de iNOS en una línea celular establecida, empleando células Huh7 infectadas con DENV2 para determinar si el efecto es tejido-específico

CAPÍTULO V

MATERIALES

5.1. Lugar de realización

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.2. Reactivos

Obtención de sangre periférica

- Heparina inyectable 1000 UI/mL . PiSA.

Aislamiento de células mononucleares

- Histopaque 1077 . Sigma Aldrich. Cat. 10771
- Solución buffer de fosfatos (PBS) 1X

Cultivo celular

- El cultivo primario de células mononucleares se llevó a cabo en una campana de flujo laminar BSL-2 con filtros HEPA (Marca NUAIRE). Para el mantenimiento del cultivo primario se utilizó medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Caisson) , L- Glutamina (200 mM; 100X), suero bovino fetal (SBF), solución de antibiótico penicilina-estreptomicina (100 UI/mL de penicilina G de sodio y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina) y solución de aminoácidos no esenciales (10 mM; 100X), todos de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, N.Y.).

- El cultivo de la línea celular C6/36 se realizó en una campana de flujo laminar BSL-2 con filtros HEPA (Marca Lumistell). Para dar mantenimiento a la línea celular se empleó medio de cultivo Leibovitz (L-15), solución de aminoácidos no esenciales para medio mínimo esencial de Eagle (100X), solución de antibiótico-antimicótico (100X; Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B) y bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, todos de la marca In vitro, S.A. (México, D.F.). Para suplementar el medio se utilizó suero bovino fetal (SBF) de la marca Hyclone.
- Los procedimientos de cultivo celular para la línea Huh7 parental se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar BSL-2 con filtros HEPA (Marca NUAIRE). Para el mantenimiento de la línea celular Huh7 se utilizó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced-DMEM), L- Glutamina (200 mM; 100X), suero bovino fetal (SBF), Tripsina-EDTA (0.25%), solución de antibiótico penicilina-estreptomicina (100 UI/mL de penicilina G de sodio y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina) y solución de aminoácidos no esenciales (10 mM; 100X), todos de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, N.Y.).
- Para los lavados de las células se empleó una solución buffer de fosfatos (PBS) 1X.
- Para la congelación de líneas celulares se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich).

Recuento celular

- Para la caracterización de células mononucleares se empleó colorante Giemsa (CTR Scientific 06468)
- Para realizar el recuento celular se empleó el colorante vital azul tripano 0.4% (GIBCO-BRL, Grand Island, N.Y.) y líquido de Türk.

Infección viral de cultivos celulares.

- Para la infección de células C6/36, CMN y Huh7 parental con DENV se emplearon los mismos reactivos descritos en el apartado de cultivo celular.

Ensayo de viabilidad celular

- Kit Cell Proliferation I (MTT) (Roche®)

Extracción de RNA

- Para la extracción de RNA de cultivo primario de células mononucleares se empleó el kit de extracción RNAeasy Mini kit (Qiagen® Catalog No. 74106) y β -mercaptoetanol.
- Para la extracción de RNA total a partir de células C6/36 y Huh7 parental se empleó el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), cloroformo (Fischer Scientific, New Jersey, USA), Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania), isopropanol (Fischer Scientific, New Jersey, USA) e RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura tratada con el inhibidor de RNAsas Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma Aldrich).

Retrotranscripción (RT)

- Para la síntesis del DNA complementario a partir de RNA total se utilizó la enzima RT-MMLV, Buffer RT 5X, Random primers, Ditiotreitól (DTT), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) e inhibidor de RNAsas todos de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- La amplificación del cDNA se realizó utilizando la enzima Taq DNA Polymerase recombinante, buffer 10X para PCR sin Mg⁺² y cloruro de magnesio 50 mM de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- Los primers utilizados para serotipificación de aislados virales de DENV (D1, D2, TS1, TS2, TS3 y TS4) fueron de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- Los primers de iNOS fueron de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
- Los primers empleados para identificación de RPS18 de la compañía BioCorp.

Inmunohistoquímica.

- Kit ImmPACT™ DAB *EqV* Peroxidase substrate (Vector Laboratories®) utilizando como anticuerpo primario el Anti-Flavivirus Group Antigen Antibody, clone D1-4G2-4-15 (EMD Millipore Corporation, Germany) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Ensayo de inmunofluorescencia

- Kit Human Total iNOS cell-Based ELISA (R&D Systems®) siguiendo las indicaciones del proveedor.

5.3. Materiales

Uso general

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.
- Tubos falcon de 50 mL. Marca Corning. Cat. 430291.
- Puntillas desechables blancas (10 µL). para micropipeta Marca Axygen.

- Puntillas desechables amarillas (200 μ L) para micropipeta. Marca Axygen.
- Puntillas azules (1 mL) para micropipeta. Marca Axygen.

Obtención de sangre periférica

- Aguja 0.8 x 38mm . BD Vacutainer PrecisionGlide. Ref 360213
- Aguja 0.7 x 30 mm. Terumo 0197
- Jeringas sin aguja de 20 mL.Terumo SS+20LM
- Tubos Vacutainer 6 mL . BD Vacutainer. Ref. 368175

Cultivo celular

- Botellas para cultivo celular de 25 cm².
 - a) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
 - b) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.
- Botellas para cultivo celular de 75 cm².
 - a) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430641.
 - b) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430199.
- Raspadores celulares de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Pipeta pasteur. Marca Corning. Cat. 101001440.
- Placas para cultivo celular de 6 pozos. Marca Corning. Cat. 3506.
- Placas para cultivo celular de 24 pozos. Marca Corning. Cat. 3526.
- Placas para cultivo celular de 96 pozos . Marca Corning . Cat.3527
- Placas de cultivo celular de 96 pozos negras con fondo claro . Marca Corning .Cat. 3603

Congelación de células

- Crioviales de 2 mL. Marca Corning. Cat. 430659.

Infección viral de cultivos celulares

- Placas para cultivo celular de 6 pozos. Marca Corning. Cat. 3506.
- Placas para cultivo celular de 24 pozos. Marca Corning. Cat. 3526.

- Placas para cultivo celular de 96 pozos fondo claro. Marca Corning. Cat. 3527
- Placas de cultivo celular de 96 pozos negras con fondo claro . Marca Corning .Cat. 3603

Extracción de RNA total

- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Microtubos de 2 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-200.

Técnicas moleculares (RT, PCR, qPCR)

- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.
- Tubos ópticos para qPCR (Tiras de 8 tubos) Applied Biosystems. Part. 4323032.
- Tapas ópticas para tubos de qPCR. Applied Biosystems. Part. 4316567.
- Placas ópticas de 96 pozos (0.1mL) MicroAmp . Applied Biosystems. Part. 4346906
- Agarosa Ultrapure. Marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

5.4. Equipo

Equipo médico

- Balanza más monitor de grasa corporal . Tanita. Modelo UM-081
- Glucómetro Ultra Mini. OneTouch.
- Cinta métrica

Uso general

- Centrífuga clínica. Marca Thermo Scientific. Modelo IEC-CLR30R.
- Centrífuga refrigerada. Marca Heraeus. Modelo Biofuge Primo R.
- Centrífuga . Hermle Labnet. Modelo Z 206 A
- Microcentrífuga. Marca Eppendorf. Modelo 5415D

- Microscopio invertido. Marca Olympus. Modelo CKX41
- Microscopio invertido. Marca Leica. Modelo DFC295
- Ultracongelador Revco. Marca NUAIRE. Modelo UN-6617A36.
- Pipetor Pipet-Aid XP. Marca Drummond. Modelo 4-000-101.
- Baño maría. Marca PRECISION 180.
- Micropipetas.
- Vórtex. Marca Scientific Industries. Modelo Vortex Genie 2 G-560.

Cultivo celular e infección de cultivos celulares

- Campana de flujo laminar con filtros HEPA. Class II type A2. Marca NU AIRE. Modelo NU-425-400.
- Incubadora con fuente de CO₂. Marca NUAIRE. Modelo UN-4750.
- Incubadora sin fuente de CO₂. Marca Labnet Microincubator. Modelo I5110.
- Bomba de presión y vacío. Marca Daigger. Cat. EF2090G.
- Cámara de Neubauer. SUPERIOR
- Cubreobjetos 22 x 22mm. Corning. Cat. 2865

Técnicas moleculares (extracción de RNA total, RT, PCR, qPCR)

- Campana de PCR. Marca CBS Scientific Co. Modelo P-036-02.
- Termociclador para retrotranscripción. Marca Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700.
- Termociclador para PCR punto final: Marca Eppendorf. Modelo Mastercycler gradient.
- Termocicladores de tiempo real: Marca Applied Biosystems. Modelo ABI PRISM 7500 fast.
- Micropipetas automáticas de 10 y 200 µL. Marca Rainin.
- Chemidoc XRS . Biorad.
- Fotodocumentador UVP Mini Darkroom. Marca UVP. (Cambridge, UK) Modelo M-26E.

- Espectrofotómetro NanoDrop 2000. Thermo Scientific.
- Cámara de electroforesis. Marca Owl. Modelo B1A.
- Fuente de poder. Marca Bio Rad. Modelo Power Pac 100.
- Horno de micro-ondas. Marca Panasonic.

Ensayo de viabilidad celular y de inmunofluorescencia

- Espectrofotómetro. BioTek. Modelo Elx800
- Espectrofotómetro GloMax™ Discover System. Promega

5.5. Material biológico

5.5.1 Cultivo de CMN

Es un cultivo de monocitos y linfocitos de sangre periférica previamente aislados por gradiente de densidad (Método de Boyum)¹³⁶. Los monocitos son las células blanco inicial de la infección por DENV , son células adherentes y forman una bicapa; por tanto, para obtener un cultivo de monocitos es imperativo retirar el sobrenadante con los linfocitos no adheridos.

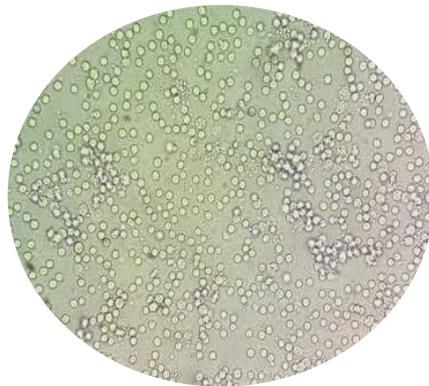


Figura 16. Fotomicrografía de monocapa de células mononucleares (20X)

5.5.2. Líneas celulares

A) Línea celular C6/36

La línea celular C6/36 es una clona obtenida de la línea original de *Aedes albopictus* establecida por Singh que presenta una alta sensibilidad a la infección por DENV¹³⁷. Algunas cepas de dengue son capaces de producir efecto citopático de tipo sincitial en estas células.

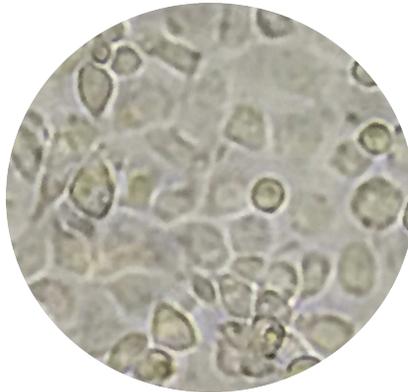


Figura 17. Fotomicrografía de una monocapa de células C6/36 (40X)

Se cultivan en medio MEM Earle o Leibovitz L-15 suplementado al 5-10% con suero bovino fetal y se incuban a temperatura ambiente (25-28 °C) sin requerimiento de atmósfera de CO₂ y en botellas de cultivo cerradas. Su subcultivo se realiza semanalmente agitando la botella de cultivo y permitiendo que el medio caiga de forma perpendicular a la monocapa celular (Figura 17), aunque también se pueden raspar con ayuda de un raspador de hule.

B) Línea celular Huh7 parental

Huh7 (JTC-39) es una línea celular adherente de hepatocitos diferenciados, derivados de hepatocarcinoma¹³⁸.

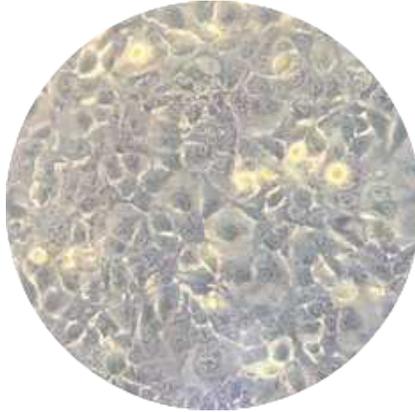


Figura 18. Fotomicrografía de una monocapa de células Huh7 parental (40X)

Las células se encuentran inmortalizadas y crecen en monocapas bidimensionales (Figura 18). Aunque pueden ser cultivadas en ausencia de suero bovino fetal, tradicionalmente se les cultiva con medio suplementado con 2 al 10% de SBF y se incuban a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂. Para su subcultivo se desprenden con tripsina-EDTA 0.25%.

5.5.3. Virus

La cepa de DENV prototipo empleada fue Nueva Guinea. Los aislados virales de pacientes se obtuvieron a partir de sueros virémicos cultivados de C6/36 y caracterizados molecularmente por RT-PCR con el protocolo de Lanciotti ; estos aislados de nuestro banco de virus correspondieron al serotipo DENV2. Los aislados virales de pacientes fueron identificados como No. 6870 y 17247.

CAPÍTULO VI

MÉTODOS

6.1. Estrategia general

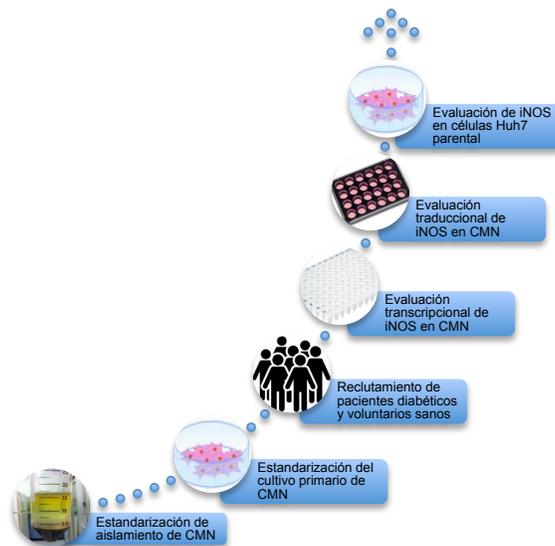


Figura 19. Estrategia general

6.2. Métodos

6.2.1. Aislamiento de células mononucleares (CMN) a partir de concentrados leucocitarios de donadores de sangre y de sangre periférica

A partir de 20 mL de sangre periférica heparinizada, se aislaron las CMN empleando el método de Boyum usando Ficoll-Hypaque (polisucrosadiatrizoato de sodio, densidad de 1.077 g/mL) y por centrifugación, se separaron las células sanguíneas por gradiente de densidad. Se recolectó la capa de CMN que se encuentra entre la fase de suero y ficoll-hypaque. Se realizaron dos lavados con PBS1X y el pellet se resuspendió en medio RPMI 1640 con SBF10%.

6.2.2 Cultivo primario de células mononucleares

Las CMN recién aisladas y resuspendidas en RPMI 1640 , se contaron en cámara de Neubauer empleando líquido de Türk (lisa los eritrocitos que pudieran no haberse separado) e inmediatamente se cultivaron en placas de 24 pozos (empleadas para extracción de RNA y ensayos de expresión génica) a una densidad de 1.2×10^6 células/pozo o en placas de 96 pozos (empleadas para ensayos de viabilidad celular e inmunofluorescencia) a una densidad de 2×10^5 células/pozo. Se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y posterior a 12 hrs o 18 hrs (CMN de concentrado leucocitario o sangre periférica, respectivamente) de adherencia , se retiró el medio para eliminar células no adheridas y se sustituyó con medio RPMI 1640 SBF10% o con medio de infección con SBF 7%.

6.2.3 Ensayo de viabilidad celular con MTT

Como parte de la estandarización del cultivo primario de CMN se determinó el tiempo de adherencia celular y actividad metabólica de CMN cultivadas en placas de 96 pozos (fondo claro) a las cuales se les evaluó la viabilidad celular empleando el Kit Cell Proliferation I (MTT) (Roche®) siguiendo las instrucciones del proveedor. En este método el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a formazán(insoluble). Esta reducción involucra a los cofactores NADH y NADPH. Los cristales de formazán quedan retenidos en las células y pueden ser liberados mediante la solubilización de las mismos resultando en una solución coloreada . De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, cambiando de coloración amarillo al morado. Esta reacción fue medida en un espectrofotómetro a 600nm¹³⁹ .

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular.

6.2.4. Cultivo de células C6/36

Las células C6/36 se mantuvieron en medio L-15, realizando el subcultivo cada semana en botellas de 25 cm² para la obtención de monocapas semiconfluentes. Se cultivaron en una incubadora seca sin fuente de CO₂, a una temperatura entre 26 a 28 °C. Las células se levantaron de sus botellas de cultivo por raspado con un scrapper.

6.2.5. Cultivo de células Huh7

Las células Huh7 se mantuvieron en medio de cultivo Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal, haciendo el subcultivo cada tres o cuatro días a la semana, al alcanzar los cultivos un 90% de confluencia. Se incubaron a 37°C bajo atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las células se levantaron de sus botellas de cultivo empleando tripsina a 37°C y después neutralizando la actividad de la enzima con una proporción 1:1 con medio Advanced DMEM con 2% de suero bovino fetal.

6.2.6. Infección de cultivos celulares con DENV.

Cultivo primario de células mononucleares: a las 12 hrs de adherencia (células aisladas de concentrados leucocitarios) ó 18 hrs de adherencia (células aisladas de sangre periférica) se retiró el medio de la monocapa y se sustituyó con medio RPMI 1640 con 7% SBF conteniendo DENV2 prototipo o aislados virales de pacientes , se incubó a 37°C por una hora para la adsorción de partículas virales. Posterior a este lapso se completó con medio de infección y se permitió la infección por 24 horas.

Líneas celulares: las monocapas semiconfluentes se lavaron con PBS1X, el cual después fue removido por aspiración. El medio de cultivo se sustituyó con medio para infección (L-15 2% SBF para la línea C6/36 y ADMEM 1% SBF para la línea Huh7). El volumen de medio colocado antes de depositar la alícuota viral fue de 2 mL, de tal forma que cubriera la monocapa celular. Después de colocar suavemente la alícuota del aislado viral infeccioso, se

homogenizó realizando movimientos circulares para distribuir las partículas virales en toda la superficie de cultivo.

