



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN**  
**DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA**

# **Efecto del virus del dengue serotipo 2 en la proliferación de linfocitos T**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN  
CIENCIAS EN INMUNOLOGIA**

**PRESENTA**

Q.F.B. Carlos Jorge Fuentes Miranda

**Directores de tesis:**

Dra. Maria Maximina Moreno Altamirano

Dr. Francisco Javier Sánchez García

**México D.F 2009**

## **Agradecimientos**

Mi más profunda gratitud a mis padres y hermanos por su comprensión, confianza y apoyo incondicional ya que sin ellos no hubiera sido posible llegar hasta este momento tan importante de mi vida y permitirme lograr la terminación de otra de mis metas.

Expreso mi más profundo agradecimiento a la Dra. Bertha y Dr. Javier por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su supervisión en el desarrollo de esta tesis, por su apoyo y por haber contribuido con su experiencia en mi formación académica.

Agradezco a mis sinodales, Doctores Oscar Rojas Espinosa, Julieta Luna Herrera, Blanca Estela García Pérez y María del Rosario Salinas Tobón, sus valiosos comentarios y sugerencias así como su paciencia y tiempo dedicado al presente trabajo lo que contribuyó sustancialmente a hacer posible este trabajo.

Gracias a mis compañeros, en especial Karina, Gabriela y Lupita y a todos aquellos que de alguna forma estuvieron conmigo, por su apoyo y por hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia agradable y sobre todo por su amistad.

Este proyecto se realizó bajo la dirección de la Dra. María Maximina Bertha Moreno Altamirano y del Dr. Francisco Javier Sánchez García en el laboratorio de inmunorregulación del Departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Durante mis estudios de Maestría recibí beca PIFI del IPN (20090305)

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
<b>Índice</b>	<b>I</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>III</b>
<b>Lista de tablas y figuras</b>	<b>V</b>
<b>Resumen</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract</b>	<b>VIII</b>
1. Introducción	1
1.1. Agente causal de la enfermedad del dengue	2
1.2. Transmisión del virus dengue	3
1.3. Infección con el virus del dengue	4
1.4. Replicación del virus del dengue	6
1.5. Manifestaciones clínicas en la enfermedad del dengue	7
1.6. Participación de la respuesta inmune en la infección con el virus del dengue	7
2. Participación de los linfocitos T en la infección con el virus del dengue	9
2.1. Mecanismos empleados para suprimir la función de LT	13
3. Justificación	16
4. Hipótesis	16
5. Objetivos	17
5.1. Objetivo general	17
5.2. Objetivos particulares	17
6. Material y Métodos	18
6.1. Obtención del lote de virus dengue serotipo 2	18
6.2. Determinación de la replicación del virus del dengue mediante la detección de la proteína no estructural -1 (NS1)	18
6.3. Titulación del virus del dengue por el método de hemaglutinación	19
6.4. Titulación del virus del dengue por el método de unidades formadoras de placas (PFU)	19
6.5. Obtención de células mononucleares de sangre periférica humana	20

---

<b>6.6.</b> Obtención de linfocitos T a partir de una suspensión de células mononucleares de sangre periférica humana	21
<b>6.7.</b> Análisis de la infección de linfocitos T infectados por el virus del dengue	22
<b>6.8.</b> Análisis de la viabilidad de los linfocitos T	22
<b>6.9.</b> Análisis de la proliferación de linfocitos en la población mixta de células mononucleares de sangre periférica humana expuestas con el virus del dengue	23
<b>6.10.</b> Análisis de la proliferación de linfocitos enriquecidos por columnas de nylon	25
<b>6.11.</b> Movilización de calcio intracelular en linfocitos T	25
<b>7.</b> Resultados	27
<b>7.1.</b> Obtención del virus del dengue serotipo 2	27
<b>7.2.</b> Análisis de la replicación del virus del dengue serotipo 2 mediante la detección de la proteína no estructural 1	28
<b>7.3.</b> Titulación del virus del dengue serotipo 2 por el método de hemaglutinación	29
<b>7.4.</b> Titulación del virus del dengue serotipo 2 por el método de unidades formadoras de placas	30
<b>7.5.</b> Análisis de la infección de linfocitos T con el virus del dengue serotipo 2 estimulados y sin estimular con PMA/Ionomicina	31
<b>7.6.</b> Análisis de la viabilidad de linfocitos T incubados con y sin el virus del dengue serotipo 2	32
<b>7.7.</b> Análisis del efecto del virus del dengue serotipo 2 en la proliferación de linfocitos T	33
<b>7.8.</b> Análisis del efecto del virus del dengue serotipo 2 en la movilización de calcio intracelular en linfocitos T	37
<b>8.</b> Discusión	39
<b>9.</b> Conclusiones	44
<b>10.</b> Bibliografía	45

# Lista de abreviaturas

---

ADEs	Amplificación de la infección viral dependientes de anticuerpo
AP-1	activador de proteína 1
DEN	Dengue
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
CPA	Célula presentadora de antígeno
CsA	Ciclosporina A
FC $\gamma$ R	Receptor Fc gama
FD	Fiebre dengue
GM-CSF	Factor estimulante de crecimiento de granulocitos y monocitos
FH	Fiebre hemorrágica
HTLV-1	Virus de leucemia humano de las células T tipo I
IL	Interleucina
IFN- $\gamma$	Interferón gama
KDa	Kilodaltones
LCMV	Virus de coriomeningitis linfocítica
LPS	lipopolisacárido
LTc	Linfocitos T citotóxico
LTh	Linfocitos T cooperador
MHC	Complejo principal de Histocompatibilidad
NF-AT	factor nuclear de las células T activadas
NF $\kappa$ B	Factor de transcripción kappa B
NK	Células asesinas naturales (del inglés Natural killer)
NS	No estructurales
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés Open Read Frame)