Las células se incubaron a 37°C durante una hora para permitir la adsorción de las partículas virales. Se permitió la infección viral por 15 días aproximadamente para las células C6/36 (ver preparación de stock viral) y 48 hrs para ensayos en células Huh7 parental, manteniendo el cultivo a 25-27°C para la línea C6/36 y a 37°C con atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en el caso de la línea Huh7.

6.2.7. Preparación de stock viral

Los cultivos de C6/36 infectados con DENV se rasparon con ayuda de un scrapper. Una vez removido todo el material adherido a la superficie de la botella de cultivo, se realizaron alícuotas de 180 µl y se almacenaron a -80 °C.

6.2.8. Extracción de RNA total por el método de Chomcynski y Sacchi¹⁴⁰

La extracción de RNA tanto de aislados virales como de células Huh7 parental se realizó con el reactivo TRIzol (Ver Sección de Técnicas y Protocolos).

6.2.9 Extracción de RNA por columna

Para la extracción de RNA de CMN se empleó el kit de extracción RNAeasy Mini kit (Qiagen®) con dos modificaciones . Primera, se empleó frío el reactivo RLT y se aplicó directo a cada pozo (placa de 24 pozos) 150 µl del mismo. Segundo, el RNA obtenido se resuspendió en 20 µl de RNA free water (Ver Capítulo XI).

6.2.10. Retrotranscripción (RT-MMLV)

Una vez realizada la extracción del RNA total, este fue cuantificado mediante espectrometría y posteriormente sujeto a retrotranscripción utilizando la enzima MMLV. Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
Random primer 10X	1 μ L
RNA	5 μ L
Agua DEPC	6.5 μ L
Volumen total	11.5 μ L

Tabla 2. Condiciones de reacción para la retrotranscripción(Primer mezcla)

Una vez preparada esta primera mezcla, se introdujeron los tubos al termociclador para incubarlos a 72 °C durante 10 minutos. Mientras tanto, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
Buffer RT 5X	4 μ L
DTT 0.1 M	2 μ L
RNAse out	0.5 μ L
dNTPs 10 mM	1 μ L
RT-MMLV 200U/mL	1 μ L
Volumen total	8.5 μ L

Tabla 3. Condiciones de reacción para la retrotranscripción
(Segunda mezcla)

Transcurrido el tiempo de incubación de los tubos en el termociclador, se incubaron durante 3 minutos en hielo y se añadieron los 8.5 μ L de la segunda mezcla de reacción por cada tubo. Posteriormente se continuó con el siguiente programa en el termociclador:

Paso	Temperatura	Tiempo
1	25 °C	10 minutos
2	37 °C	60 minutos
3	94 °C	5 minutos
4	4 °C	10 minutos

Tabla 4. Programa de reacción de RT

Terminado el programa, los tubos conteniendo cDNA se almacenaron a -20°C.

6.2.11. Confirmación molecular y serotipificación de dengue.

El protocolo de Lanciotti¹⁴¹ para serotipificación del virus del dengue consiste en una retrotranscripción seguida de una amplificación del cDNA para la obtención de amplicones con tamaño distinto para realizar una serotipificación diferencial dependiendo del DENV presente.

Primer	Secuencia	Posición en el genoma	Amplicón (bp)
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	134-161	511 (D1-D2)
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC	616-644	
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586	482 (D1-TS1)
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252	119 (D1-TS2)
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421	290 (D1-TS3)
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	506-527	392 (D1-TS4)

Tabla 5. Secuencia de primers empleados para la PCR de Lanciotti

PCR D1-D2		PCR D1-TS	
Reactivo y concentración	Volumen (µL)	Reactivo y concentración	Volumen (µL)
Agua Mili Q	13.8 µL	Agua Mili Q	12.2 µL
Buffer PCR 10X	2 µL	Buffer PCR 10X	2.5 µL
MgCl ₂ 50 mM	1.5 µL	MgCl ₂ 50 mM	1.5 µL
dNTPs 10 mM	0.5 µL	dNTPs 10 mM	0.5 µL
Primer D1 10 µM	0.7 µL	Primer D1 10 µM	1 µL
Primer TS1 10µM	0.7 µL	Primer TS1 10 µM	0.5 µL
Taq polimerasa	0.3 µL	Primer TS2 10 µM	0.5 µL
cDNA	5 µL	Primer TS3 10 µM	0.5 µL
Volumen total	25 µL	Primer TS4 10 µM	0.5 µL
		Taq polimerasa	0.3 µL
		cDNA	5 µL
		Volumen total	20 µL

Tabla 6. Condiciones de reacción para la detección molecular de DENV

Los productos amplificados se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Los geles se corrieron a 100 V durante una hora.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	5 minutos
2	94 °C	1 minuto
3	60 °C	40 segundos
4	72 °C	40 segundos
5	Ir al paso 2, 40 veces	
6	72 °C	10 minutos
7	4°C	Esperar

Tabla 7. Programa de reacción para la detección molecular de DENV

6.2.12. Inmunohistoquímica

Para confirmar la infección por DENV en el cultivo primario de CMN, se realizó inmunohistoquímica con el Kit ImmPACT™ DAB *EqV* Peroxidase substrate (Vector Laboratories®) siguiendo las indicaciones del proveedor., utilizando como anticuerpo primario el Anti-Flavivirus Group Antigen Antibody, clone D1-4G2-4-15 (EMD Millipore Corporation, Germany), a una dilución 1:3000 (ver Capítulo XI).

6.2.13. Detección molecular de iNOS (PCR y qPCR)

A partir de 1000 ng de cDNA de CMN (24 h.p.i) y Huh7 (48 h.p.i.) infectadas con DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes se realizó el análisis cualitativo y cuantificación de iNOS por PCR punto final y RT-qPCR, respectivamente. Se empleó el siguiente par de primers : Primer Forward: 5'-CCC TTT ACT TGA CCT CCT AAC-3'. Primer Reverse: 5'-AAG GAA TCA TAC AGG GAA GAC-3' que amplifica para un fragmento de 290pb.

Para el análisis cualitativo se seleccionó 58°C como temperatura de alineamiento y los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

Para la cuantificación de iNOS se empleó el sistema ABI PRISM 7500 FAST (Applied Biosystem) , SybrGreen y reactivos TaqMan Master Mix . Se amplificó a 50° C por 2 min y a 95°C durante 10 min. Se seleccionaron 40 ciclos (cDNA de CMN) y 45 ciclos (cDNA Huh7 parental) a 95° C por 15 seg y 60° C durante 60 seg. Se empleó como control el gen endógeno RPS18.

6.2.14. Inmunofluorescencia para cuantificación de iNOS

A partir de las CMN y Huh7 parental cultivadas e infectadas en placas de 96 pozos negras con fondo claro al término de 24 h.p.i (para CMN) y 48 h.p.i (para Huh7 parental) se llevó a cabo la reacción de inmunofluorescencia como lo indica el proveedor del kit Human Total iNOS cell-Based ELISA (R&D Systems®) el cual permite la medición de fluorescencia emitida por la

reacción siendo proporcional a la cantidad de proteína en las células. Simultáneamente se mide iNOS y GAPDH empleando diferentes canales en el detector de fluorescencia. Para la detección de los niveles de fluorescencia se empleó el equipo GloMax Discover, Promega; el cual permite la lectura de fluorescencia en múltiples canales; se realizó un protocolo con los siguientes filtros de emisión y excitación : para lectura de fluorescencia de iNOS fue 580-640 nm (emisión) y 520 nm (excitación); y para la lectura de fluorescencia de GAPDH fue 415-445 nm (emisión) y 365 nm (excitación).

6.2.15. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se representaron como promedios \pm desviación estándar (DS) y se analizaron por análisis de varianza (ANOVA). El criterio para la significancia estadística fue $p < 0.05$.

CAPÍTULO VII

RESULTADOS

7.1. Aislamiento de CMN a partir de concentrados leucocitarios y sangre periférica

Se empleó el método de Boyum en el cual se usa un medio separador que contiene polisucrosa y diatriazoato de sodio (Histopaque®) que permite la separación de los componentes celulares por gradiente de densidad (Figura 20). Se probaron distintas proporciones de Histopaque con sangre periférica y diferentes velocidades de centrifugación encontrándose una separación completa empleando una proporción 1:1(Histopaque:sangre periférica).

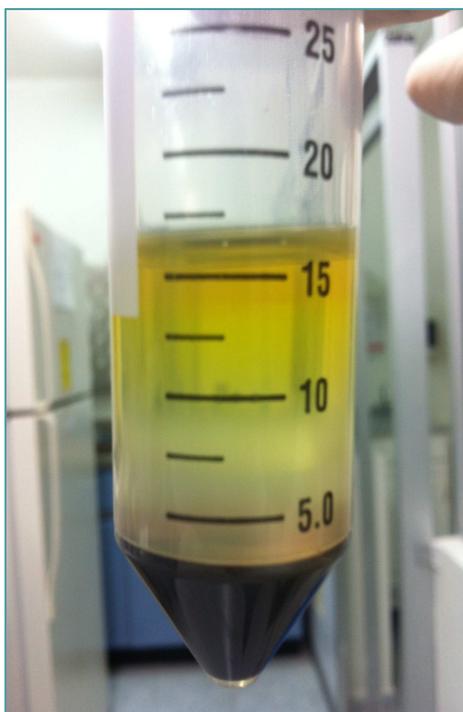


Figura 20. Separación de células sanguíneas con polisucrosa-diatrizoato de sodio .

Se estandarizó que a partir de 20 mL de concentrado leucocitario (EDTA) se puede obtener entre $50-75 \times 10^6$ células y a partir de 20 mL de Sangre periférica (Heparina sódica) entre $13-15 \times 10^6$ células.

De tal forma, que para la estandarización del cultivo primario se emplearon células obtenidas de concentrado leucocitarios con la finalidad de tener disponible un mayor número de células por ensayo.

7.2. Caracterización del cultivo primario de células mononucleares

Una vez aisladas las CMN de concentrados leucocitarios de donadores sanos se evaluó la viabilidad celular con azul tripán y además se empleó el líquido de Türk para producir lisis de eritrocitos y así contar únicamente las células mononucleares (Figura 21).

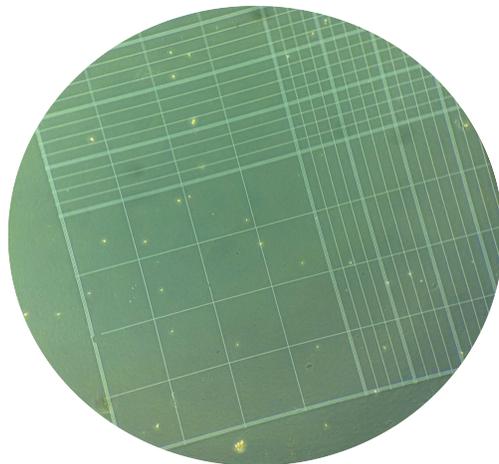


Figura 21. Fotomicrografía de CMN teñidas con líquido de Türk (10X)

Se realizaron retos metabólicos preparando el medio de cultivo RPMI 1640 Caisson ® con L-glutamina a diferentes pH, cantidades de SBF y aminoácidos no esenciales . Se observó que es imperativo ajustar el ph del medio a condiciones fisiológicas (a diferencia de lo que el proveedor recomienda) entre 7.35-7.45 , ya que a ph menor a este rango las CMN no se adherían y a un pH mayor las células comenzaban a diferenciarse a otra estirpe celular. Por otro lado, se realizaron ensayos con diferentes

porcentajes de SBF (5%, 7% y 10%) encontrándose que al suplementar entre 7-10% las células se mantenían adheridas y sin diferenciarse; sin embargo, con SBF 10% un mayor número de células se mantenía adheridas y tardaban más tiempo en presentar cambios morfológicos .

Las células mononucleares son adherentes , de manera que es importante retirar el medio en un momento óptimo con el fin de eliminar las células no adheridas y continuar con el cultivo primario de las células adheridas. Por tanto, se determinó el tiempo de adherencia celular empleando ensayos de viabilidad en placas de 96 pozos usando el reactivo MTT (Figura 22) .

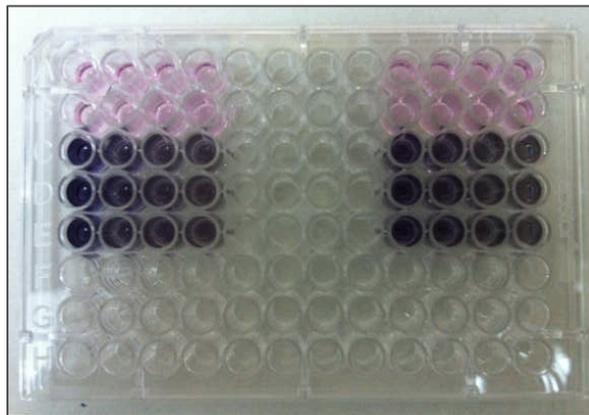


Figura 22. Placa de ELISA mostrando el ensayo de MTT en CMN. Una mayor intensidad de color púrpura está relacionada con una mayor cantidad de células viables con un metabolismo activo.

Se cultivaron CMN a diferentes densidades celulares y se retiró el medio a diferentes tiempos para encontrar el tiempo óptimo de mayor viabilidad de células adheridas. Se encontró que el tiempo óptimo para tener una viabilidad de entre 90-95% de las células adheridas era de 12 hrs para una densidad celular de $1.5 - 2 \times 10^5$ células/pozo (Figura 23).

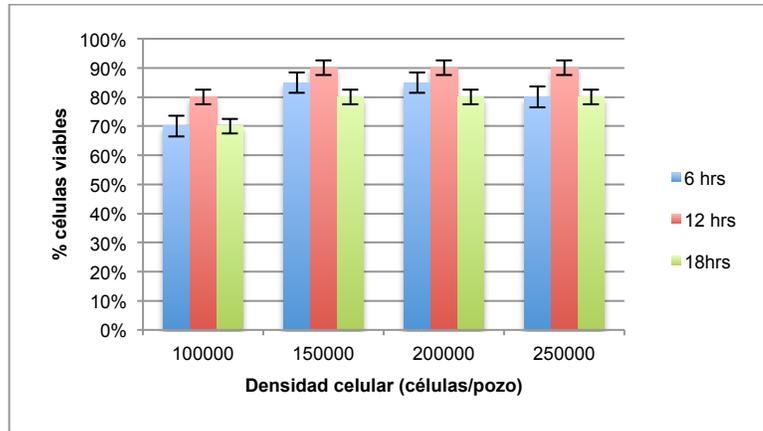


Figura 23. Ensayo de viabilidad celular y adhesión celular en CMN posterior al retiro de medio de cultivo a diferentes tiempos (hrs).

Una vez que decidimos el número de células a cultivar y el tiempo de retiro de medio para trabajar únicamente con las células adheridas metabólicamente activas, se realizó en placas de 96 pozos un ensayo de viabilidad en CMN de dos donadores sanos (2×10^5 células/pozo) y a la par se cultivaron CMN de cada donador en formato de 24 pozos (1.2×10^6 células/pozo) para realizar la caracterización morfológica celular. Encontramos que para poder trabajar con al menos 80% de viabilidad celular, el tiempo óptimo después de plaquear era hasta 36 hrs, de manera que se consideró realizar los ensayos antes de este tiempo (Figura 24).

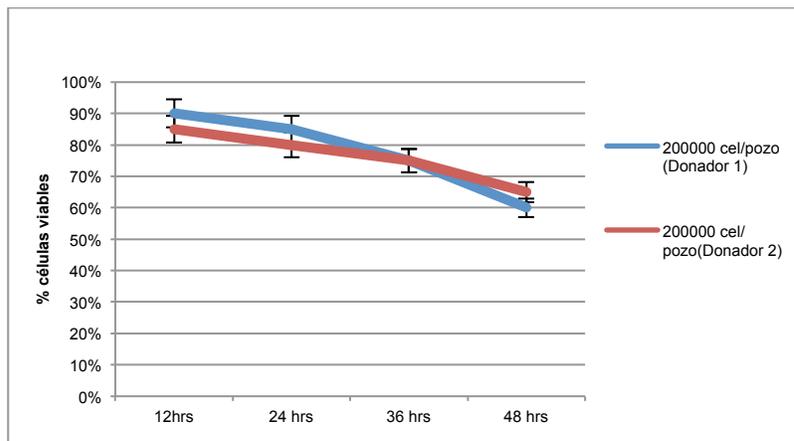
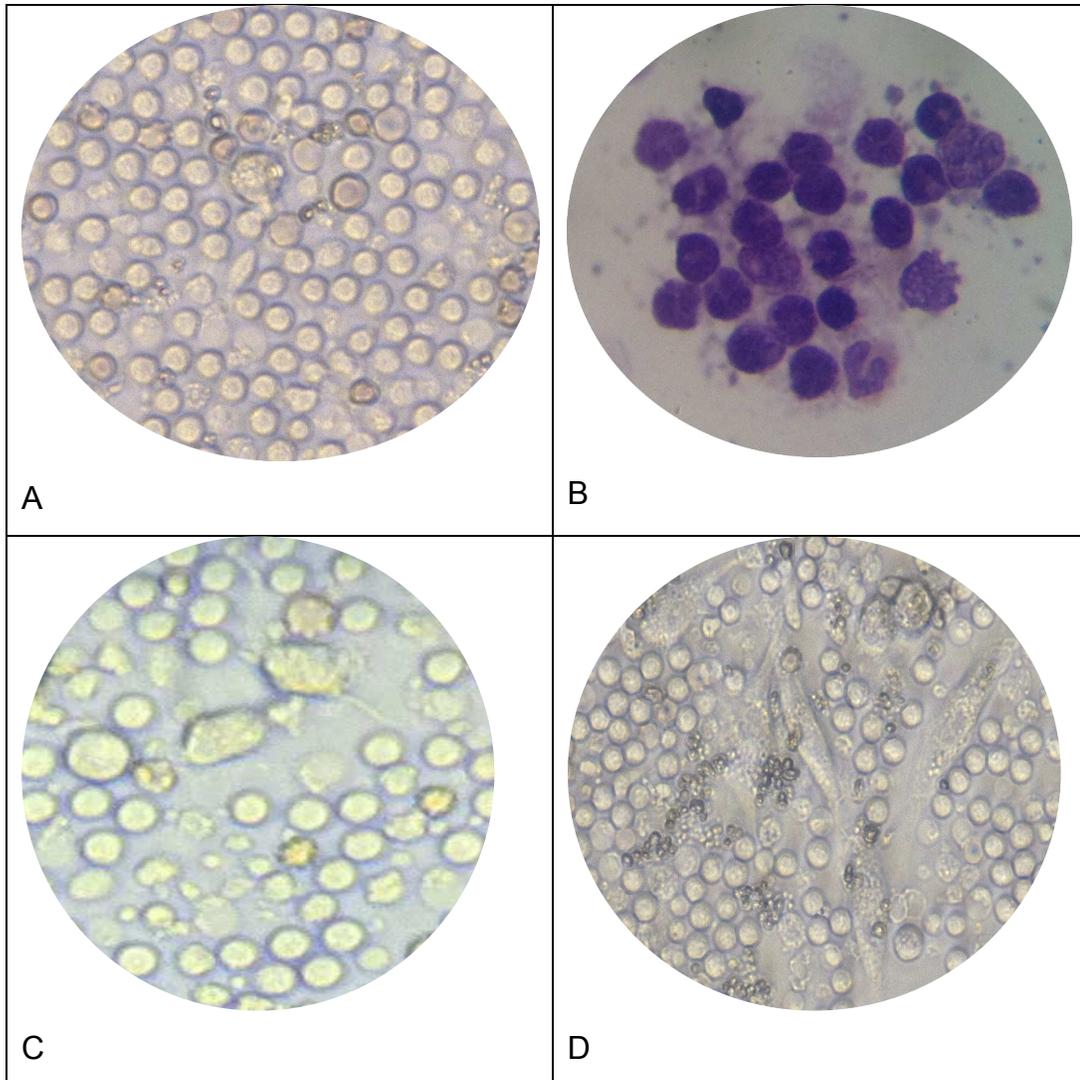


Figura 24. Ensayo de viabilidad celular con retiro de medio a las 12hrs

En relación a la caracterización celular, podemos observar que dentro de las primeras 36 hrs las células son redondas, birrefringentes y forman una bicapa (Figura 25A); para corroborar que las células en cultivo eran monocucleares se realizó tinción de Giemsa y se observó bajo un objetivo de inmersión encontrando células con núcleo arriñonado de aproximadamente 15 μm correspondientes a monocitos (Figura 25B) y células más pequeñas con un núcleo que abarca aproximadamente el 90% del citoplasma correspondiente a linfocitos (Figura 25B). A partir de las 48 hrs en cultivo las células incrementaban su tamaño y comenzaban a formar prolongaciones citoplasmáticas (Figura 25C) y para las 96 hrs observamos células con morfología fibroblastoide, estos cambios asociados a diferenciación a otra estirpe celular (Figura 25D). Con base en la caracterización y en lo ya encontrado en los ensayos de viabilidad celular se reafirmó que era importante realizar los ensayos de infección durante las primeras 36 hrs posterior al plaqueo celular para trabajar con el mayor número de células viables y sin diferenciación.



* 37°C con 5% CO₂

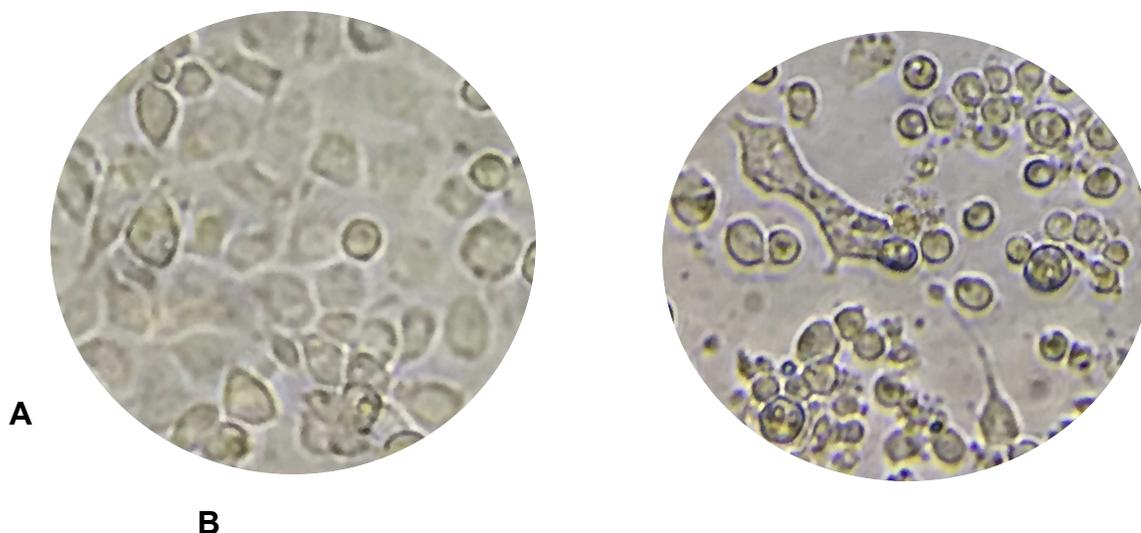
Figura 25. Caracterización del cultivo primario de CMN

Fotomicrografía de cultivo primario de CMN (40X). Imágen característica en las primeras 36 hrs de cultivo. B) Fotomicrografía de CMN teñidas con Giemsa (100X). C) Fotomicrografía de CMN entre las 48-72 hrs de cultivo(40X). D) Imágen característica de CMN a partir de las 96 hrs de cultivo (40X).

7.3. Preparación de stock viral para ensayos de infección

De forma simultánea a la estandarización del aislamiento de CMN y caracterización del cultivo primario de CMN ; se sembraron e infectaron células C6/36 con virus prototipo y cepas aisladas de pacientes de nuestro banco de virus . Se realizó la evaluación del efecto citopático por

microscopía(Figura 26), así como la caracterización molecular de cada cosecha viral por RT-PCR.



*27°C sin fuente externa de CO₂

Figura 26. Cultivo de DENV en células C6/36. A) Fotomicrografía de células C6/36 sin infección (40X). B) Fotomicrografía de células C6/36 infectadas con DENV2 prototipo (40X).

Se permitió la infección por 15 días en promedio . Tras lo cual se cosechó con scrapper y se alicuotaron en volúmenes de 180 µL. Posterior a la congelación, ninguna alícuota se descongeló en una sola ocasión para su evaluación molecular o para emplearlas en los ensayos de infección celular. No se almacenaron aislados previamente usados.

De las alícuotas realizadas, se extrajo RNA total para su caracterización molecular empleando la primera PCR (D1-D2) del protocolo de amplificación de Lanciotti. El par de primers empleados amplifican para una región consenso del genoma viral de 511 pb, no se analizó si había coinfecciones con otro serotipo viral ya que los virus amplificados fueron caracterizados previamente y forman parte de nuestro banco de virus. En este punto se decidió trabajar para los ensayos de infección con la cosecha 2 de DENV2

prototipo , las cosechas 1 y 2 del aislado viral 6870 y la cosecha 1 del aislado viral 17247 (Figura 27).

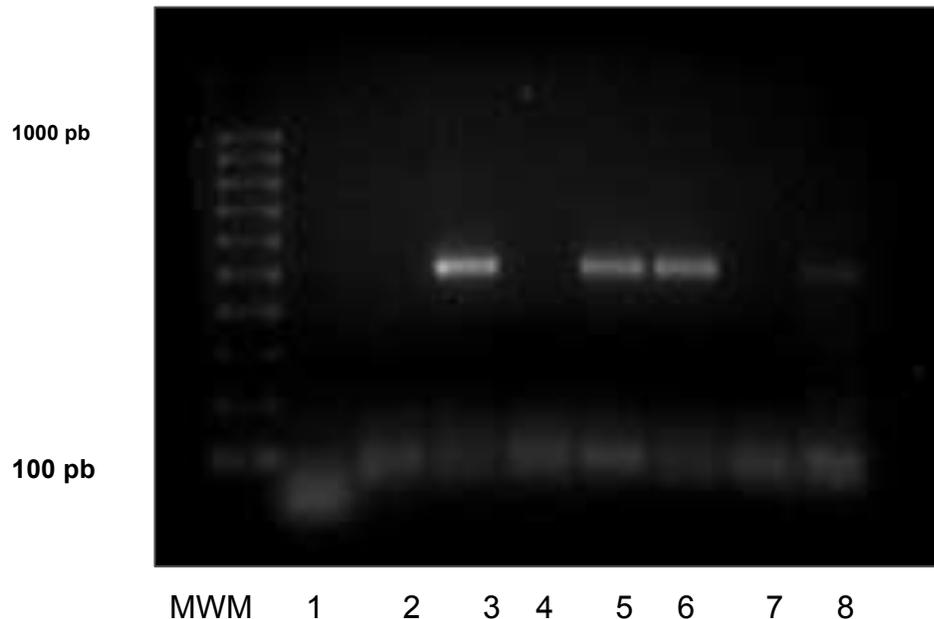


Figura 27. Evaluación molecular de DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes . MWM: marcador de peso molecular (100-1000 pb), 1: control negativo, 2: cosecha 1 DENV2 prototipo, 3: cosecha 2 DENV2 prototipo, 4: cosecha 3 DENV2 prototipo, 5: cosecha 1 aislado viral 6870, 6: cosecha 2 aislado viral 6870, 7: cosecha 1 aislado viral 694, 8: cosecha 1 aislado viral 17247 .

7.4. Caracterización de células mononucleares infectadas con DENV2

Una vez que se obtuvo el stock viral se realizaron ensayos de infección con DENV2 prototipo previamente titulado . Se infectó el cultivo primario de CMN (placa de 24 pozos) de donadores sanos con diferentes volúmenes de aislado viral empleándose 25 ,10 y 4 μ L del aislado correspondientes a 3750 ,1500 y 600 partículas virales, respectivamente. Se realizó la caracterización de las células infectadas observando destrucción de la bicapa, pérdida de la morfología celular y desprendimiento celular . Se eligió

la infección con 1500 partículas virales (10 μ L) ya que el 50% de las células tenían características de infección (Figura 28).

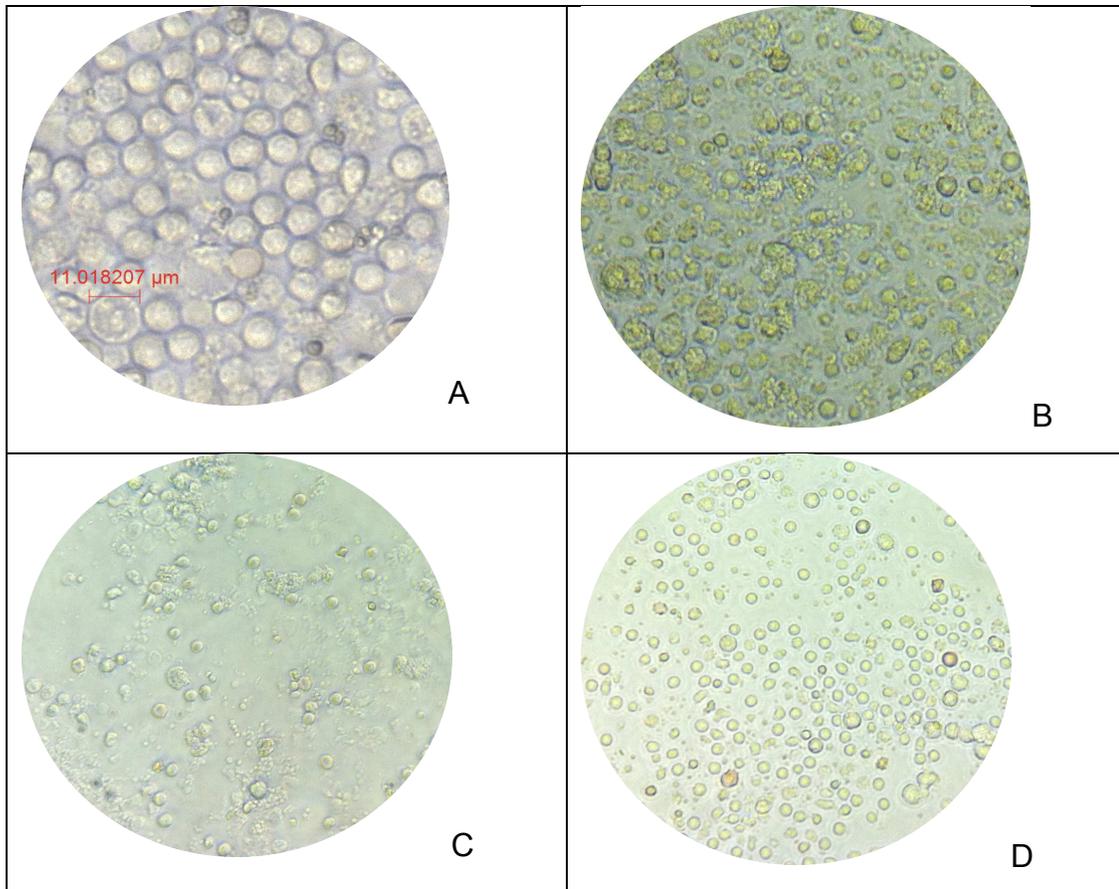


Figura 28. Fotomicrografía de CMN a las 24 h.p.i. con DENV2 (40X). A) Micrografía de CMN sin infección. B) Micrografía de CMN infectadas con 3,750 partículas virales (25 μ L). C) Micrografía de CMN infectadas con 1,500 partículas virales (10 μ L). D) Micrografía de CMN infectadas con 600 partículas virales (4 μ L).

7.5. Evaluación de la capacidad infectiva de DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes

Finalmente, con los aislados virales caracterizados se realizó el ensayo de infección con 1500 partículas virales y el ensayo de inmunohistoquímica a las 12 y 24 h.p.i. para evaluar la capacidad infectiva de los aislados virales obtenidos. Se empleó el Kit ImmPACT™ DAB *EqV* Peroxidase substrate (Vector Laboratories®) en conjunto con el anticuerpo primario dirigido contra

envoltura de Flavivirus (4G2). Se encontró que con el DENV2 prototipo generó en CMN una respuesta positiva a la IHQ más intensa que los virus aislados de pacientes e incluso cambios evidentes en la morfología celular con agrandamiento celular y pérdida de la estructura de la membrana celular (Figura 29B y 29C). De esta forma comprobamos que los virus de nuestro banco y amplificados en células C6/36 tienen la capacidad de infectar e inducir efecto citopático en el cultivo primario de CM .

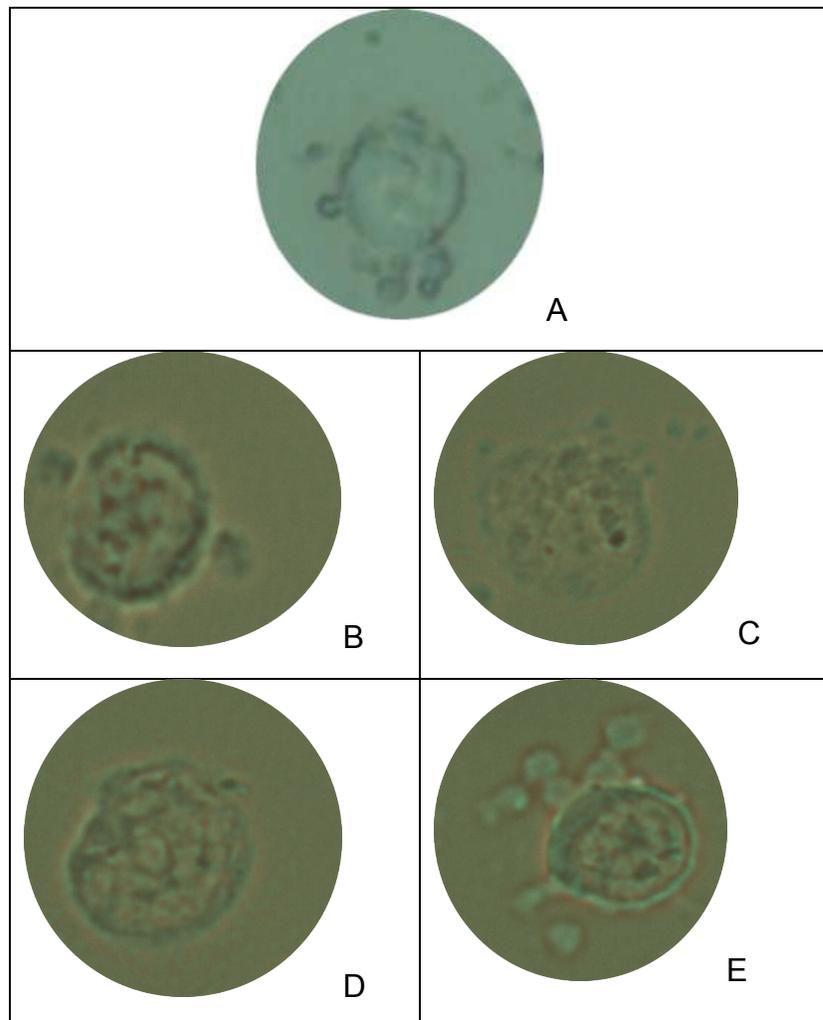


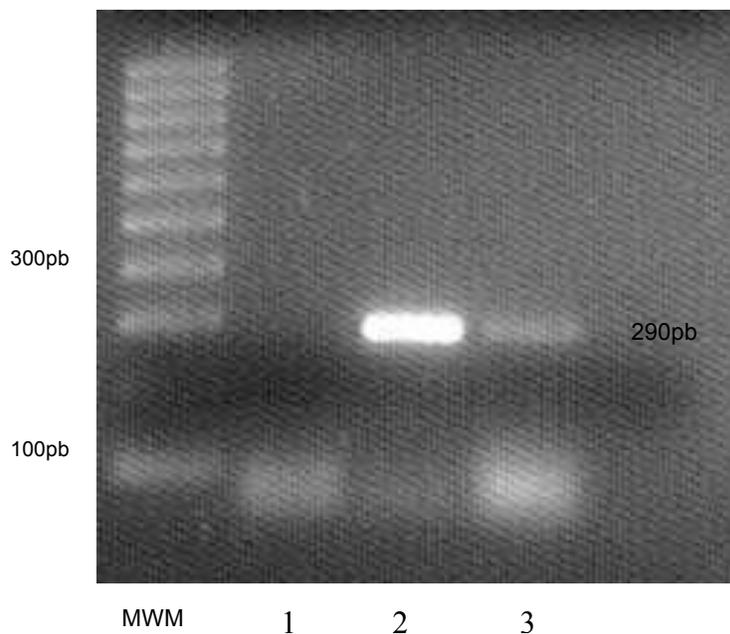
Figura 29. Inmunohistoquímica de CMN infectadas (24 h.p.i) con DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes marcadas con anticuerpo 4G2. A) Micrografía de CMN sin infección. B y C) Micrografía de CMN infectadas con DENV2 prototipo. D) Micrografía de CMN infectadas con aislado de paciente 6870. E) Micrografía de CMN infectadas con aislado de paciente 17247.