PKC	Proteincinasa C
PMA	forbol 12-acetato 13-miristato (del ingles phorbol 12-myristate 13-acetate)
PLC	Fosfolipasa C
RE	Retículo endoplásmico
SC	Síndrome de choque UTR
TCR	Receptor de las células T (del ingles T cell receptor)
TNF $\alpha$ , $\beta$	Factor de necrosis tumoral alfa
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

---

<b>Figura 1. Estructura del virus del dengue</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2. Estructura genómica del virus del dengue</b>	<b>3</b>
<b>Figura 3. Mecanismos de infección del virus del dengue</b>	<b>6</b>
<b>Figura 4. Vías de activación en linfocitos T in <i>Vitro</i></b>	<b>12</b>
<b>Figura 5. Propagación del virus del dengue en células C6/36</b>	<b>27</b>
<b>Figura 6. Determinación de la glicoproteína NS1 del virus del dengue</b>	<b>29</b>
<b>Figura 7. Unidades formadoras de placas</b>	<b>30</b>
<b>Figura 8. Infección de linfocitos T con DEN2</b>	<b>31</b>
<b>Figura 9. Porcentaje de viabilidad de linfocitos T</b>	<b>32</b>
<b>Figura 10. Efecto del virus del dengue en células mononucleares activados con anticuerpos <math>\alpha</math>CD3/<math>\alpha</math>CD28</b>	<b>33</b>
<b>Figura 11. Efecto de DEN2 en la proliferación de linfocitos T con anticuerpos <math>\alpha</math>CD3/<math>\alpha</math>CD28.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 12. Efecto de DEN 2 en la proliferación de linfocitos T activados con PMA/Ionomicina.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 13. Efecto de DEN2 en linfocitos T activados con PMA/Ionomicina periférica proliferación de linfocitos T</b>	<b>36</b>
<b>Figura 14. Efecto de DEN2 en la proliferación de linfocitos T activados con PMA/Ionomicina</b>	<b>37</b>
<b>Figura 15. Ensayo de movilización de calcio</b>	<b>38</b>
<b>Figura 16. Efecto de DEN2 en la movilización de calcio intracelular en linfocitos T</b>	<b>38</b>

<b>Tabla 1. Condiciones para la titulación del virus por hemaglutinación</b>	<b>19</b>
<b>Tabla2. Ensayos de proliferación celular</b>	<b>24</b>

# Resumen

El Dengue es una enfermedad infecciosa grave de origen viral transmitida por mosquitos. Constituye una causa importante de muerte en el mundo infectando a personas que viven en áreas urbanas que se localizan en regiones tropicales y subtropicales.

Se puede manifestar en tres formas denominadas fiebre por dengue (dengue Clásico), Fiebre Hemorrágica y Síndrome de Choque cuyo principales síntomas suelen ser fiebre, dolor intenso en las articulaciones y en músculos. Las últimas dos formas son complicaciones potencialmente fatales caracterizadas por permeabilidad vascular anormal.

En los últimos años la importancia en comprender la enfermedad ha incrementado, sin embargo los avances que se tiene no son suficientes. Como consecuencia, no existe un tratamiento o métodos eficientes de prevención, ocasionado que en la actualidad la enfermedad se convierta en un problema creciente de salud.

Se ha encontrado que el virus dengue es capaz de emplear diversos mecanismos que le ayudan a evadir el sistema inmune y sustentar el ambiente apropiado para su replicación y propagación en el huésped. Por lo tanto, algunas líneas de investigación se enfocan en estudiar y entender los mecanismos implicados en la enfermedad, a fin de contribuir al desarrollo de terapias más específicas que ayuden al control y cura de la infección.

Una manifestación clínica importante que se ha encontrado es la reducción del número de linfocitos T durante las etapas agudas de la infección. En base a esto, con la finalidad de conocer si es por causa del virus del dengue, esta tesis se enfoca en conocer el efecto del virus dengue en la proliferación de linfocitos T.

El efecto se determinó mediante análisis de proliferación celular y con la finalidad de proponer un mecanismo por el cual este induciendo la inhibición de la proliferación de linfocitos T activados se determinó la movilización de calcio intracelular. Para esto utilizamos linfocitos T humanos obtenidos de células mononucleares de sangre periférica enriquecidos por columnas de Nylon. Los linfocitos T se activaron con PMA/Ionomicina y anticuerpos  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 y se incubaron con el virus del dengue. Encontramos, que el virus dengue es capaz de inhibir la proliferación de LT activados con PMA/Ionomicina y  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. La inhibición de la proliferación no involucra la alteración de la movilización de calcio intracelular.

## Abstract

Dengue is an infectious disease of viral origin transmitted by mosquitoes. It is currently a major cause of death in the world, infecting people living in urban areas located in tropical and subtropical regions.

There are three forms of this disease; dengue fever, Hemorrhagic Fever and Shock Syndrome, whose main symptoms are fever, severe pain in the joints and muscles. The latter two are characterized by abnormal vascular permeability.

In recent years, the importance to understand the disease has increased, however the progress is not sufficient. So far as a result, there is no treatment or efficient methods of prevention.

Moreover, it has been found that dengue virus is capable of using various mechanisms to evade the immune system to sustain the environment for its replication and spread. Therefore, some lines of research have focused in studying and understanding the pathogenic mechanisms involved in the disease to help to develop more specific therapies, control and cure the infection.