7.6. Evaluación de la regulación transcripcional de iNOS en células mononucleares de sujetos sanos infectadas con DENV 2 prototipo y aislados virales de pacientes.

A partir de CMN aisladas de concentrados leucocitarios de diferentes donadores se cultivaron las células a una densidad de 1.2×10^6 cel/pozo en placas de 24 pozos , se permitieron 12 hrs de adherencia y se retiró el medio sustituyéndolo con medio de infección RPMI 1640 7% SBF con DENV2 prototipo, aislado viral 6870 ó aislado viral 17247. Se infectó por 24 horas y al término de este tiempo se realizó extracción de RNA empleando TRIzol; sin embargo, el rendimiento y calidad de RNA era muy baja por lo que se decidió realizar la extracción con el kit RNAeasy Mini kit (Qiagen®) bajo las consideraciones previamente descritas. Se verificó la cantidad de RNA por espectrofotometría empleando el equipo Nanodrop obteniendo un rendimiento promedio de 50-70 ng/ μ L para células no infectadas y para infectadas entre 30-60 ng/ μ L; con un valor de 260/280 entre 1.8-2 .

Se realizó la retrotranscripción de 300 ng de RNA para obtener un promedio de 900-1000 ng/ μ L de cDNA.

Para la cuantificación de RNA de iNOS , en primer lugar, se estandarizaron las condiciones de reacción de los primers por PCR en punto final empleando 1000 ng de cDNA y realizando un gradiente de $MgCl_2$ (Tabla 8) obteniendo un amplicón de 290 pb que fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio (Figura 30).



*Agarosa 1.2%

	1X
Agua MiliQ	-----
Buffer 10X	2 μ L
dNTPs	0.5 μ L
MgCl ₂ 25mM	1.2 μ L
Primer Fw 10 μ M	1 μ L
Primer Rv 10 μ M	1 μ L
TaqPol	0.3 μ L
DMSO	1 μ L
cDNA	1000 ng
Total	20 μ L

Figura 30. Estandarización de PCR punto final de iNOS en CMN de 24 hrs de adherencia. Fotografía de gel de agarosa al 1.2% con gradiente de MgCl₂ evidenciando el amplicón de 290pb correspondiente al gen de iNOS. MWM: marcador de peso molecular, 1: control negativo, 2: 1mM MgCl₂, 3: 2 mM MgCl₂.

Tabla 8. Condiciones de reacción para PCR punto final de iNOS

Posteriormente , se estandarizaron las condiciones de reacción para qPCR empleando SybrGreen. En primer lugar, se realizó una curva de eficiencia a diferentes concentraciones de cDNA (400 ng, 80 ng, 16 ng) obteniendo una R² de 0.99 (Figura 31). Se emplearán las condiciones de reacción de la Tabla 9 empleandose como gen endógeno la proteína ribosomal S18.

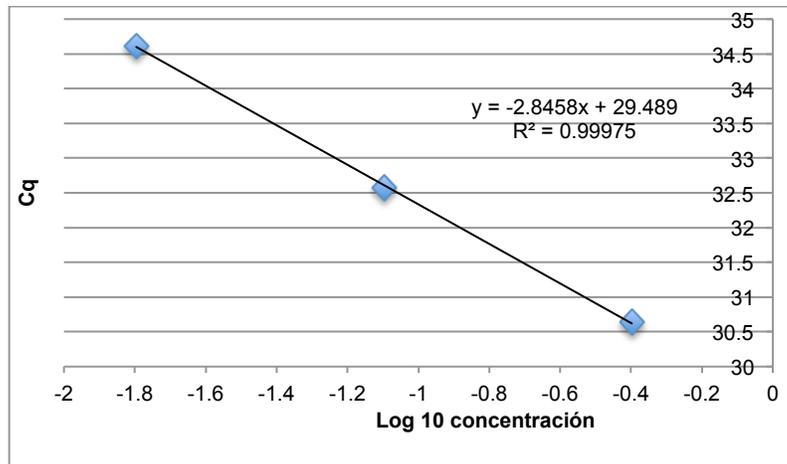


Figura 31. Curva de eficiencia RT-qPCR iNOS

iNOS/RPS18	1X
SYBRgreen	10 μ L
Primer Fw 10 μ M (iNOS/RPS18)	1 μ L
Primer Rv 10 μ M (iNOS/RPS18)	1 μ L
Agua DEPC	—
cDNA	1000 ng

Tabla 9 .Condiciones de la reacción de RT-qPCR para iNOS y RPS18 empleando SybrGreen

Una vez realizada la estandarización de la reacción de qPCR , se realizaron ensayos de infección con las distintas cepas virales de DENV2 en cultivos primarios de CMN de donadores sanos y para el término de 24 h.p.i se extrajo el RNA total y se cuantificó el RNA de iNOS por qPCR . Para el análisis de expresión génica se empleó el método $\Delta\Delta$ Ct usando el gen RPS18 como control.

Con este último ensayo se encontró que en las CMN existe una expresión diferencial de iNOS entre individuos infectados con diferentes cepas virales de DENV2 existiendo una mayor expresión de iNOS con la infección por el DENV2 prototipo (Figura 32).

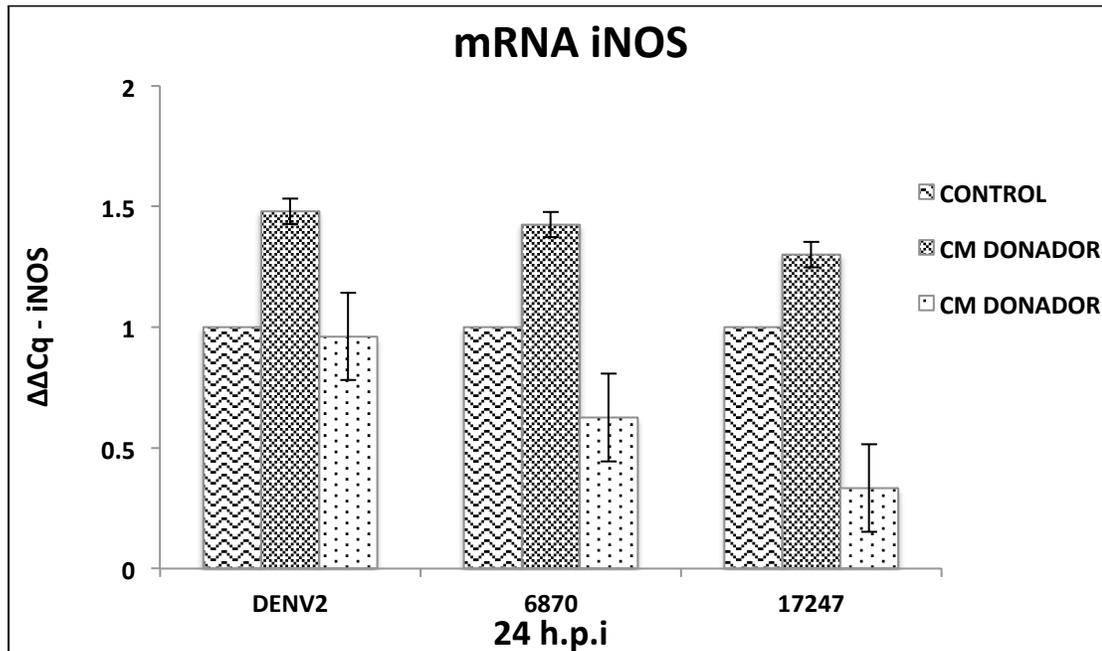


Figura 32. Evaluación de la expresión transcripcional de iNOS en células mononucleares de donadores sanos

7.7. Evaluación de la expresión génica de iNOS en células mononucleares aisladas de pacientes con DM2 y sujetos sanos infectadas con DENV 2 prototipo y cepas virales aisladas de pacientes.

Para los siguientes ensayos se reclutaron sujetos sanos y diabéticos durante el mismo periodo estacional (Agosto-Septiembre 2016) previo al inicio de la temporada de alta incidencia de infección por DENV. Se incluyeron sujetos sanos y diabéticos tipo 2 en tratamiento con insulina y/o hipoglucemiantes orales, de edades comprendidas entre 40 a 65 años de edad para ambos grupos. Para cada grupo (control /casos) se reclutaron 12 sujetos. Se realizó una historia clínica y exploración física completa incluyendo datos antropométricos básicos (peso y talla), porcentaje de grasa corporal, índice

de masa corporal, índice de cintura/cadera, mediciones de pliegues cutáneos , mediciones de signos vitales y estudios bioquímicos recientes (Hemoglobina glucosilada ,HbA1) ; así como una glucometría capilar previo a la toma de sangre periférica. La HbA1 es una heteroproteína de la sangre que resulta de la unión de la hemoglobina (Hb) con glúcidos unidos a cadenas carbonadas con funciones ácidas en el carbono 3 y el 4. Su medición es utilizada en la diabetes para saber si el control que realiza el paciente sobre la enfermedad ha sido adecuado durante los últimos tres o cuatro meses. Un valor menor a 7 reduce considerablemente el riesgo de padecer enfermedades micro y macrovasculares¹⁴².

La edad media de los sujetos de estudio fue de 51 años. El 92% de los sujetos tuvo sobrepeso y/o obesidad con base en su porcentaje de grasa corporal medida por bioimpedancia. La glicemia capilar al momento de la toma de la muestra de sangre periférica fue <115 mg/dl para los sujetos sanos. En el caso de los diabéticos, la mayoría (58%) presentaba glicemia <200 mg/dl (promedio 120 mg/dl) con HbA1 menor de 7 ; un 33% de los diabéticos presentó glicemia capilar al momento del estudio >400 mg/dl con HbA1 por arriba de 10. Solo 3 pacientes diabéticos reciben insulina de los cuales uno pertenecía al grupo de diabéticos con glicemia capilar >400 mg/dl; el resto de los diabéticos emplean algún hipoglucemiante oral para su control siendo la metformina la más frecuentemente administrada. El binomio de comorbilidad más frecuente (66%) fue DM2 e hipertensión arterial (Tabla 10). Es importante mencionar que dos pacientes diabéticos con adecuado control glicémico tienen antecedente de enfermedad coronaria aguda (angina de pecho) con antecedente de bypass coronario de al menos 5 años .

	Todos los pacientes (n=24)	Voluntarios sanos (n=12)	Diabéticos (n=12)
Edad, media (IQR)	51 (36-65)	45(40-61)	56(40-65)
Género(M/F)	18/6	12/0	6/6
Enfermedades crónicas degenerativas			
HTA	12	-	12
Cardiopatías	2	-	2
Vasculares	1	-	1
Dislipidemia	5	-	5
IMC			
<30	14	9	5
>30	10	3	7
% Grasa corporal			
Normal	2	2	0
Sobrepeso	12	7	5
Obesidad	10	3	7
Glucosa			
<200 mg/dl	19	12	7
200-400 mg/dl	1	-	1
>400 mg/dl	4	-	4
HbA1c			
<7 (<154 mg/dl)	7	-	7
7.1-10 (154-240 mg/dl)	1	-	1
>10.1 (>240 mg/dl)	4	-	4
TxDM2			
Metformina	12	N.A.	12
Glibenclamida	6	N.A.	6
Insulina	3	N.A.	3
Otros hipoglucemiantes	3	N.A.	3
Comorbilidades			
HTA/DM2	8	N.A.	8
Dislipidemia/DM2	4	N.A.	4

Tabla 10. Características sociodemográficas, parámetros clínicos y bioquímicos de sujetos sanos y pacientes diabéticos. N.A.: No Aplica

Para cumplir con este objetivo, de cada una de los sujetos se aislaron las CMN y se cultivaron en placas de 24 pozos a una densidad de 1.2×10^6 cel/pozo, se mantuvieron en adherencia por 18 hrs , al término de este tiempo se retiró el medio y se sustituyó por medio de infección (RPMI 1640 7% SBF) con las diferentes cepas virales (DENV2 prototipo y aislados viral 6870). A las 24 h.p.i. se extrajo el RNA total con el kit RNAeasy Mini kit ,

Qiagen® obteniendo rendimientos promedio de 45 ng/μL e índice 260/280 de 1.8-2. Se cuantificó el mRNA de iNOS por qPCR y para el análisis de expresión génica se empleó el método $\Delta\Delta C_t$ usando el gen RPS18 como control endógeno.

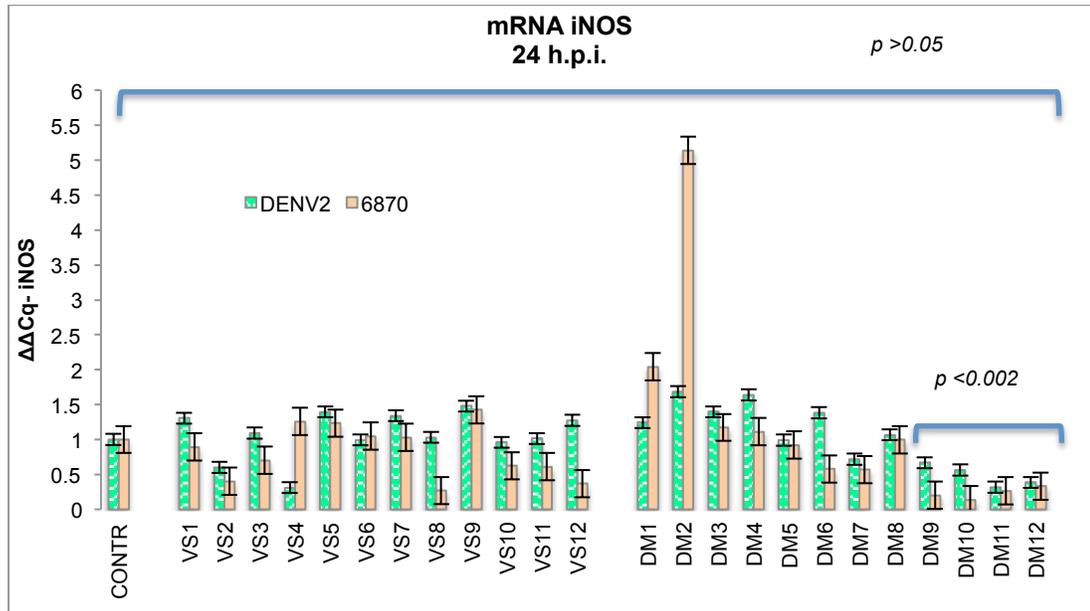


Figura 33. Análisis transcripcional de iNOS en CMN de sujetos sanos y diabéticos infectadas con DENV2 y aislado viral de paciente. VS: voluntario sano, DM: diabético

Los valores fueron expresados como desviaciones estándar de tres observaciones independientes. La significancia de las diferencias se probó con t-Student, ANOVA o correlación de Pearson. Se consideró significativo un valor de p menor a 0.05.

Se encontró que no hubo diferencia estadística en la expresión de iNOS en CMN no infectadas e infectadas con DENV2 prototipo y cepa 6870 entre los grupos de voluntarios sanos comparados con los diabéticos ; así como tampoco hubo asociación en el análisis de ANOVA entre la expresión de iNOS con la glucosa capilar, HbA1, porcentaje de grasa corporal e índice de masa corporal. Sin embargo, existe una expresión diferencial de iNOS asociada a la base genética individual y cepa viral. En este grupo etario tanto en diabéticos como sanos se observó una mayor expresión de iNOS en

CMN infectadas con DENV2 en comparación a la infección con el aislado viral 6870 (Figura 33).

En el subgrupo de diabéticos, se encontró una mayor expresión de iNOS en CMN tanto basal como al infectarse con las diferentes cepas virales en los dos sujetos diabéticos (Figura 33 DM1 y DM2) con antecedente de bypass coronario siendo mayor la expresión en CMN infectadas con la cepa viral 6870. Aquellos sujetos con glicemia >400mg/dl y HbA1 >10 (Figura 33 DM9 a DM12) se observa una menor expresión transcripcional de iNOS en CMN tanto infectadas con el prototipo viral como con la cepa aislada de paciente 6870 . En el análisis de regresión lineal se encontró una asociación (p 0.002) entre la glicemia capilar >400 mg/dl y HbA1 >10 y la menor expresión de iNOS (Figura 33).

7.8. Cuantificación de niveles de la enzima iNOS en células mononucleares aisladas de voluntarios sanos y pacientes con DM2 infectadas con DENV2.

A la par del ensayo anterior, a partir de las células recientemente aisladas de cada sujeto de estudio se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de 2×10^5 células/pozo y al término de 18 hrs se retiró el medio y se sustituyó por medio de infección (RPMI 1640 7% SBF) con DENV2 prototipo (cepa viral que mostro mayor expresión iNOS a nivel transcripcional tanto en sanos como diabéticos).A las 24 h.p.i se cuantificarón los niveles de la enzima iNOS por fluorescencia empleando el kit Human Total iNOS cell-Based ELISA, R&D Systems®.

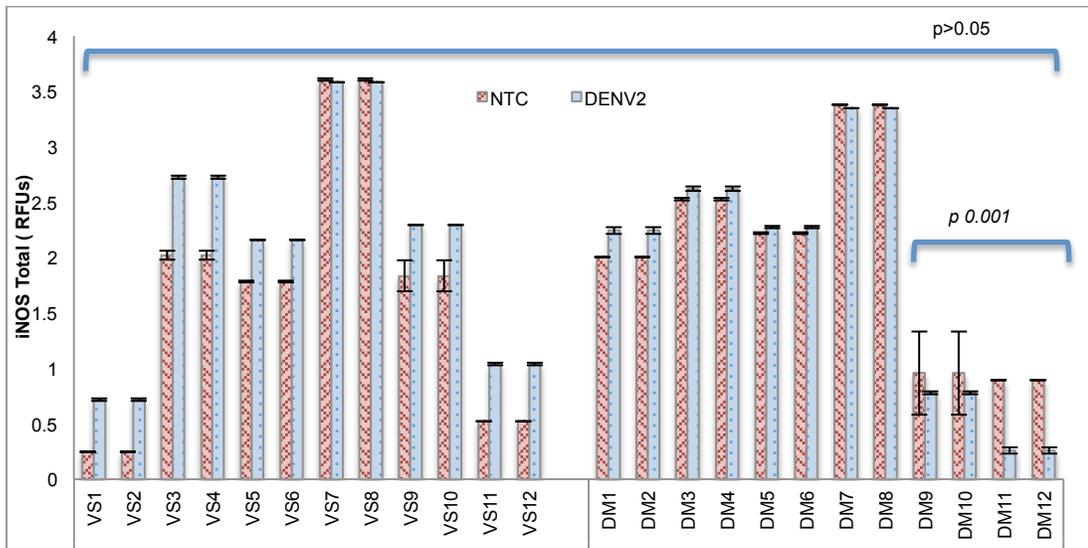


Figura 34. Evaluación traduccional de iNOS en CMN de sujetos sanos y diabéticos infectadas con DENV2. VS: voluntario sano, DM: diabético

En sujetos sanos la regulación es muy variable no correspondiendo con los niveles transcripcionales ,además; no se encontró diferencia estadística entre la expresión traduccional de iNOS entre ambos grupos. Lo anterior, apoya el hecho de una diferencia en regulación del estrés oxidativo en cada individuo. Sin embargo, comparativamente existe una mayor síntesis de iNOS en CMN de sujetos sanos ante la infección por DENV2 comparada con los diabéticos (Figura 34).

En el subgrupo de diabéticos, en el análisis de regresión lineal (ANOVA) se encontró asociación (p 0.001) entre la menor expresión de iNOS ante la infección con el prototipo viral en CMN de sujetos diabéticos descontrolados con glicemia >400mg/dl y HbA1 >10 , lo que concuerda con los resultados obtenidos en el análisis transcripcional de iNOS (Figura 34 DM9-DM12).

7.9. Regulación de la expresión génica y traduccional de iNOS en una línea celular distinta, empleando células Huh7 infectadas con DENV2 para determinar si el efecto es tejido-específico.

Para cumplir con este objetivo, se emplearon células Huh7 parental , las cuales al encontrarse al 90% de confluencia se tripsinizaban y cultivaban en placas de 6 pozos (3×10^5 células/pozo) y de 96 pozos oscuras con fondo claro (1.5×10^5 células/pozo) , transcurridas 24 hrs de adherencia , se retiraba el medio y sustituía por medio con infección (ADMEM 1%SBF) con DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes (6870 y 17247). A las 48 h.p.i se extrajo el RNA total de las células (placa de 24 pozos) empleando TRizol y se llevó a cabo el ensayo de inmunofluorescencia en las células de la placa de 96 pozos.

Se confirmó que los virus aislados tienen la capacidad de inducir efecto citopático similar al que producen los virus prototipo. Por lo tanto, los virus aislados a partir de pacientes parecieron mantener su infectividad y capacidad citopática en la línea celular Huh7 (Figura 35).

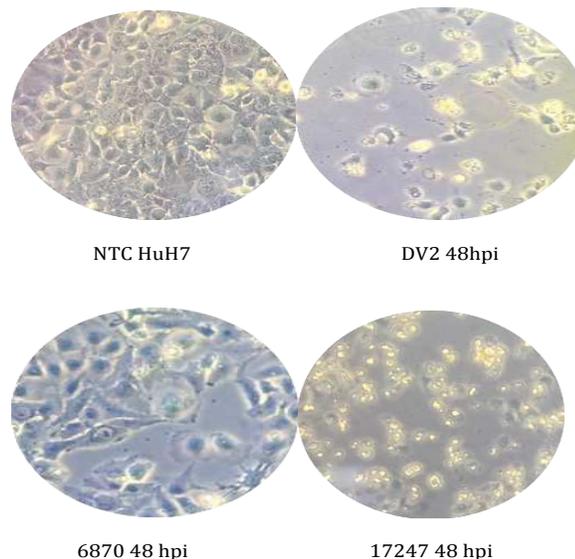


Figura 35. Caracterización de células Huh7 parental infectadas con DENV2 prototipo y aislados virales de pacientes a las 48 h.p.i. . NTC: non treated control (células sin infección), DV2 : DENV2 prototipo

Bajo la consideración de un mismo origen genético, en las células Huh7 existe una diferencia transcripcional y traduccional de iNOS dependiente de la cepa viral. Existiendo una mayor expresión a nivel génico (Figura 36) y traduccional(Figura 37) en células infectadas con DENV2 prototipo comparado con las infectadas por los aislados virales de pacientes.

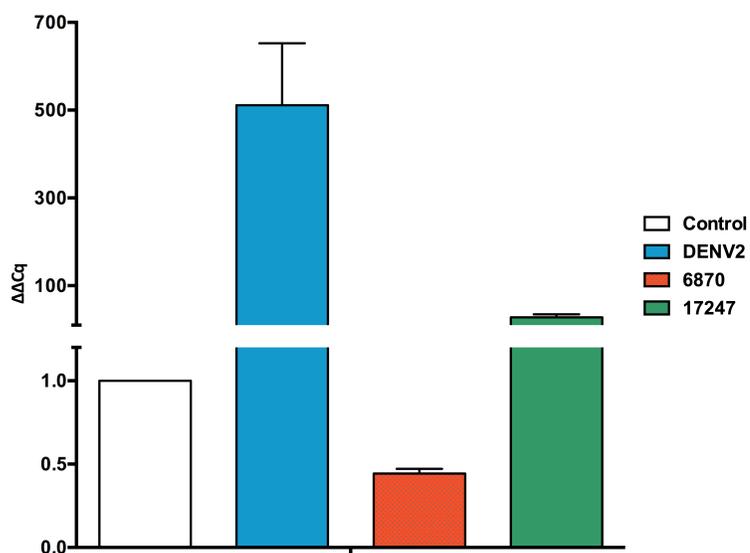


Figura 36. Análisis transcripcional de iNOS en la línea celular Huh7 parental a las 48 h.p.i.

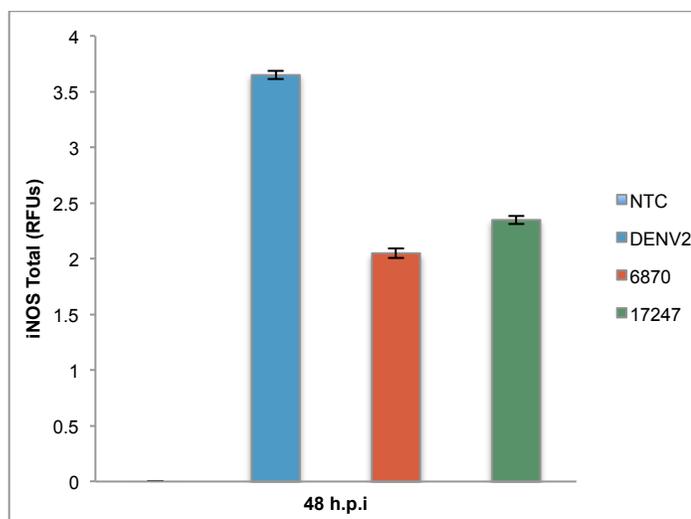


Figura 37. Análisis traduccional de iNOS en la línea celular Huh7 parental a las 48 h.p.i.

CAPÍTULO VIII

DISCUSIÓN

La infección por dengue es un problema creciente de salud pública que afecta a más de 100 países en el mundo, con más de 50 millones de casos informados cada año, incluidos 500,000 hospitalizaciones y alrededor de 20,000 defunciones. Los cuatro serotipos virales, están circulando de forma simultánea en el continente Americano y en México.

En años recientes se ha encontrado una asociación de dengue severo con algunas comorbilidades como asma, alergias, hipertensión arterial y diabetes mellitus. Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares que conllevan a un cuadro clínico grave. En este sentido, es fundamental el estudio de los factores involucrados en el proceso de extravasación vascular, la cual es la base fisiopatológica de la infección por dengue, empleando sistemas de estudio *in vitro*.

En la presente tesis se abordó la expresión a nivel transcripcional y traduccional de la enzima iNOS, la cual es la orquestadora de la respuesta del sistema inmune innato ante infecciones y cuya expresión es mayor en células del sistema monocítico-macrófago. Además, este último también actúa como modulador de la respuesta inflamatoria crónica de baja intensidad que se observa en la diabetes mellitus 2.

Se esperaba que hubiera una mayor expresión génica basal en CMN de sujetos diabéticos comparadas con los sanos; sin embargo, encontramos una alta variabilidad de la expresión de iNOS, la cual se podría explicar con la posible existencia de polimorfismos en el gen de iNOS. Existe un estudio de Hazam y colaboradores quienes reportan la presencia de SNPs de iNOS

en sujetos con infección grave por hepatitis E sugiriendo que la presencia de estos polimorfismos participan en la expresión diferencial de la enzima y por ende, en la presentación clínica. Hasta el momento, no existen reportes de SNPs de iNOS asociados a infecciones arbovirales¹⁴³.

Diversos estudios han mostrado que iNOS sirve como marcador temprano de aterosclerosis. Lo anterior demostrado por Buttery y colaboradores quienes reportaron la presencia de iNOS en placas ateroscleróticas¹⁴⁴; además, Basati y colaboradores reportaron el incremento del NO en pacientes con riesgo cardiovascular¹⁴⁵. Estos datos son de importancia ya que corroboramos que existió una mayor expresión de iNOS tanto basal y en particular al infectarse por el aislado 6870 (en comparación a sujetos sanos y el resto de los diabéticos) en los dos pacientes diabéticos con antecedente de angina de pecho y bypass coronario, en quienes se puede inferir enfermedad microvascular que conlleva a un mayor estrés oxidativo y efecto deletéreo en la respuesta inflamatoria ante la infección.

La hiperglicemia produce daño directo en monocitos y provoca incremento de óxido nítrico en diabéticos¹⁴⁶, esto aunado al reporte de Valero y colaboradores en el cual demuestran una menor expresión de la actividad oxidante/antioxidante en monocitos infectados con DENV de personas mayores de 65 años¹¹⁸; estos datos soportan nuestro hallazgo de una menor expresión de iNOS en CMN de adultos con hiperglicemia persistente sugiriendo una menor respuesta del sistema redox.

En relación a la glucosa y su utilización por patógenos, Fontaine y colaboradores sugirieron que el DENV induce la vía glucolítica y requiere de glucosa extracelular para su eficiente replicación durante las primeras 48 h.p.i.¹⁴⁷. Este hallazgo relacionado a la clínica puede implicar una exacerbación del estado hiperosmolar en sujetos diabéticos durante la fase aguda de la infección. En este sentido, existen reportes en la literatura de

sujetos sanos que desarrollan cetoacidosis diabética secundaria a infección grave por dengue¹⁴⁸ y de sujetos diabéticos infectados por dengue que se descompensan y desarrollan cetoacidosis diabética.

En relación a la diferencia de expresión de iNOS con las diferentes cepas virales, Ubol y colaboradores evaluaron el perfil de expresión de genes del sistema inmune en células THP1 (línea celular humana monocítica) al infectarlas con dos aislados virales que diferían en la composición de aminoácidos en el sitio activo NS5A . Estas modificaciones mostraron diferencia en la inducción de la producción del NO en células infectadas por lo que se dividieron en aislados virales NO-sensibles y NO- resistentes. El fenotipo resistente mostró mayor expresión de genes relacionados con el sistema inmune a diferencia del sensible. Dentro de los genes sobreexpresados se encontraron genes de citocinas y aquellos relacionados con la activación de células B, células T, plaquetas y células inflamatorias; todos estos mediadores participan en los eventos vasculares que son críticos para la extravasación vascular durante la fase crítica de la infección¹⁴⁹. Estos datos apoyan nuestros hallazgos sobre la diferencia de expresión tanto a nivel transcripcional como traduccional de iNOS con las diferentes cepas virales tanto en CMN como en la línea celular Huh7 parental. De esta forma, los datos presentados soportan que la modulación de la respuesta al estrés oxidativo en nuestro estudio parece estar asociada tanto con la base genética individual como con la cepa viral.

Es probable que la subexpresión de iNOS en sujetos con altos valores glicémicos sea secundaria a modificaciones epigenéticas por la glucotoxicidad. Miao y colaboradores analizaron las variaciones en la metilación de histona lisina (empleando metodología ChIP-on-chip) en células THP1 sometidas a altas concentraciones de glucosa in vitro. El grupo demostró que la hiperglicemia altera la metilación de genes relacionados con inflamación crónica como IL-1A e IL-8; además de genes relacionados con vías de transducción de señales, transporte, inflamación y estrés oxidativo

como PTEN, ABCB6, IGF1R, GSTA4, *BCL-9*, FOS, ICAM3, NOTCH1, TCF3, MAPK10, ESR1 y ING5¹⁵⁰.

La DM esta asociada a senescencia prematura. Uziel y colaboradores encontraron mayor acortamiento de telómeros en CMN de diabéticos tanto tipo 1 como tipo 2 comparados con los sanos. En el subgrupo de diabéticos tipo 2 controlados observaron que el acortamiento estaba completamente atenuado. Estos resultados sugieren que la senescencia celular prematura en sujetos con DM2 se puede prevenir con un control glicémico adecuado. En este sentido, es probable que la expresión diferencial de iNOS en los diabéticos controlados contra no controlados dependa de la función alterada (senscente) de las CMN sujetas al constante ambiente hiperglicémico¹⁵¹.

Se han demostrado cambios relacionados con la edad en la expresión de TLRs en monocitos. Kong y colaboradores mostraron que durante la infección por virus del Oeste del Nilo existe una reducción en la expresión de TLR3 en la superficie de macrófagos de sujetos sanos y en ancianos se presenta una expresión persistente de TLR3, este hecho puede predisponer a las personas de mayor edad a una respuesta inflamatoria elevada con consecuente incremento en la morbilidad¹⁵².

Aún no se comprenden por completo los mecanismos involucrados en la presentación clínica severa y menos aún cuando existen comorbilidades crónico degenerativas que merman el estado del sistema inmunológico. El presente trabajo representa el primer estudio de expresión que se realiza en sujetos diabéticos y cepas circulantes aisladas a partir de pacientes virémicos de nuestro estado.

CAPÍTULO IX

CONCLUSIONES

1. Existe una expresión diferencial de iNOS asociada a la base genética individual y cepa viral.
2. El virus prototipo y las cepas aisladas de sujetos infectados parecen tener diferente capacidad para modular la expresión de iNOS.
3. El DENV2 prototipo indujo niveles de expresión de iNOS más altos que el aislado de paciente lo cual podría explicar la variabilidad en el espectro clínico.
4. Existe una asociación entre la hiperglicemia (>400mg/dl) y los niveles de HbA1>10 con la subexpresión de los niveles de iNOS a nivel transcripcional y traduccional.
5. Existe un patrón de expresión diferencial de iNOS en células Huh7 infectadas con DENV2 prototipo como con aislados de pacientes.

CAPÍTULO X

BIBLIOGRAFÍA

1. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Piggot DM, Duda KA, Bhatt S, Katzelnick L, Howes RE, Battle KE, Simmons PC, Hay SI (2014). Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history . *Trends Microbiol Mar*; 22(3): 138–146.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue map. <http://www.healthmap.org/dengue/en/>
3. Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. (2009). Organización Mundial de la salud
4. Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Zapata-Peraza AL, Rosado-Paredes EP, Flores-Flores LF, García-Rejón JE, Díaz FJ, Blitvich BJ, Andrade-Narváez M, Jiménez-Ríos E, Blair CD, Olson KE, Black W 4th, Beaty BJ.(2004).” Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico.”. *Am J Trop Med Hyg*. Oct;71(4):485-92.
5. Díaz FJ, Black WC 4th, Farfán-Ale JA, Loroño-Pino MA, Olson KE, Beaty BJ(2006). “Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective”. *Arch Med Res*. 2006 Aug;37(6):760-73.
6. Organización Mundial de la Salud. Dengue cases, Americas. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=3274&Itemid=40734&lang=es (consultado Septiembre 2016)
7. Tesis Doctoral (2015) Daniel Arellanos Soto. Evaluación de los perfiles de respuesta a interferón inducidos como respuesta a la infección con el virus del dengue
8. SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue
9. Dhananjeyan KJ, Paramasivan R, Tewari SC, Rajendran R, Thenmozhi V, Victor Jerald LS, Venkatesh A, Tyagi BK. (2010) “Molecular identification of mosquito vectors using genomic DNA isolated from eggshells, larval and pupal exuvium.” *Trop Biomed*. Apr;27(1):47-53.
10. Esler D (2009). "Dengue - Clinical and public health ramifications." *Aust Fam Physician* 38(11): 876-879.
11. Lifson AR. (1996) “Mosquitoes, models, and dengue.” *Lancet*. May 4;347(9010):1201-2.
12. Vasilakis N, Cardoso J, Hanlek KA, Holmes EC, Weaver SC. (2011) “Fever from the forest: prospects for the continued emergence of dengue virus and its impact on public health”. *Nature Reviews Microbiology* 9, 532-541.
13. Chakraborty T (2008) “Dengue Fever and other Hemorrhagic viruses”. Chelsea House, Infobase publishing. pp.20-23.
14. Azevedo LS, Carvalho DB, Matuck T, et al. (2007) “Dengue in renal transplant patients: a retrospective analysis”. *Transplantation*. 84:792–794.