One important manifestation is the reducing number of T cells during the acute stage of infection. On this basis it is important to know whether it is caused by the dengue virus itself. This thesis focuses on analyzing the effect of dengue virus in the proliferation of T lymphocytes.

Cell proliferation assays on freshly isolated human T cells in response to  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 antibodies and PMA/Ionomycin were carried out with the aim of analyzing if intracellular calcium mobilization plays a role in the dengue virus-induced inhibition of T cell proliferation.

We found that the dengue virus impairs the proliferation of the lymphocytes activated with PMA/ionomicina or  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 antibodies but, apparently, inhibition of proliferation is not due to alterations in the mobilization of intracellular calcium.

# 1. Introducción

El término dengue se originó en América entre 1827 y 1828 a raíz de una epidemia en el Caribe. Sin embargo, el reporte más antiguo data de 265-420 D.C. que se encuentra en la enciclopedia China de “Síntomas de la enfermedad y remedios”, publicada por primera vez durante la dinastía Chin (Cabeza, 2005; Vargas y cols. 2005).

Las primeras epidemias por dengue en Latinoamérica y el Caribe ocurrieron en las Antillas Francesas en 1635 y en Panamá en 1699. La primera vez que se describió la fiebre hemorrágica y el Síndrome de choque como entidades clínicamente definidas fue hasta 1954 durante el brote ocurrido en Filipinas (Vargas y cols., 2005). En 1981 el dengue tomó notoriedad con el brote de dengue hemorrágico en Cuba seguido de otro, en Venezuela (Cabezas, 2005; Vargas y cols. 2005).

La causa de la diseminación del virus dengue se atribuye principalmente a la distribución geográfica de los mosquitos vectores, el más importante es el *Aedes aegypti*. Además, las guerras, viajes, migraciones, crecimiento demográfico, urbanización descontrolada, deterioro de los servicios de agua y su almacenaje inadecuado, así como la falta de políticas de prevención han contribuido a la expansión numérica del vector, lo cual ha dado como resultado un aumento en la tasa de infección (Vargas y col. 2005).

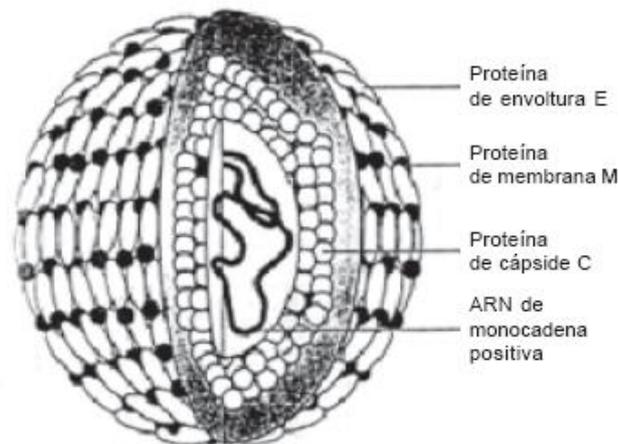
En la actualidad el dengue es la segunda enfermedad más importante de las transmitidas por mosquitos que afectan a los seres humanos, después de la malaria. Se estima que la tasa de infección en el mundo es de más de 100 millones de individuos al año, de los cuales 500,000 desarrollan las manifestaciones clínicas más severas (Carrington y col. 2005).

Afecta a individuos de cualquier edad, es una causa importante de hospitalización y muerte de niños menores de 15 años de edad (Gubler, 1998). El cuadro clínico que suelen presentar los pacientes es el de la forma benigna de la enfermedad, pero esto sólo sucede en la primera infección, en las infecciones consecutivas con los diferentes serotipos, se aumenta el riesgo de desarrollar los cuadros clínicos más severos (Lin y col. 2002).

## 1.1. Agente causal de la enfermedad del dengue

El virus dengue es un virus lítico del cual existen cuatro serotipos (Serotipo 1, serotipo 2, serotipo 3 y serotipo 4) todos ellos causantes de la enfermedad. El virus dengue pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *flavivirus*. Este grupo abarca a más de 70 agentes virales de los cuales al menos 30 causan infecciones serias al humano (Seema y col. 2005; Vargas y col. 2005, Ray y Shi, 2006).