15. Chen LH, Wilson ME. (2004) "Transmission of dengue virus without a mosquito vector: nosocomial mucocutaneous transmission and other routes of transmission". *Clin Infect Dis*. 39(6):e56-60.
16. Fatimil LE, Mollah AH, Ahmed S, Rahman M. (2003) "Vertical transmission of dengue: first case report from Bangladesh" *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. Dec;34(4):800-3.
17. Ross TM (2010) "Dengue virus". *Clin Lab Med.*, 30(1):149-60.
18. Chambers TJ, Monath TP. "Advances in Virus Research, vol, 61. The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development". Elsevier Academic Press, 2003. pp. 235-267.
19. Buhl, MR (2005). "Flavivirus infections: yellow fever, dengue fever and Japanese encephalitis." *Ugeskr Laeger* 167(43): 4076-4080
20. Lindenbach BD, Rice CM (2003). "Molecular biology of flaviviruses." *Adv Virus Res*.59: 23-61.
21. Lambrechts L, Fansiri T, Pongsiri A, et al.(2012)" Dengue-1 virus clade replacement in Thailand associated with enhanced mosquito transmission". *J Virol*; 86: 1853–61.
22. Vu TT, Holmes EC, Duong V, et al. (2010) "Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in vietnam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia". *PLoS Negl Trop Dis* ; 4: e757.
23. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. (2005) "Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes". *J Virol* ; 79: 853–59.
24. Ohainle M, Balmaseda A, Macalalad AR, et al. (2011)"Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity". *Sci Transl Med* ; 3: 114ra28.
25. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, et al. (2010)"Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006". *PLoS Negl Trop Dis* ; 4: e617.
26. Fragnoud R, Yugueros-Marcos J, Pachot A, Bedin F. (2012) "Isotope Coded Protein Labeling analysis of plasma specimens from acute severe dengue fever patients". *Proteome Sci* ; 10: 60.
27. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, et al. (2003)"Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses". *EMBO Rep* ; 4: 723–28.
28. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, et al.(2009) "Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites". *Cell Host Microbe* ; 5: 365–75.
29. Heaton NS, Randall G. (2010) "Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism". *Cell Host Microbe* ; 8: 422–32.
30. Mateo R, Nagamine CM, Spagnolo J, et al. (2013) "Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation". *J Virol* ; 87: 1312–21.

31. Nasirudeen AM, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam KP, Liu DX(2011) “ RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection”. *PLoS Negl Trop Dis* ; 5: e926.
32. Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, et al. (2005) “Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses”. *J Virol* ; 79: 8004–13.
33. Morrison J, Laurent-Rolle M, Maestre AM, et al. (2013) “Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling”. *PLoS Pathog* ; 9: e1003265.
34. Gan ES, Ting DH, Chan KR (2016) “ The mechanistic role of antibodies to dengue virus in protection and disease pathogenesis”. *Expert Rev Anti Infect Ther.* Oct 31.
35. Wrammert J, Onlamoon N, Akondy RS, et al. (2012) “Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans”. *J Virol* ; 86: 2911–18.
36. Rastogi M, Sharma N, Singh SK(2016). “Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein”. *Virology*. Jul 29;13:131. doi: 10.1186/s12985-016-0590-7.
37. Weiskopf D, Angelo MA, de Azeredo EL, et al. (2013) “Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells”. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 110: E2046–53.
38. Rothman AL.(2011) “ Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms”. *Nat Rev Immunol* ; 11: 532–43.
39. Domingo-Carrasco C y Gascón-Bustrenga J. (2005) “Dengue y otras fiebres hemorrágicas virales”. *Enferm Infecc Microbiol Clin* ; 23(10):615-26).
40. Gubler DJ, Clark GG.(1995) “ Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problema”. *Emerg Infect Dis.*; 1:55-7.
41. Sierra B, Perez AB, Vogt K, et al. (2010) “Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation?”. *Cell Immunol* ; 262: 134–40.
42. Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, Ubol S, Mosser DM.(2010) “ Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes”. *Lancet Infect Dis* ; 10: 712–22.
43. Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, et al. (2009) “Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance”. *Am J Trop Med Hyg* ; 81: 825–33.
44. Luplertlop N, Missé D, Bray D, et al.(2006) “ Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction”. *EMBO Rep* ; 7: 1176–81.
45. Puerta-Guardo H, Raya-Sandino A, González-Mariscal L, et al.(2013) “ The cytokine response of U937-derived macrophages infected through antibody-dependent enhancement of dengue virus disrupts cell apical-junction complexes and increases vascular permeability”. *J Virol* ; 87: 7486–501.
46. St John AL, Rathore AP, Raghavan B, Ng ML, Abraham SN.(2013) “ Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase to dengue virus-induced vascular leakage”. *eLife* ; 2: e00481.

47. Virutnan P, Punyadee N, Noisakran S, et al. (2006) "Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement". *J Infect Dis* ; 193: 1078–88.
48. Whitehorn J, Simmons CP. (2011) "The pathogenesis of dengue". *Vaccine* ; 29: 7221–28.
49. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, et al. (2010) "Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1". *J Exp Med* ; 207: 793–806.
50. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. (2009). "Dengue virus pathogenesis: an integrated view". *Clin Microbiol Rev* ; 22: 564–81.
51. Wan SW, Lin CF, Yeh TM, et al. (2013) "Autoimmunity in dengue pathogenesis". *J Formos Med Assoc* ; 112: 3–11.
52. Halstead SB. (2008) "Pathogenesis: risk factors prior to infection". In: *Dengue* Edited by Scott B Halstead, Imperial College Press, London WC2H 9HE : 219–56.
53. Guzmán MG, Kourí G, Valdés L, Bravo J, Vázquez S, Halstead SB. (2002) "Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks". *Rev Panam Salud Publica* ; 11: 223–27.
54. Perez AB, Sierra B, Garcia G, et al. (2010) "Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever." *Hum Immunol* ; 71: 1135–40.
55. Sierra B, Alegre R, Pérez AB, et al. (2007) "HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection". *Hum Immunol* ; 68: 531–40.
56. Khor CC, Chau TN, Pang J, et al. (2011) "Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1". *Nat Genet* ; 43: 1139–41.
57. García G, del Puerto F, Pérez AB, et al. (2011) "Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection". *Hum Immunol* ; 72: 904–07.
58. Sierra B, Kourí G, Guzmán MG. (2007) "Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever". *Arch Virol* ; 152: 533–42.
59. Guzmán MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. (2002) "Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infection". *Int J Infect Dis*; 6: 118–24.
60. Gamble J, Bethell D, Day NP, et al. (2000) "Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock?" *Clin Sci (Lond)*; 98: 211–16.
61. Sai CY, Lee IK, Lee CH, Yang KD, Liu JW. (2013) "Comparisons of dengue illness classified based on the 1997 and 2009 World Health Organization dengue classification schemes". *J Microbiol Immunol Infect*; 46: 271–81.
62. Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, et al. (2011) "Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity". *PLoS Negl Trop Dis* ; 5: e1397.

63. Horstick OFJ, Lum L, Martinez E, et al. (2012) "Reviewing the development, evidence base and application of the revised dengue case classification". *Pathog Glob Health*; 106: 94–101.
64. Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, et al. (2011) "Dengue—how best to classify it". *Clin Infect Dis* ; 53: 563–67.
65. Rigau-Pérez JG1, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV.(1998) "Dengue and dengue haemorrhagic fever". *Lancet*. Sep 19;352(9132):971-7.
66. Kalayanarooj S1, Rimal HS, Andjaparidze A, Vatcharasaevee V, Nisalak A, Jarman RG, Chinnawirotpisan P, Mammen MP, Holmes EC, Gibbons RV.(2007) "Clinical intervention and molecular characteristics of a dengue hemorrhagic fever outbreak in Timor Leste,2005". *Am J Trop Med Hyg*. Sep;77(3):534-7
67. Phuong HL, Nga TT, Giao PT, Hung le Q, Binh TQ, Nam NV, Nagelkerke N, de Vries PJ.(2010). "Randomised primary health center based interventions to improve the diagnosis and treatment of undifferentiated fever and dengue in Vietnam". *BMC Health Serv Res*. Sep 21;10:275. doi: 10.1186/1472-6963-10-275.
68. Srikiatkachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, Kalayanarooj S, Nisalak A, Thomas SJ, Gibbons RV, Mammen MP Jr, Libraty DH, Ennis FA, Rothman AL, Green S.(2007). "Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study". *Pediatr Infect Dis J*. Apr;26(4):283-90
69. Lee TH, Lee LK, Lye DC, Leo YS (2016) "Current management of severe dengue infection". *Expert Rev Anti Infect Ther*. Oct 27:1-12.
70. Porwal J, Chauhan A.(2016) "Dengue Encephalitis". *J Assoc Physicians India*.Aug;64(8):99-100.
71. Khetarpal N, Khanna I.(2016). "Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies". *J Immunol Res*. 2016:6803098. doi: 10.1155/2016/6803098.
72. García G, González N, Pérez AB, et al. (2011) "Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders". *Int J Infect Dis* ; 15: e38–43.
73. Thomas SJ, Nisalak A, Anderson KB, Libraty DH, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Putnak R, Gibbons RV, Jarman R, Endy TP (2009). Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. *Am J Trop Med Hyg* ; 81(5): 825–833.
74. Teles FS. (2011) "Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: A review". *Anal Chim Acta*. Feb 14;687(1):28-42. Epub 2010 Dec 15.
75. Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, Vapalahti O, Piiparinen H. (2010) "Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology". *J Clin Virol*. Jan;47(1):49-53. Epub 2009 Dec 5.
76. Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. (1991) "An ELISA procedure for the diagnosis of dengue Infections". *Journal of Virological Methods*, 33:101–113.
77. Becerra A, Warke RV, de Bosch N, Rothman AL, Bosch I. (2008) "Elevated levels of soluble ST2 protein in dengue virus infected patients". *USA. Cytokine* ;41:114-20.

78. Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG (2007) Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 85: 43–45
79. Fink J, Gu F, Vasudevan SG (2006) Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol* 16: 263– 275.
80. Murgue B (2009) Severe dengue: questioning the paradigm. *Microbes Infect* 12: 113–118
81. Libraty DH, Acosta LP, Tallo V, Segubre-Mercado E, Bautista A, et al. (2009) A prospective nested case-control study of Dengue in infants: rethinking and refining the antibody-dependent enhancement dengue hemorrhagic fever model. *PLoS Med* 6:e10001
82. Conroy AL, Gelvez M, Hawkes M, Rajwans N, Tran V, Liles WC, et al. (2015) “Host biomarkers are associated with progression to dengue haemorrhagic fever: a nested case-control study”. *Int J Infect Dis*. Aug 6.
83. Koraka P, Murgue B, DeParis X, Van Gorp EC, Setiati TE, et al. (2004) “Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity”. *J Med Virol* 72: 445–450
84. Mairuhu AT, Peri G, Setiati TE, Hack CE, Koraka P, et al. (2005) “Elevated plasma levels of the long pentraxin, pentraxin 3, in severe dengue virus infections”. *J Med Virol* 76: 547–552
85. Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, et al. (2005) “Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue”. *Cytokine* 30: 359–365
86. Tseng CS, Lo HW, Teng HC, Lo WC, Ker CG (2005) “Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever”. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43: 99–102
87. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, et al. (2008) “Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity”. *BMC Infect Dis* 8: 86.
88. Long HT, Hibberd ML, Hien TT, Dung NM, Van Ngoc T, Farrar J, et al. (2009) “Patterns of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection”. *J Infect Dis*. Feb 15;199(4):537-46
89. Devignot S, Sapet C, Duong V, Bergon A, Rihet P, Ong S, et al. (2010) “Genome-wide expression profiling deciphers host responses altered during dengue shock syndrome and reveals the role of innate immunity in severe dengue”. *PLoS One*;5(7):e11671
90. Sun P, Garcia J, Comach G, Vahey MT, Wang Z, Forshey BM, et al. Sequential waves of gene expression in patients with clinically defined dengue illnesses reveal subtle disease phases and predict disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):e2298.
91. Chow KV, Sutherland RM, Zhan Y, Lew AM.(2016) “Heterogeneity, functional specialization and differentiation of monocyte-derived dendritic cells”. *Immunol Cell Biol*. Nov 8. doi: 10.1038/icb.2016.104.

92. P. Sun, K. Bauza, S. Pal et al.(2012) "Infection and activation of human peripheral blood monocytes by dengue viruses through the mechanism of antibody-dependent enhancement," *Virology*, vol. 421, no. 2, pp. 245–252
93. E. L. Azeredo, P. C. Neves-Souza, A. R. Alvarenga et al.,(2010) "Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever," *Immunology*, vol. 130, no. 2, pp. 202–216
94. L. Ziegler-Heitbrock (2007) "The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation," *Journal of Leukocyte Biology*,vol.81,no.3,pp.584–592
95. Seet RC, Lee CY, Lim EC, Quek AM, Yeo LL, et al. (2009) "Oxidative damage in dengue fever". *Free Radic Biol Med* 47: 375–380
96. Soundravally R, Sankar P, Bobby Z, Hoti SL (2008) "Oxidative stress in severe dengue viral infection: association of thrombocytopenia with lipid peroxidation"..*Platelets* 19: 447–454
97. Rojas EM, Diaz-Quijano FA, Coronel-Ruiz C, Martinez-Vega RA, Rueda E, et al. (2007) "Association between glutathione peroxidase levels and clinical manifestations of dengue". *Rev Med Chil* 135: 743–750
98. Morris SM Jr (2004) "Enzymes of arginine metabolism". *J Nutr* 134:2743S–2747S discussion 2765S-2767S.
99. Griffith, O. W., and D. J. Stuehr. (1995) "Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism". *Annu. Rev. Physiol* 57:707–736.
100. Bedard K, Krause KH (2007) "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology". *Physiol Rev* 87:245–313.
101. Pacher P, Beckman J, Llaudet L(2007)."Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease". *Physiol Rev* January ; 87(1): 315–424.
102. Knowles RG, Moncada S.(1994) " Nitric oxide synthases in mammals". *Biochem J.*;298(Pt 2):249–58.
103. MacMicking J, Xie QW, Nathan C.(1997) " Nitric oxide and macrophage function". *Annu Rev Immunol.*;15:323–50.
104. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. (2004) "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase". *Eur J Pharmacol.*;500:255–66.
105. Murray PJ, Wynn TA. (2011) "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets". *Nat Rev Immunol.*;11:723–37.
- 106.Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T (2003) "Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation". *J Physiol Pharmacol* 54: 469–487.
107. Kobayashi Y (2010) "The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation". *JLeukoc Biol* 88:1157–1162)
108. Thiemermann C. (1994)."The role of the L-arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock". *Advances in Pharmacology* 28:45-79

109. Olin MR, Armién AG, Cheeran MC, Rock RB, Molitor TW, Peterson PK. (2008) "Role of nitric oxide in defense of the central nervous system against *Mycobacterium tuberculosis*". *J Infect Dis.* Sep 15;198(6):886-9.
110. Calegari-Silva TC, Pereira RM, De-Melo LD, Saraiva EM, Soares DC, Bellio M, Lopes UG.(2009) "NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection". *Immunol Lett.* Dec 2;127(1):19-26.
111. Chen F, Demers M. Nitric oxide inhibits HIV tat-induced NF-kB activation. *American Journal of Pathology.* Vol. 155, No. 1, July 1999: 275-284.
112. Akaike T, Maeda H. (2000) "Nitric oxide and virus infection". *Immunology*; 101: 300-308.
113. Cairoli E, Scott-Algara D, Pritsch O, Dighiero G, Cayota A. (2008) "HIV-1 induced decrease of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression during in vivo and in vitro infection". *Clin Immunol.* Apr;127(1):26-33.
114. Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Rohenadl C, Lowenstein JM, et al. (1999) "Antiviral mechanisms of nitric oxide: inhibition of viral proteinase". *Immunity*;10:21-8.
115. Pillay V, Savage N, Laburn H (1994) Circulating cytokine concentrations and cytokine production by monocytes from newborn babies and adults. *Pflügers Arch* 428: 197–201
116. Della Bella S, Bierti L, Presicce P, Arienti R, Valenti M, et al. (2007) Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. *Clin Immunol* 122: 220–228
117. Rich EA, Mincek MA, Armitage KB, Duffy EG, Owen DC, et al. (1993) Accessory function and properties of monocytes from healthy elderly humans for T lymphocyte responses to mitogen and antigen. *Gerontology* 39: 93–108)
118. Valero N, Mosquera J, Anez G, Levy A, Marcucci R, de Mon MA. (2013) "Differential oxidative stress induced by dengue virus in monocytes from human neonates, adult and elderly individuals". *PLoS One*;8(9):e73221
119. . Stew SS, Martinez PJ, Schlesinger LS, Restrepo BI.(2013) "Differential expression of monocyte surface markers among TB patients with diabetes co-morbidity ". *Tuberculosis (Edinb).*Dec;93 Suppl:S78-82.
120. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. (2011) "Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease". *Nat Rev Immunol*;11(11):738-49.
121. Donath MY, Shoelson SE. (2011) "Type 2 diabetes as an inflammatory disease". *Nat Rev Immunol.*;11(2):98-107
122. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. (2007) "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization". *J Clin Invest.*;117(1):175-84.
123. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, et al. (2005) "Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity". *FEBS Lett.*;579(17):3487-92
124. Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, et al.(2008) " Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver". *J Hepatol.*;48(4):628-37).

125. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, et al. (2006) "Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance". *J Biol Chem* .281(36):26602–14
126. Surmi BK, Hasty AH. (2010) "The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue". *Vascul Pharmacol* 52(1–2):27–36
127. Nagareddy PR, Kraakman M, Masters SL, Stirzaker RA, Gorman DJ, Grant RW, et al. (2014) "Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity". *Cell Metab* 19(5):821–35
128. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. (2011) "Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation". *Science* 332(6035):1284–8.
129. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. (2003) "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue". *J Clin Invest* 112(12):1796–808
130. Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, et al.(2010) " Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity." *Diabetes* 59(7):1648–56
131. Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, Cui X, Tian X, Locksley RM, et al. (2014) "Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat". *Cell* 157(6):1292–308. doi:10.1016/j.cell.2014.03.066
132. Xiao X, Gaffar I, Guo P, Wiersch J, Fischbach S, Peirish L, et al. (2014) "M2 macrophages promote beta-cell proliferation by up-regulation of SMAD7". *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(13):E1211–20
133. Htun NS, Odermatt P, Eze IC, Boillat-Blanco N, D'Ácremont V, Probst-Hensch N (2015) "l's Diabetes a Risk Factor for a Severe Clinical Presentation of Dengue? - Review and Metaanalysis.". *PlosNegTRopDis* 9(4)
134. Lee IK, Hsieh CJ, Chen RF, Yang ZS, Wang L, Chen CM, et al. (2013) "Increased production of interleukin-4, interleukin-10, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by type 2 diabetes' mononuclear cells infected with dengue virus, but not increased intracellular viral multiplication". *Biomed Res Int.*; 2013:965853
135. Daniel Limonta GT, Capó Virginia, Guzmán María G. (2008) "Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient". *Diabetes Vasc Dis Res*; 2:213–14
136. Böyum A.(1968). Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*;97:7.
137. Singh KR, Pavri KM. (1967) "Experimental studies with chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*". *Acta Virol. Nov*;11(6):517-26.
138. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J.(1963)"Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium." *Cancer Res. Sep*;42(9):3858-63.
139. Mosmann T.(1983)."Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J Immunol Methods Dec* 16;65(1-2):55-63.

140. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) "Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction". *Anal. Biochem.* 162, 156-159
141. Lanciotti RS et. al. (1992) "Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction". *Journal of Clinical Microbiology*, 30:545–551.
142. Guía de evidencias y recomendaciones. Diagnóstico, metas de control ambulatorio y referencia oportuna de prediabetes y diabetes mellitus tipo 2 en adultos en el primer nivel de atención. Secretaría de Salud, México. Actualizada Marzo 2013.
143. Hazam RK, DEka M, Kar P. (2014). "Role of nitric oxide synthase genes in hepatitis E virus infection". *J Viral Hepat* ;21(9):671-9.
144. Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. "Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite". *Lab Invest.* 1996 Jul;75(1):77-85.
145. Basati G, Razavi AE, Abdi S, Sarrafzedejan N (2014). "Association of plasma leptin, homocysteine and nitric oxide levels with the presence and unstability of coronary artery disease". *Biomark Med.* 2014;8(3):405-12. doi: 10.2217/bmm.13.131.
146. Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK, Mattapally S, Kuncha M, Patra CR, Reddy PN, Banerjee SK (2015). "Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients". *PLoS One* ;10(4):e0125270.
147. Fontaine KA, Sanchez EL, Camarda R, Lagunoff M (2015). "Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replication". *J Virol* ;89(4):2358-66.
148. Supradish PO, Rienmanee N, Fuengfoo A, Kalayanarooj S (2011). "Dengue hemorrhagic fever grade III with diabetic ketoacidosis: a case report". *J Med Assoc Thai* ;94 Suppl 3:S233
149. Ubol S, Takol C, Jitra K, Chonticha K (2008). "Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells". *Virology* 376; 290–296
150. Miao F, et al. (2007). "Genome-wide analysis of histone lysine methylation variations caused by diabetic conditions in human monocytes". *J Biol Chem*;282(18): 13854–63.
151. Uziel O, Singer JA, Danicek V, Sahar G, Berkov E, Luchansky M, Fraser A, Ram R, Lahav M (2007). "Telomere dynamics in arteries and mononuclear cells of diabetic patients: effect of diabetes and of glycemic control". *Exp Gerontol* ;42(10):971-8.
152. Kong KF, Delroux K, Wang X, Qian F, Arjona A, Malawista SE, et al. (2008). "Dysregulation of TLR3 impairs the innate immune response to West Nile virus in the elderly". *Journal of Virology*;82:7613–2

CAPÍTULO XI

ANEXOS

TÉCNICAS Y PROTOCOLOS

AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

ELABORACION DE MEDIO DE CULTIVO RPMI 1640

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.
- Unidad de filtración de 0.22 μ m (500mL). Nalgene. Cat.S66128

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Pipetor.
- Bomba de vacío
- Potenciómetro. Hach. Modelo sensION+

Reactivos

- RPMI 1640 con L-Glutamina . Caisson . Cat.RPP10
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. GIBCO. Cat. 16000-044.
- Solución de antibiótico penicilina/estreptomina 100X. 100 mL. GIBCO. Cat. 15070-063.
- Aminoácidos no esenciales. 10 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 11140-050.

Protocolo

1. Se disuelve el sobre de RPMI 1640 en 1 L de agua estéril.
2. Se ajusta pH a 7.35-7.45
3. Se hace pasar la solución por un filtro 0.22 µm de 500 mL
4. Se almacena a 4°C hasta su uso.
5. Previo al aislamiento de CMN, se toman alícuotas a completar 40 mL en tubos Falcon de 50 mL y se suplementan.
6. Dos alícuotas se suplementan con 10% SBF, 1% aminoácidos no esenciales y 1% penicilina-estreptomicina (Medio de mantenimiento). Una alícuota se suplementa con 7% SBF, 1% aminoácidos no esenciales y 1% penicilina-estreptomicina (Medio de infección).

Observación: Emplear alícuotas recientemente suplementadas (no más de 1 día)

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES

Material

Obtención de sangre periférica

- Aguja 0.8 x 38mm . BD Vacutainer PrecisionGlide. Ref 360213
- Aguja 0.7 x 30 mm. Terumo 0197
- Jeringas sin aguja de 20 mL .Terumo SS+20LM
- Tubos Vacutainer 6 mL. BD Vacutainer. Ref. 368175

Aislamiento de células mononucleares

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.
- Tubos falcon de 50 mL. Marca Corning. Cat. 430291.
- Pipeta Pasteur.

Equipo

- Centrífuga clínica. Marca Thermo Scientific. Modelo IEC-CLR30R.
- Pipetor Pipet-Aid XP. Marca Drummond. Modelo 4-000-101.
- Campana de flujo laminar con filtros HEPA. Class II type A2. Marca NU AIRE. Modelo NU-425-400.
- Microscopio invertido. Marca Leica. Modelo DFC295
- Cámara de Neubauer. SUPERIOR
- Rotor de sangre (Test tube Rocker). Marca UNICO. Modelo L-TTR-100

Reactivos

- Histopaque 1077 . Sigma Aldrich. Cat 10771
- Solución buffer de fosfatos (PBS) 1X
- RPMI 1640 con L-glutamina. Caisson. Cat. RPP10

Protocolo

La sangre anticoagulada se coloca sobre el Histopaque-1077. Durante la centrifugación , la polisucrosa agrega los eritrocitos y rápidamente se sedimentan. Los granulocitos se vuelven hipertónicos incrementando su sedimentación , por lo que junto con los eritrocitos se mantienen en el fondo del tubo. Los linfocitos y otras células mononucleares permanecen entre la interfase de plasma/ Histopaque 1077. Las plaquetas excedentes se remueven con centrifugación a baja velocidad durante los pasos de lavados.

1. Atemperar por 3 horas el Histopaque 1077

2. Previa asepsia se toma muestra de sangre periférica (se toma 0.5 mL de Heparina con la jeringa de 20 mL en caso de toma directa y si es toma con Vacutainer se toman al menos 4 tubos conteniendo heparina). En el caso de los concentrados leucocitarios, con la jeringa de 20 mL se toma directamente la sangre de una de las entradas del concentrado. Mantener la sangre en rotor de tubos por 30 minutos.

3. En la campana de flujo laminar, primero se coloca 20 mL de histopaque 1077 en un tubo Falcon de 50 mL y posteriormente se coloca 20 mL de sangre anticoagulada. Observación: lentamente con una pipeta de serologica de 10 mL dejar caer una gota de sangre que forme una fase con el histopaque (no se debe mezclar) y posteriormente por la pared dejar caer el resto de la sangre.
4. En la centrífuga clínica (con los adaptadores adecuados para tubos falcon de 50 mL) se programa una centrifugación a 400g por 30 min a 26°C sin freno (dcl 0).
5. Se obtienen las cuatro interfases, y se retira al menos 2/3 del suero ; posteriormente, se absorbe el halo blanco en forma circular con pipeta automática (1 mL) y se coloca en un tubo cónico de 15 mL.
6. Se añade PBS1X estéril (10 mL para las CMN obtenidas a partir del concentrado leucocitario y 5 mL para las CMN obtenidas de sangre periférica). Se mezcla por inversión 5 veces.
7. Se centrifugan las CMN en centrífuga clínica (con los adaptadores adecuados para tubos de 15 mL) empleando el programa a 1500 rpm 15 min con freno (dcl 5).
8. Se retira el sobrenadante con pipeta Pasteur y se resuspende el pellet nuevamente con PBS1X.
8. El paso 6, 7 y 8 se repite 3 veces para las CMN del concentrado leucocitario y 2 veces para las CMN de sangre periférica.
9. Al término de los lavados, se retira el sobrenadante y se resuspende el botón celular con RPMI 1640 10%SBF.
10. Se realizan diluciones 1:50 y 1:100 en tubos eppendorf de 0.2 mL para el conteo de CMN de sangre periférica y de concentrado leucocitario, respectivamente. Ver apartado de conteo celular.

11. Se ajusta la cantidad de medio RPMI 1640 para obtener la densidad celular adecuada para cultivar en cada formato de placa de cultivo. Ver apartado de Métodos.

CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA DE CELULAS MONONUCLEARES

Tinción de Giemsa

Gustav Giemsa nació en Alemania en 1867 y el método de tinción que lleva su nombre fue diseñado para la demostración de parásitos de malaria, sin embargo; también se emplea en histología debido a que permite la tinción de cromatina y membrana nuclear, la metacromasia de algunos componentes celulares y de diferentes cualidades citoplasmáticas dependiendo del tipo celular. [Barcia JJ (2007). The Giemsa stain: its history and applications. Int J Surg Pathol. Jul;15(3):292-6]

Material

- Portaobjetos
- Pipeta automática 1 mL

Equipo

- Portaobjetos 25 x 75. Corning. Cat.2947

Reactivo

- Giemsa .CTR Scientific. Cat.06468
- Metanol absoluto. CTR Scientific. Cat.01212

Protocolo

1. En el caso de las células adheridas, se retira medio y se aplica 200 μ L de PBS1X por pozo . Las placas se dejan en hielo por 10 minutos para que las mismas se desprendan. Si son CMN recientemente aisladas , se toma directamente una alícuota.
2. Se toman los 200 μ L y se aplican 100 μ L en portaobjetos.Se deja secar a T° ambiente.
- 3.Se fija la muestra con metanol absoluto por 10 minutos
- 4.Se decanta el metanol de la laminilla
- 5.Se cubre la muestra con 0.5 mL del colorante y se deja por 40 minutos.
- 6.Se lava con agua corriente en 7 ocasiones

CULTIVO CELULAR : C6/36 Y Huh7 PARENTAL

SUPLEMENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Pipetor.

1. Medio Leibovitz (L-15).

Reactivos

- Medio de cultivo Leibovitz (L-15) con *L*-Glutamina. 500 mL. In vitro S.A. cat. ME-040.
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. HyClone. Cat. sh30396.03.
- Solución de antibiótico-antimicótico (100X) Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B, 100 mL, In vitro, S.A. Cat. A-07.
- Solución de aminoácidos no esenciales (100X), para medio mínimo esencial de Eagle, 100 mL, In vitro S.A. Cat. SR-05.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.

Protocolo

a) Medio al 10% SBF para mantenimiento de células C6/36.

Para suplementar 500 mL de medio L-15 al 10%, se requieren 50 mL de suero bovino fetal inactivado, 5.5 mL de solución antibiótico/antimicótico (100X) y 5.5 mL de solución de aminoácidos no esenciales (concentración final 1X). El medio al 10% es el que se debe utilizar para subcultivar.

b) Medio al 2% SBF para infección viral de células C6/36.

El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% con respecto al SBF. A 500 mL de medio L-15 se añaden 10 mL SBF + 5 mL de antibiótico/antimicótico + 5 mL de aminoácidos no esenciales.

2. Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced-DMEM).

Reactivos

- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced DMEM). 500 mL. GIBCO. Cat. 12491015.
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. GIBCO. Cat. 16000-044.
- Solución de antibiótico penicilina/estreptomicina 100X. 100 mL. GIBCO. Cat. 15070-063.
- Amino ácidos no esenciales. 10 mM(100X).100 mL.GIBCO.Cat. 11140-050.
- L-Glutamina. 200 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 25030081.

Protocolo

a) Medio con 2% de SBF para mantenimiento de células Huh7.

Para suplementar 500 mL de medio Advanced DMEM al 2% se requieren 10 mL de suero bovino fetal inactivado, 5 mL de amino ácidos no esenciales (100X), 5 mL de solución de antibiótico (100X penicilina/estreptomicina) y 5 mL de L- glutamina (100X).

b) Medio con 1% de SBF para infección viral de células Huh7.

Para suplementar 500 mL de medio Advanced DMEM al 1% se requiere 1 mL de suero bovino fetal inactivado, 5 mL de amino ácidos no esenciales (100X), 5 mL de solución de antibiótico (100X penicilina/estreptomicina) y 5 mL de L- glutamina (100X).

MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES : C6/36 y HuH7 PARENTAL

El subcultivo provee la oportunidad para expandir la población celular total, aplicar presión selectiva empleando en el medio un agente de selección y permitir la generación de cultivos réplica para caracterización, experimentación, preservación y congelación. Cuando el cultivo se encuentra aproximadamente al 90% de confluencia, es necesario realizar su subcultivo para asegurar la formación de monocapas y evitar los cúmulos celulares.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 13-678-11C.
- Botellas para cultivo celular de 25 cm².
 - c) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
 - d) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.
- Botellas para cultivo celular de 75 cm².
 - c) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430641.
 - d) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430199.
- Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Pipeta pasteur. Marca Corning. Cat. 101001440.

Reactivos

- Medio de cultivo
 - a) Medio L-15 (Leibovitz). Marca In vitro SA, cat. ME-040. Suplementado al 5% con suero bovino fetal.
 - b) Advanced DMEM. Marca GIBCO cat. 12491015. Suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.

- Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL. Marca GIBCO cat. 15050057.
- Aminoácidos no esenciales 100X. Marca GIBCO cat. 11140-050.
- L-glutamina 100X. Marca GIBCO cat. 25030081.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Bomba de vacío.
- Centrífuga.
- Incubadora con tanque de CO₂.
- Incubadora sin tanque de CO₂.
- Bomba de presión y vacío.

Protocolo para células C6/36

1. Golpear botella confluyente para eliminar células C6/36 que no se encuentren adheridas.
2. Aspirar el medio de cultivo.
3. Añadir medio nuevo a la botella (L-15, 10% SBF. 25 cm²: 5 mL medio, 75 cm², 10 mL medio).
4. Golpear botella con medio nuevo. De ser necesario, realizar raspado con gendarme para desprender la mayoría de células.
5. Al cultivo inicial añadir medio fresco y continuar creciendo.
6. Crecer a temperatura ambiente (23-24°C) con la tapa cerrada.
7. La botella sembrada alcanza confluencia entre 5 a 7 días, lo que permite hacer los subcultivos semanalmente.

Protocolo para células Huh7.

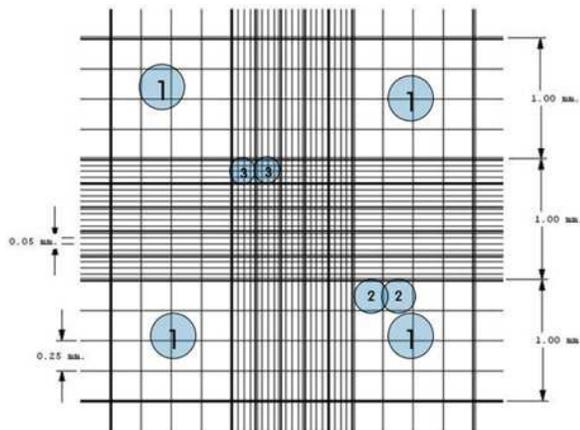
1. Aspirar medio de cultivo.
2. Lavar las células con 1 mL PBS1X para una botellas de 25 cm² y 3 mL para una botella de 75 cm² de superficie. Realizar movimientos

circulares para permitir que la solución entre en contacto con todas las unidades de la monocapa y pueda remover la mayor cantidad posible de detrito celular.

3. Retirar el PBS 1X por aspiración.
4. Para desprender la células, hay que añadir 1 mL de tripsina a botella de 25 cm² y 3 mL para una de 75 cm².
5. Incubar a 37°C durante 5 minutos (máximo 10 minutos).
6. Neutralizar la actividad de la tripsina adicionando un volumen 1:1 de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal.
7. Recolectar la suspensión celular en un tubo falcon de 15 mL.
8. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Cuidadosamente retirar el sobrenadante por aspiración.
10. Añadir medio de cultivo nuevo dependiendo del tamaño del botón celular obtenido. Generalmente el botón obtenido a partir de una botella semiconfluente de 25 cm² requiere ser resuspendido en 3 mL de medio nuevo; mientras que un botón celular proveniente de una botella semiconfluente de 75 cm² se puede resuspender en 4 a 5 mL de medio.
11. Resuspender completamente con ayuda de micropipeta automática de 1 mL hasta observar que no hay cúmulos flotando.
12. Preparar la botella de cultivo a sembrar con la cantidad de medio nuevo correspondiente y depositar en ella el volumen deseado de la suspensión celular.
13. Incubar a 37 °C con 5% CO₂.

RECUESTO CELULAR

La técnica de recuento celular utilizando el hemocitómetro o cámara de Neubauer fue diseñada por Louis-Charles Malasses. El dispositivo consta de una placa de vidrio con una cuadrícula grabada con láser en la cual es posible realizar el recuento de células o partículas en un volumen específico de un fluido. [Strober W (2001). ["Monitoring cell growth". In Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Sherach EM, Strober W. Current Protocols in Immunology. 5. USA: John Wiley & Sons. p. A.2A.1.]



Esquema de la cuadrícula de la cámara de Neubauer.

Para facilitar el recuento de células viables se utiliza un colorante vital, el azul tripano. Las células vivas captarán el colorante pero lo expelerán al medio, mientras que las células muertas lo mantendrán en su interior. El resultado se obtiene multiplicando el número de células contadas en la cámara de Neubauer (en los 4 cuadrantes) por el valor de la dilución realizada por el valor del factor de la cámara (1×10^4).

Material

- Tubos eppendorf de 0.2 mL.

Reactivos

- Medio de cultivo RPMI 1640 al 10% SBF para CMN.
- Medio de cultivo Advanced DMEM suplementado al 2% SBF para Huh7 parental.
- Colorante azul tripano. 100 mL. Marca GIBCO. Cat. 15250-061.
- Líquido de Türk para CMN.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio.
- Incubadora con tanque de CO₂.