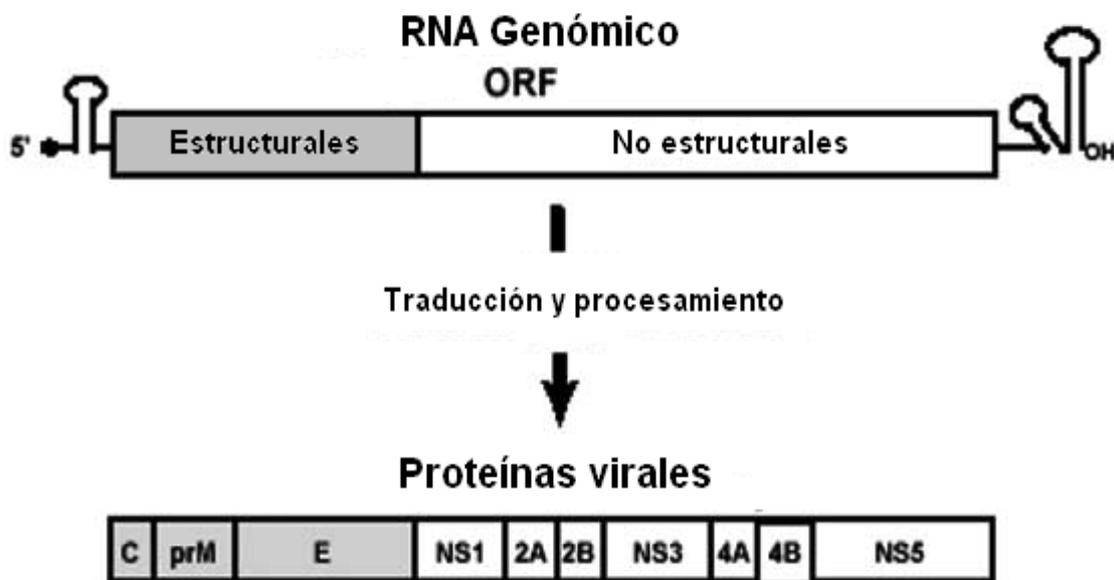
El virión maduro mide aproximadamente 50 nm de diámetro. Su genoma está contenido en una molécula de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva (RNA (+)) constituida por aproximadamente 11,000 nucleótidos, envuelta en una cápside proteica con forma icosaédrica de 30 nm la cual, a su vez, esta cubierta por una bicapa lipídica de 40 A° de grosor. En la bicapa existen dos proteínas importantes para el proceso de infección; la proteína de membrana (M) y la de envoltura (E) (Bressanelli y col., 2004; Seema y Jain S. 2005; Cabezas, 2005). Figura 1.



**Figura 1. Estructura del virus dengue.** Tomado de: Cabezas, 2005.

Los genomas de los cuatro serotipos del virus comparten una homología de secuencia de aproximadamente un 70% (Vargas y col. 2005). Cada genoma codifica para un precursor poliproteico de aproximadamente 3,400 aminoácidos del cual se generan 10 proteínas virales: tres proteínas estructurales y 7 no

estructurales en el siguiente orden: NH<sub>2</sub>-C-prM-E-NS1-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COOH (figura 2). Las proteínas core (C), pre-membrana (prM) y Envoltura (E) forman la estructura de los viriones, mientras que las proteínas no estructurales (NS) son proteínas requeridas para la replicación y ensamble del virión. Algunas proteínas NS están asociadas con mecanismos virales de evasión de la respuesta inmune (Mackenzie y col., 1999; Ray y Shi, 2006) como es el caso con NS4B, NS2A y NS4A que inhiben la estimulación del gen para IFN- $\beta$  por interferencia con la función del factor de transcripción STAT1 (García-Sastre y col., 2003).



**Figura 2. Estructura genómica del virus, mostrando las regiones codificantes para las proteínas estructurales y no estructurales.** Tomada y modificada de Debashish y Pei-Yong. 2006

## 1.2. Transmisión del virus del dengue

El principal vector que transmite el dengue es el mosquito *Aedes aegypti*, el cual se encuentra alrededor del mundo entre las latitudes 45° N y 35° S, en las zonas isotermales cercanas a los 20°C, sin embargo no es el único vector. Otro vector es el *Aedes albopictus* el cual posee una mayor termotolerancia a descensos de la temperatura ambiental, siendo considerado como el principal vector en áreas en donde *Aedes aegypti* está ausente (Vargas y cols. 2005)

La transmisión del virus dengue al humano inicia con la picadura del vector en la piel del humano, durante el proceso de alimentación del mosquito con sangre (Tassaneetrithep y col. 2003). Después de la infección del humano, el virus se encuentra en un período de incubación, durante el cual circula en la sangre periférica e infecta diversas células. Posteriormente, si un nuevo mosquito pica a la persona enferma durante el estado febril, este puede infectarse y subsecuentemente transmitir el virus a otra persona, manteniendo el ciclo de transmisión (Gubler, 1998).

### **1.3. Infección con el virus del dengue**

La interiorización del virus dengue (DEN) a la célula blanco, ocurre a través de dos mecanismos; en el primero, la partícula viral utiliza, como receptores, múltiples proteínas transmembranales de las células blanco, que tienen alta afinidad por la glicoproteína E (Kielian y col. 2006). Estos receptores celulares pueden ser compartidos por los diferentes serotipos del virus (figura 3).

Con respecto al primer mecanismo, diversos estudios *in vitro* han demostrado que el DEN puede infectar una variedad de células de diferente origen. No obstante, *in vivo*, son pocos los tipos celulares que se han identificado como permisibles a la infección (Matsuda y col. 2005), es decir, que son capaces de sustentar la replicación viral. Para que se lleve a cabo la infección se necesita de una o algunas moléculas que funcionen como receptores para DEN. Entre estas, se ha reportado que el sulfato de heparán, presente en la superficie celular de diversas células, se une con gran afinidad a la glicoproteína E; no obstante, se ha sugerido que esta molécula sirve más como un factor inicial de fijación que concentra las partículas virales en la superficie de la célula blanco para subsecuentemente interaccionar con otra molécula receptora (Reyes y col., 2005) que permite la interiorización del virus.

Se ha demostrado que el sulfato de heparán está involucrado en la interiorización del virus del dengue en células HepG2 y HUH-7, estas líneas celulares hepática de humano han mostrado ser susceptibles a la infección con el virus del dengue serotipo 1 y 2 (Smith y Cabrera-Hernández, 2005), sugiriéndose que dicha infección puede ser causante de la disfunción hepática observada en los pacientes con dengue (Matsuda y col., 2005).