Protocolo

1. Procesar las botellas de cultivo hasta la resuspensión y disgregación en medio nuevo de las células. Procurar una disgregación completa, sin que el medio presente cúmulos del cultivo flotando o suspendidos.
2. Tomar una alícuota del botón celular dependiendo de la dilución requerida y depositarla en el eppendorf de 0.2 ml . De igual forma depositar , medio de cultivo y azul tripan para completar la dilución.

Ejemplode dilución

Dilución 1:8 = Medio (60µL) +Azul tripán o líquido de Türk (10µL) + botón celular (10µL)

3. Homogenizar completamente antes de realizar la medición.
4. Depositar 10 µL de la suspensión en la cámara de Neubauer.
5. Utilizando el objetivo de 10X en el microscopio, contar el número de células vivas en las cuatro cuadrículas identificadas con un 1 (Figura. Esquema de la cuadrícula de la cámara de Neubauer)
6. Realizar el cálculo del total de células empleando la siguiente fórmula:

No. células/mL = (Promedio de los 4 cuadrantes) (Factor de dilución) (1×10^4)

7. Multiplicar el número de células/mL por el volumen en el cual se resuspendieron para obtener la cantidad total de células.
8. Con respecto al total de células contabilizadas y el volumen total, colocar el volumen correspondiente al número de células deseado en la botella o placa de cultivo.

CONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Fundamento

Cuando una línea celular se expande en números suficientes, la congelación de células permite la generación de bancos que pueden almacenarse sin que el material envejezca. De esta forma las células también estarán protegidas de contaminación, fallas en la incubadora o agotamiento del medio de cultivo. Se recomienda congelar $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células/mL en suero bovino fetal suplementado con un agente conservador (glicerol o DMSO) a una concentración del 5-10%, para proteger a las membranas del daño causado por los cristales de agua. La congelación debe ser lenta y se recomienda que el almacenamiento final se realice en un tanque de nitrógeno líquido, donde las células pueden permanecer viables durante varios años.

Material

- Cultivos celulares semiconfluentes.
- Micropipetas.
- Crioviales de 2 mL. Marca Corning. Cat. 430659.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.
- Cryo 1°C Freezing Container. Nalgene. Cat. 5100-001

Reactivos

- Dimetilsulfóxido (DMSO) grado Biología molecular. 100 mL. Marca Sigma. Cat. D2650.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Bomba de presión y vacío.
- Centrífuga.
- Ultracongelador Revco.

Protocolo para células C6/36.

1. Cuando se observa un cultivo confluyente de células C6/36 en una botella de 25 cm², permitir que crezcan un día más.
2. Raspar las células de la botella con ayuda de un gendarme (cell scraper).
3. Colectar medio en tubo falcon y centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos. Si las células no han formado un pellet, centrifugar de nuevo.
4. Aspirar el medio de cultivo y resuspender en 2 mL de medio nuevo.
5. Añadir 100 µL de DMSO a cada criovial y después depositar 900 µL de la suspensión celular.
6. Colocar en contenedor de crioviales (Cryo Freezing Container)
7. Almacenar a -80 °C.
8. Se recomienda hacer pases de la línea celular cada 6 meses.

Protocolo para células Huh7.

1. Cosechar células Huh7 siguiendo el protocolo de subcultivo hasta la obtención del botón celular.
2. Remover completamente el medio utilizado para neutralizar la tripsina, empleando una micropipeta de 1000 µL y procurando no romper el botón celular.
3. Resuspender células en medio nuevo necesario para obtener una suspensión con una concentración final de 1.5 a 2 millones de células por mL.
4. Preparar crioviales a congelar y depositar en cada uno 100 µL de DMSO.
5. Depositar en cada vial 900 µL de la suspensión de células.
6. Colocar en contenedor de crioviales (Cryo Freezing Container)
7. Almacenar a -80 °C.
8. Bajo esta técnica las células se mantienen viables por 1 año.

DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

El uso de una buena técnica de descongelación asegura que una alta proporción de las células congeladas sobrevivan. Es importante evitar manipulaciones bruscas de los volúmenes de las alícuotas congeladas, ya que las membranas celulares se encuentran altamente sensibilizadas.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Botellas para cultivo celular de 25 cm².
 - e) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
 - f) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.

Reactivos

- Medio de cultivo
 - a) Para C6/36: L-15 suplementado al 5% con suero bovino fetal.
 - b) Para Huh7: Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Microscopio.
- Incubadora.

Protocolo

1. Permitir atemperar el medio de cultivo a utilizar para sembrar las células al menos 40 minutos antes de la realización de la técnica. Después de sacar el medio del baño de agua se debe limpiar con etanol al 70% antes de permitir su entrada a la campana de bioseguridad.

2. Depositar 5 mL de medio de cultivo atemperado en una botella de 25 cm² o 10 mL para una botella de 75 cm²
3. Introducir el criovial en baño de agua a 37°C hasta observar la descongelación de su contenido.
4. Depositar suavemente la alícuota completa del criovial y homogenizar el contenido de la botella con movimientos circulares suaves.
5. Revisar al microscopio las células recién depositadas en la botella de cultivo.
6. Incubar botella de cultivo bajo las condiciones requeridas dependiendo del tipo de línea celular que se trate.

INFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON DENGUE

CULTIVO VIRAL: AMPLIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE EN CELULAS C6/36

El cultivo viral del dengue es el estándar de oro para la confirmación y aislamiento de casos positivos. Empleando líneas celulares permisibles como C6/36, TRA-284-SF, AP-61 o Vero se pueden obtener grandes cantidades de partículas virales viables a partir de aislados de pacientes o macerados de mosquitos.

El proceso involucra la obtención del cultivo celular semiconfluyente, la adición del suero infeccioso y la adsorción de las partículas virales en la membrana celular. Se permite que el virus se replique de 7 a 14 días dependiendo del serotipo presente para su posterior cosecha o análisis por inmunofluorescencia. Los virus del dengue suelen ser citopáticos.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 11-678-11C.
- Cultivos confluentes de células C6/36 en botellas sin filtro de 25 cm².

Reactivos

- Medio L-15 suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Pipetor.

Protocolo

1. Sembrar células C6/36 hasta obtener una monocapa confluyente bajo las condiciones indicadas en el protocolo correspondiente.
2. Aspirar el medio de cultivo.
3. Lavar las células con 3 mL de solución PBS 1X para remover el detrito celular. Realizar movimientos circulares para limpiar la monocapa completa.
4. Remover el PBS 1X.
5. Recambiar el medio por L-15 al 2% SBF, en un volumen adecuado para cubrir solamente las células (25 cm²: 2 mL, 75 cm²: 3.5 mL)
6. Adicionar al medio 25 µL del aislado viral.
7. Homogenizar la botella con movimientos circulares para asegurar que el virus tenga contacto con la monocapa celular completa.
8. Incubar a 37°C durante una hora al menos.
9. Transcurrida la hora de incubación, completar volumen del medio de cultivo a los indicados en el apartado de subcultivo celular.
10. Incubar a temperatura ambiente sin fuente de CO₂.

COSECHA Y ALMACENAMIENTO DE AISLADOS VIRALES

Los virus en cultivo se pueden cosechar para establecer bancos con prototipos virales o para confirmar casos de pacientes enfermos por inmunofluorescencia o técnicas moleculares. Dependiendo del serotipo infectante, el tiempo de cultivo varía. Generalmente dengue 1 y 2 son de crecimiento rápido y la mayoría son líticos, mientras que dengue 3 y 4 requieren más tiempo y no ocasionan cambios morfológicos tan notorios en la monocapa celular. La suspensión células/virus se debe tratar con una mezcla de suero bovino fetal y bicarbonato de sodio para después almacenarse en un ultracongelador. Se puede realizar una purificación mayor del aislado por centrifugación diferencial.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 11-678-11C.
- Raspadores celulares de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL estériles.

Reactivos

- Suero Bovino Fetal.500 mL. HyClone.Cat. sh30396.03.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% , In vitro S.A.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Pipetor.
- Hielera.
- Ultracongelador Revco.

Protocolo

1. Transcurridos de 12 a 15 días de la infección celular, se puede cosechar el virus.
2. Raspar con gendarme la botella.
3. Recolectar el medio de cultivo y coleccionar alícuotas de 180 μ L en tubos eppendorf de 0.2 mL.
4. Almacenar a -70°C .

INMUNOHISTOQUIMICA

En el estudio del virus del dengue se pueden emplear anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos específicos de la familia Flavivirus . La reacción antígeno anticuerpo es demostrada por inmunofluorescencia secundaria o indirecta (también conocida por sus siglas IFI) en la cual se hace uso de dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se une a al molécula diana, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo, reconoce al primario y se une a él. Esta técnica se puede emplear para la detección del virus del dengue en cortes de tejidos y/o cultivos celulares. [Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. Am J Trop Med Hyg. 1982 Jul;31(4):830-6.]

Material

- Portaobjetos
- Pipetas automáticas

Reactivos

- Anti-Flavivirus Group Antigen Antibody, clone D1-4G2-4-15 (EMD Millipore Corporation, Germany, dilución 1:3000)
- Kit ImmPACT™ DAB *EqV* Peroxidase substrate (Vector Laboratories®)

Equipo

- LabGenius Orbital Shaker. Daigger Scientific. Cat.EF9769

Protocolo

1. Se desprenden las CMN cultivadas en placas de 24 pozos con 24 h.p.i. dejando la placa en hielo por 10 minutos para permitir el desprendimiento.
2. Recolectar el sobrenadante en tubo eppendorf 0.6mL y se centrifuga a 500rpm por 5 min
3. Se decanta el sobrenadante y resuspende el pellet en 30 μ L de PBS1X
4. Se toman 10 μ L y se aplican en un portaobjetos dejando secar por 15 min al aire ambiente.
5. Se fija con acetona fría toda la noche(16 hrs)
6. Se deja secar el portaobjetos a temperatura ambiente
7. Agregar 15 μ L de anticuerpo 4G2 (anticuerpo primario) en una dilución 1:3000 con agua miliQ estéril e incubar 35 min a 37°C en cámara húmeda
8. Lavar 5 veces con PBS1X
9. Se agregan 12 μ L de anticuerpo secundario IgG anti-mouse sobre la muestra
10. Incubar 1 hr a 37°C en cámara húmeda
11. Lavar 5 veces con PBS1X
12. Mezclar 500 μ L de reactivo 1 con 500 μ L de reactivo 2 del kit ImmPACT™ DAB *EqV* Peroxidase substrate
13. Colocar 20 μ L de la mezcla a cada muestra e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
14. Lavar por 5 minutos con agua miliQ

PROCOLOS PARA MANEJO DE RNA

EXTRACCIÓN DE RNA DE AISLADOS VIRALES Y DE CELULAS Huh7 PARENTAL

TRizol (Invitrogen), es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que se emplea para la extracción de RNA basada en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi. [*Anal. Biochem.* 162 :156-9, 1987.] Durante la homogenización de la muestra, el reactivo mantiene la integridad del RNA mientras lisa las células y disuelve componentes celulares. La adición de cloroformo y la posterior centrifugación, separa la mezcla en dos fases (acuosa y orgánica). El RNA se precipita añadiendo isopropanol a la fase acuosa y se recupera por centrifugación.

Material

- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Microtubos de 2 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-200.
- Pipetas automáticas.

Reactivos

- TRizol.
- Cloroformo. 500 mL. Sigma-Aldrich. Cat. 2432-500mL.
- Isopropanol.
- Etanol al 70% en agua DEPC.
- Agua DEPC.

Equipo

- Centrifuga refrigerada.
- Campana de flujo laminar.

Protocolo

1. Remover el medio de cultivo por aspiración de la botella o de los pozos de la placa de cultivo. No hacer lavado con PBS.
2. Fase de homogenización: Adicionar TRIzol de acuerdo al formato de placa que se empleó (24 pozos añadir 200 μ L por pozo y a la de 6 pozos añadir 500 μ L por pozo). En el caso de los aislados virales, se añadirá una proporción 1:1 (aislado viral:TRIzol).
3. Fase de separación: Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.
4. Transferir la mezcla de TRIzol a un tubo eppendorf de 2 mL.
5. Añadir lo correspondiente a cloroformo frío por cada 200 μ L de TRIzol empleados. Mezclar por inversión 15 segundos.
6. Incubar el tubo en hielo de 2 a 3 minutos.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
8. Fase de precipitación: Recuperar la fase acuosa y adicionarle 500 μ L de isopropanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado.
9. Incubar a -80°C durante una hora o toda la noche.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
11. Fase de lavado: Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de etanol 70% (con agua DEPC) frío por cada mililitro de TRIzol empleado. Mezclar con vórtex.
12. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
13. Fase de resuspensión: Retirar etanol sin tocar la pastilla con la puntilla.
14. Dejar secar a temperatura ambiente.
15. Resuspender la pastilla en 20-30 μ L de agua DEPC con 1 μ L de inhibidor de RNAasas (RNAaseOUT)

SÍNTESIS DE CDNA (RETROTRANSCRIPCIÓN).

En la reacción de retrotranscripción, se sintetiza cDNA (DNA complementario) a partir del RNA por acción de la enzima retrotranscriptasa reversa. En este protocolo la enzima empleada es la MMLV (Molones Murine Leucemia Virus), obtenida de forma recombinante y purificada a partir de E. coli. Posee actividad 5'-3' ribonucleasa H, la cual permite alargar las cadenas de cDNA hasta una longitud mayor a 7 Kb.

Material

- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.

Reactivos

- Buffer RT 5X
- Random primers 0.02 mg/mL
- DTT 0.01 M
- dNTPs 10 mM
- Inhibidor de RNAsas 40 U/mL
- Agua mili Q tratada con DEPC

Equipo

- Pipetas automáticas.
- Termociclador. Marca Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700.

Protocolo

1. Colocar en un tubo eppendorf de 0.2 mL 1 μ L de random primers, 3 μ L de RNA y 7.5 μ L de agua DEPC.
2. Colocar los tubos en el termociclador a 72 °C durante 10 minutos.
3. Incubar la muestra en hielo durante 3 minutos.

4. Preparar la siguiente mezcla de reacción: 4 μL de buffer RT 5X, 2 μL de DTT 0.1 M, 0.5 μL de inhibidor de RNAsas y 1 μL de dNTPs 10 mM.
5. Añadir 8 μL de la mezcla de reacción al tubo que se incubó en hielo, así como 1 μL de la enzima MMLV.
6. Colocar el tubo en el termociclador y continuar con el siguiente programa:
 - a) 10 minutos/ 25 °C.
 - b) 60 minutos/ 37 °C.
 - c) 5 minutos/ 94 °C.
 - d) 10 minutos/ 4 °C.
7. Terminando el programa del termociclador, retirar el tubo que contiene el cDNA y almacenarlo a -20°C hasta su uso.

Condiciones de reacción	
Reactivo	Volumen
Buffer RT 5X	4 μL
DTT 0.1 M	2 μL
RNAse out	0.5 μL
dNTPs 10 mM	1 μL
RT-MMLV 200U/mL	1 μL
Volumen total	8.5 μL

Programa del termociclador		
Paso	Temperatura	Tiempo
1	72 °C	10 minutos
2	25 °C	10 minutos
3	37 °C	60 minutos
4	94 °C	5 minutos
5	4 °C	10 minutos

EXTRACCION DE RNA POR COLUMNA DE CELULAS MONONUCLEARES

Esta técnica de extracción está basada en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas. Con la adición de iones caotrópicos se crea un entorno hidrofóbico alrededor del DNA. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a la membrana de sílica de las columnas, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes no se unen y, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica mediante tampones de elución con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos) o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la membrana.

Material

- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Pipetas automáticas.

Reactivos

- β -mercaptoetanol
- Buffer RLT
- Buffer RW1
- Buffer RPE
- Etanol al 70% en RNase free water.
- Agua DEPC.

Equipo

- Centrífuga refrigerada.
- Campana de flujo laminar
- Microcentrífuga. Marca Eppendorf. Modelo 5415D

Protocolo

1. Antes de comenzar se preparará, de acuerdo al volumen de buffer de lisis que se empleará, 10 μ L de β -mercaptoetanol por cada 1 mL de buffer RLT y dejar a 4°C por al menos 40 minutos. Debe estar frío antes de usar.
2. En cada pozo de placa de 24 pozos se retira medio y se añaden directamente 150 μ L de RLT con β -mercaptoetanol o bien si consideramos que tenemos entre 1 a 5 x 10⁶ células se agrega 350 μ L directamente al pellet.
3. Se recolecta el contenido del pozo
4. Se añade al lisado 1 volumen de etanol al 70% y se mezcla por pipeteo (No centrifugar)
5. Transferir 700 μ L de la muestra (incluso si hay precipitado) a la columna de sílica del kit.
6. Centrifugar 15 segundos a >10,000 rpm
7. Tirar el contenido del tubo colector y reusarlo
8. Añadir 700 μ L de buffer RW1 a la columna
9. Centrifugar 15 segundos a >10,000 rpm
10. Quitar la columna con cuidado y cambiar el tubo colector por uno nuevo.
11. Añadir 500 μ L de RPE a la columna y centrifugar 15 segundos a >10,000 rpm
12. Repetir paso 11
13. Colocar columna en microtubo de 1.5 mL
14. Añadir 20 μ L de RNase free water
15. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO



Verónica Bravo de la Cruz

Candidata para el grado de Maestro en Ciencias en el programa de Biología Molecular e Ingeniería Genética de la Facultad de Medicina, UANL.

Tesis: Efecto de la infección con el virus del dengue en la modulación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y su asociación con diabetes mellitus

Campo de estudio: Ciencias de la salud.

Biografía:

Nacida en México , D.F. el 15 de Junio de 1983. Radicada en Monterrey , Nuevo León desde hace 25 años. Mis padres Bertín Epitacio Bravo Marmolejo y María de Jesús de la Cruz Escobar. Mi hermano Alfonso Bravo de la Cruz.

Educación:

Médico Cirujano y Partero , Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (Agosto 2000- Febrero 2007)

Especialidad en Pediatría, Hospital Universitario “Dr. José E. González” , Universidad Autónoma de Nuevo León (Febrero 2009- Febrero 2012)

Experiencia profesional:

Profesor de Pediatría y encargada de la consulta externa #14 de Pediatría , Hospital Universitario “Dr. José E. González” (Marzo 2012- Marzo 2013)

Médico de urgencias pediátricas, Hospital Christus Muguerza Alta Especialidad (Septiembre 2013-Julio 2014)

Contacto:

vbravocr@gmail.com