Otra molécula identificada como un probable receptor involucrado en el contacto DEN-célula es una lectina, localizada en células dendríticas, la cual se une a, al menos, dos moléculas de adhesión celular, ICAM-3 (CD50) (Navarro y cols., 2003) e ICAM-2 (GRP78 o CD102), llamada DC-SIGN. Se ha demostrado que DC-SIGN es un receptor que facilita la captura y endocitosis del virus dengue, particularmente en las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos. Además, se ha demostrado que esta molécula interviene también en la infección con otros virus como el Virus de Inmunodeficiencia Humana adquirida (VIH) y el virus Ébola, entre otros (Tassaneerithen y col. 2003).

Se ha reportado que las células del endotelio vascular del hígado tienen un receptor celular homólogo a DC-SIGN, que permite el primer contacto virus-célula, al que se ha denominado L-SIGN (Tassaneerithen y col. 2003).

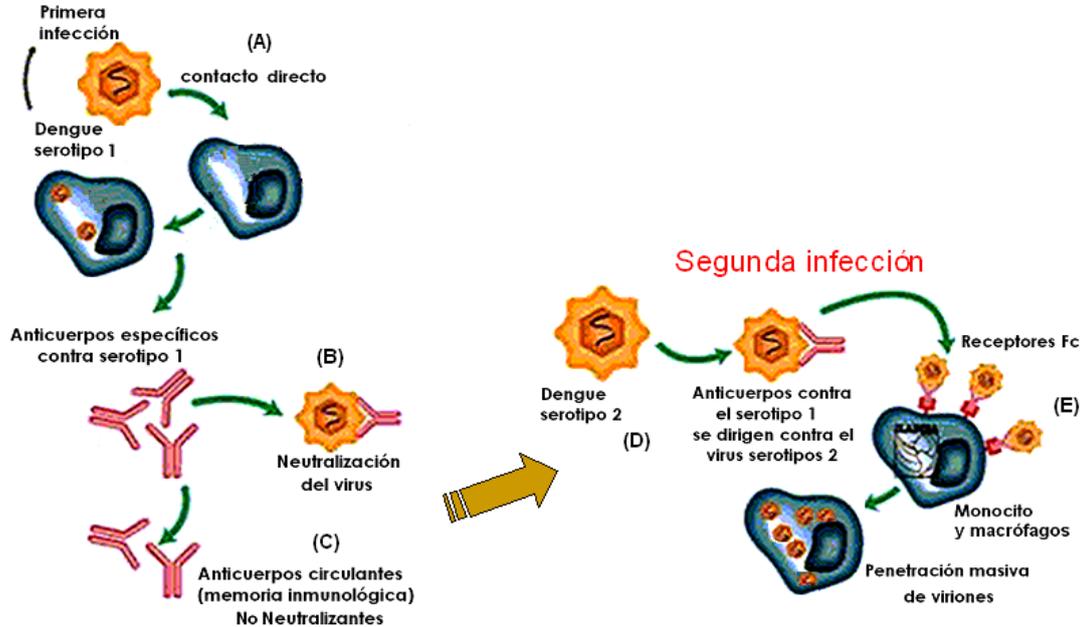
Adicionalmente, se ha observado que en monocitos y macrófagos las proteínas de choque térmico hsp70 y hsp90, que funcionan como receptores para LPS independientemente de CD14, funcionan también como receptores para el DEN (Reyes y col., 2005).

Otros posibles receptores hasta ahora descritos incluyen a las glicoproteínas 45 kDa en células C6/36, 74 KDa en células vero, dos proteínas de aproximadamente 40-45 KDa y 70-75 KDa en una línea de células B, proteínas de 29KDa y 43 kDa en una línea de células endoteliales (Reyes y col., 2005), así como las proteínas de membrana de 27, 45, 67 y 87 KDa en macrófagos humanos (Moreno-Altamirano y col., 2002).

El segundo mecanismo descrito para la interiorización del virus dengue a la célula blanco implica al receptor para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas. A este mecanismo se le denomina mecanismo de amplificación de la infección viral dependiente de anticuerpos (ADE) (Averutnan y col., 1998) (figura 3). Se ha sugerido que los anticuerpos no neutralizantes de la clase IgG, producidos durante una infección primaria, facilitan la entrada de un serotipo diferente, por la formación de complejos IgG-virus, su interacción con los Fc $\gamma$ R y la endocitosis mediada por Fc $\gamma$ R (Reyes y col., 2005). La propuesta de este segundo mecanismo de infección incluye a los monocitos,

macrófagos y a las células dendríticas como posibles blancos celulares, por su capacidad para captar complejos inmunes por  $Fc\gamma R$  (Averutnan y col., 1998).

### Primera infección



**Figura 3. Mecanismos de infección del virus del dengue.** A) Comienza con la infección a células blanco que tienen proteínas de membrana con alta afinidad a la glicoproteína E. La primera infección induce la generación de células plasmáticas productoras de anticuerpos; B) neutralizantes y C) no neutralizantes. D) Los anticuerpos no neutralizantes se unen al nuevo serotipo facilitando su interiorización a través de receptores  $Fc\gamma$ . Imagen tomada y modificada de <http://www.umassmed.edu/infdis/faculty/rothman.cfm?start=0&>.

## 1.4. Replicación del virus del dengue

Una vez que el virus del dengue ha ingresado a la célula hospedera, inicialmente queda dentro de una vesícula endosómica. En este sitio la envoltura viral se fusiona con la membrana vesicular liberando la nucleocápside al citoplasma y el material genético viral es liberado al citoplasma (Chu y col. 2004). El RNA viral es transcrito en el retículo endoplásmico rugoso (Miller y col., 2006) y, posteriormente, la replicación del virus involucra a la mayoría de las proteínas virales no estructurales maduras.

El proceso de ensamblaje del virus se inicia en el lumen del retículo endoplásmico (Pierre y col., 2000) con la asociación del RNA (+) a las proteína

del “core” (Mori y col. 2005) para luego ser envueltas en una bicapa lipídica (Ray y Shi, 2006).

La maduración de la partícula viral continúa en vesículas intracelulares, con la unión de las proteínas prM y E (Wang y col., 1999; Pierre y col., 2000). Durante el transporte, las proteínas prM y E son sometidas a un proceso de maduración (Allison y col. 2001). Finalmente, las vesículas transportadoras se fusionan con la membrana plasmática de la célula hospedera, liberando a los viriones maduros al espacio extracelular (Ray y Shi, 2006).

## **1.5. Manifestaciones clínicas en la enfermedad del dengue**

Los hallazgos clínicos de laboratorio en pacientes con Fiebre por Dengue (FD) incluyen fiebre, neuralgia, neutropenia, trombocitopenia y hepatomegalia, caracterizada por un aumento en la concentración de las enzimas alanina-aminotransferasa (TGP) en suero (Gubler, 1998; Gagnon y col., 1999).

La fiebre hemorrágica (FH) es una condición que puede confundirse con sarampión, rubéola, influenza, malaria y otras enfermedades virales (Gubler, 1998). Sin embargo, durante el período más crítico, los pacientes manifiestan alteraciones en la circulación sanguínea y pueden presentar hemorragia (Gagnon y col., 1999). Se presenta reducción en el número de glóbulos blancos, granulocitopenia y trombocitopenia (Gubler, 1998; Chakrayarti y Kumaria, 2006), así, como una activación masiva del complemento (Averutnan y col., 1998).

En el Síndrome de Choque, que es la forma más severa de la enfermedad, hay postración, irritabilidad y choque, con extremidades frías por insuficiencia vascular periférica, taquicardia, respiración rápida, pulso rápido y débil, que puede llevar a la muerte del paciente (Chakrayarti y Kumaria, 2006).

## **1.6. Participación de la respuesta inmune en la infección con el virus del dengue.**

El control de las infecciones virales implica dos tipos de respuesta inmune; la inmunidad humoral, en la que la neutralización y eliminación del virus es

mediada por anticuerpos y, la inmunidad celular, mediada fundamentalmente por linfocitos T citotóxicos, los cuales deberían conferir protección de por vida contra una segunda infección con el mismo virus (Hernández y Alvarado, 2001).

No obstante, se ha sugerido que en los pacientes infectados con el virus del dengue la inmunidad protectora desarrollada durante una primera infección, favorece el desarrollo de las formas más severas de la enfermedad, sobre todo cuando las infecciones subsecuentes se producen por un serotipo diferente al de la primera infección (Livingston y col. 1994; Lin y col. 2002). Se piensa que la segunda infección da como resultado una desregulación de la respuesta inmune, en la que intervienen citocinas pro-inflamatorias (Gubler, 1998; Gagnon y col.. 1999), la activación del complemento en la superficie de las células infectadas y la apoptosis. Estos elementos actúan sobre el endotelio vascular produciendo un aumento en su permeabilidad, lo que culmina con el rompimiento de las barreras endoteliales (Averutnan y col. 1998).

Con respecto a la citotoxicidad celular, se ha demostrado que la mayoría de los pacientes con Fiebre Hemorrágica presentan concentraciones elevadas de TNF- $\alpha$  en suero (Chakrayarti y Kumaria, 2006; Gagnon y col., 1999), por lo que se piensa que el TNF- $\alpha$  puede ser el responsable de los trastornos al endotelio. Esta hipótesis también está basada en un estudio realizado en voluntarios humanos, en donde se observó que la administración de TNF- $\alpha$  induce manifestaciones clínicas similares a los observados en los individuos que cursan con Fiebre Hemorrágica (Gagnon y col., 1999).

Adicionalmente, se han documentado en pacientes con Fiebre Hemorrágica, concentraciones elevadas de otras citocinas, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-13, IL-18 (Chakravarti y Kumaria, 2006) e IFN- $\gamma$ , además de histamina, C3a y C5a en comparación con los pacientes con FD por lo que se ha sugerido que el rápido aumento en las concentraciones de estos mediadores provoca los cambios observados en la permeabilidad vascular (Gubler, 1998).

Otras citocinas, cuyas concentraciones están aumentadas de manera significativa en pacientes con dengue hemorrágico son IL-8 y RANTES. En el curso de una infección estas citocinas pueden aumentar la permeabilidad

vascular a través del reclutamiento y la activación local de neutrófilos (Averutnan y col., 1998).

En el caso del complemento se sugiere que su activación está correlacionada con el desarrollo de fiebre hemorrágica y síndrome de choque (Mehlhop y col., 2005). Algunos reportes sugieren que las células endoteliales son las principales células afectadas por la activación del complemento. En este sentido, se propone que una vez que ocurre la infección de las células endoteliales la expresión de antígenos virales sobre la membrana citoplásmica induce de manera continua el depósito de anticuerpos y la activación del complemento, hasta la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-9) en las células infectadas y la liberación de C3a y C5a en el sitio de infección. La lisis celular mediada por complemento incrementa directamente la permeabilidad vascular del endotelio mientras que C3a y C5a inducen la liberación de histamina de los mastocitos, incrementando la permeabilidad vascular (Averutnan y col., 1998).

Por lo que respecta a la apoptosis, se ha demostrado que las células HepG2, una línea celular de hepatocitos de humano, son susceptibles a la infección con el virus de dengue serotipo 2. Como resultado de la infección, se induce la producción de mediadores solubles y de moléculas de superficie inductoras de apoptosis, tales como TNF- $\alpha$ , APO-2L -Trail, y FasL (Matsuda y col., 2005).

## **2. Participación de los linfocitos T en la infección con el virus del dengue**

Los linfocitos T se originan a partir de células precursoras pluripotenciales presentes en la médula ósea. Continúan su desarrollo en el timo, donde la acción de un gran número de mensajeros bioquímicos induce la selección de las células que pasarán a la circulación sanguínea así como de un determinado fenotipo y función (Hernández y Alvarado, 2001).

La mayoría de los linfocitos T circulantes se encuentran en una fase no proliferativa. Su activación es un proceso específico que se inicia por la interacción de su TCR con antígenos extraños unidos a moléculas de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II, en el caso de linfocitos CD8+ y CD4+, respectivamente. En la activación de los linfocitos T participan, además,

algunas moléculas de co-estimulación, como CD28 e ICOS. CD28 interactúa con CD80 y CD86 que se expresan en la membrana citoplásmica de las células presentadoras de antígeno. Otras moléculas importantes en el proceso de activación de los linfocitos T son CD28 ligando, CD30L, CD40, CD137, 4-1BB ligando y citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , ICAM-1 y LFA-3, todas capaces de inducir proliferación en ausencia de señales provenientes de la activación de CD28 (Verwilghen y col., 1991; Shaw y col., 1991; Sepúlveda y col. 1999).

Durante un proceso infeccioso la activación de los linfocitos T tiene como consecuencia la activación de algunos factores de transcripción que desencadenan la síntesis y liberación de citocinas en el sitio de infección, entre las que se cuentan IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y GM-CSF, entre otras proteínas con funciones pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y de viabilidad y proliferación celular (Fabbri y col., 2003).

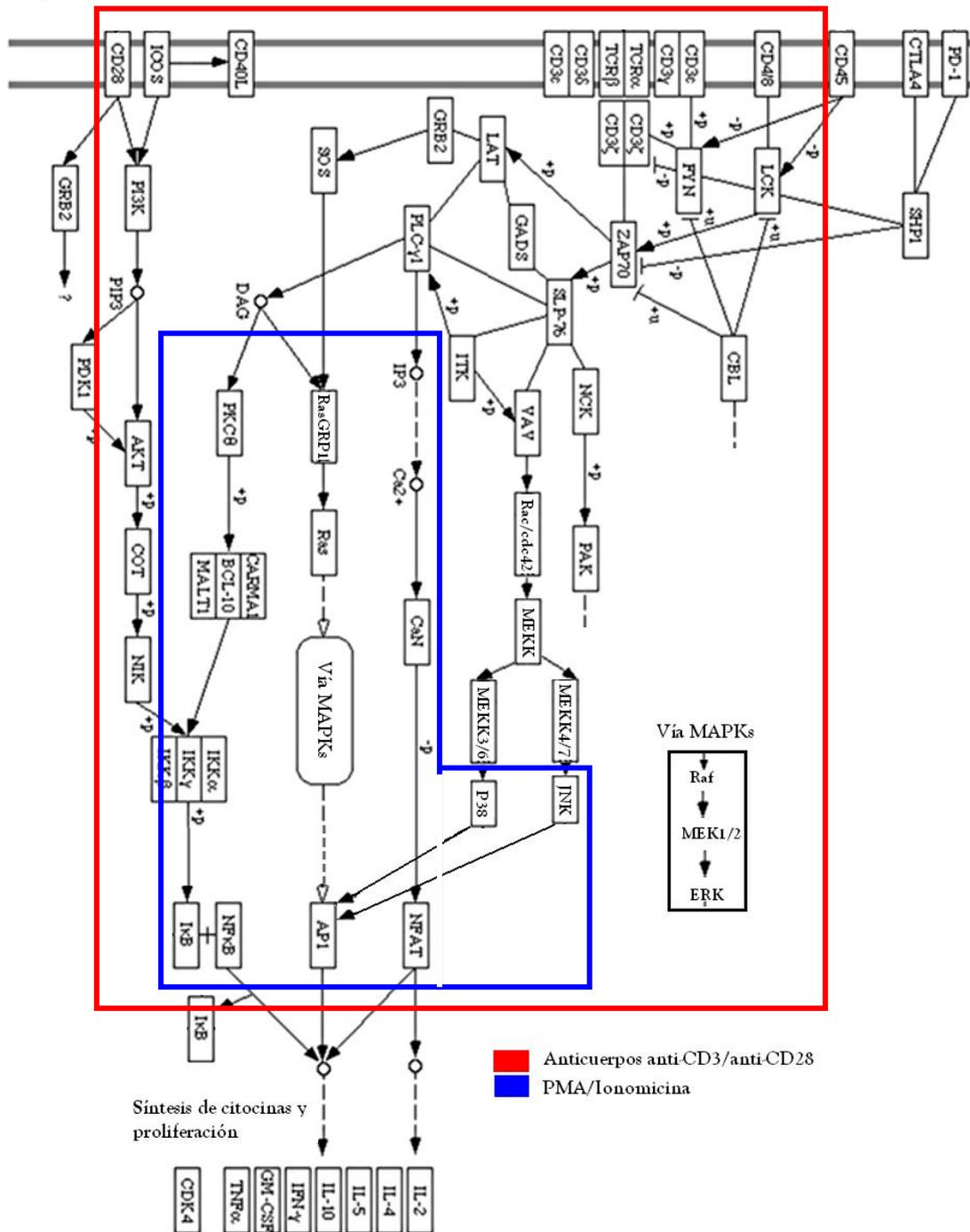
Posiblemente, la vía de activación de los linfocitos T más estudiada es la que inicia con la estimulación del complejo TCR y de la molécula de co-estimulación CD28, y continúa con la fosforilación de los dominios ITAM, localizados en los dominios citoplasmáticos, de los componentes del CD3 del complejo TCR. Los residuos de tirosina fosforilados dirigen al reclutamiento de otras tirosina cinasas, como ZAP70, SYK y de moléculas adaptadoras como VAV, NCK, ADAP, SLP76, LAT y Grb2, que a su vez reclutan varias proteínas efectoras, tales como GTPasas Rac/cdc42, fosfolipasa C- $\gamma$ 1(PLC- $\gamma$ ) y SOS. Estas últimas resultan en la activación de la vía MAPK a través de Grb2, SOS, y Ras junto con JNK y p38 que es activada a través de las GTPasas pequeñas Rac/cdc42. La cascada de señalización que inicia la estimulación de CD28, activa a la enzima fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), la cual fosforila lípidos que contienen inositol, generando fosfatidilinositol 3 fosfato, fosfatidilinositol 3,4 difosfato y fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato, así como la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs), como JNKs y ERKs. Como consecuencia de la estimulación de estas vías de señalización se activan varios factores de transcripción como NFAT, AP1 y NF $\kappa$ B, que son determinantes en la activación de los linfocitos T (figura 4).

El NFAT interviene en la síntesis de citocinas como IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, e IFN- $\gamma$  o de receptores de superficie como FasL o CD40L en linfocitos T. Se localiza en el citoplasma de las células en reposo y su translocación al núcleo es regulada por la fosfatasa calcineurina, molécula dependiente del calcio. El proceso de activación de NFAT inicia con la activación PLC- $\gamma$  que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 1, 4,5-bisfosfato para generar inositol 1, 4, 5-trifosfato y 1,2-diacilglicerol. La primera molécula induce la liberación de calcio de los reservorios intracelulares, provocando una rápida entrada de calcio extracelular y consecuentemente, una rápida elevación de la concentración citoplásmica de este ión, el cual se une a proteínas reguladoras dependientes de calcio, en este caso la calmodulina, formando el complejo que activa a la fosfatasa calcineurina encargada de desfosforilar a NFAT, lo que permite su translocación al núcleo (Figura 4).

El NF $\kappa$ B interviene en la síntesis de IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, GM-CSF, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , entre otras moléculas. En células no estimuladas, el NF $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma asociado a la proteína reguladora I $\kappa$ B que impide su translocación al núcleo (Schmitz y col., 2003). Cuando las células son estimuladas, se activa IKK (también llamado modulador esencial de NF- $\kappa$ B o NEMO), que es un complejo formado por tres proteínas (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$ ) que cataliza la fosforilación de I $\kappa$ B, facilitando su reconocimiento por la ubiquitina y su rápida degradación por proteosomas (Schmitz y col., 2003) (Figura 4). NF $\kappa$ B en ausencia de su inhibidor (IKK o NEMO) es capaz de ingresar al núcleo.

AP1 es una proteína dimérica, formada por homodímeros de la familia c-Jun, o heterodímeros de las familias c-Jun y c-Fos (Behrens y Riera-Sans, 2007). AP1 regula la síntesis de IL-2 (Mizel y col., 1992). Su actividad depende de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), las proteínas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), p38 y las cinasas N-terminal c-Jun (JNK). La cinasa ERK, depende a su vez de la generación de 1,2-diacilglicerol o SOS. Y las cinasas JNK y p38 dependen de la activación de MEKK (Thyphronitis y col., 2006), (Figura 4).

## Vía de Activación de linfocitos T



**Figura 4. Vías de activación en linfocitos T *in vitro*.** El cuadro Rojo muestra la cascada de moléculas que se activan cuando los linfocitos T son activados con anticuerpos  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 mientras que el cuadro Azul muestra solo aquellas moléculas que se activan cuando se emplea PMA/Ionomicina.

## 2.1. Mecanismos empleados para suprimir la función de linfocitos T

Diversos patógenos, entre ellos los virus, modifican la respuesta inmune, lo que les permite replicarse exitosamente. Los linfocitos T representan un blanco importante para la modificación de la respuesta inmune.

En el caso de la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana, los linfocitos T presentan una capacidad de proliferación disminuida, fenómeno que solo en algunos casos se explica por la síntesis disminuida de IL-2. Sin embargo, algunos reportes han demostrado que una de las principales causas de la falla funcional de los linfocitos T involucra la alteración en la activación de los factores de transcripción NF-AT, NFκB y AP-1, lo que resulta en una activación parcial o incluso en una falla funcional.

Se ha observado que la mayoría de los pacientes infectados con VIH presentan una disminución en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos durante la fase crónica de la infección y que la producción de IL-2 se reduce durante la viremia. La adición de IL-2 exógena restaura *in vitro* la capacidad proliferativa de los linfocitos T, lo que sugiere que la disminución de la proliferación de los linfocitos T durante la viremia, esta relacionada con la disminución en la producción de IL-2. En otras infecciones virales como la hepatitis B y C se ha observado también una disminución e incluso ausencia de la respuesta proliferativa de linfocitos T específicos en las fases crónicas y agudas de la infección (Connors y col. 2003).

En la infección con Hepatitis C (HCV) se ha encontrado, que la frecuencia de linfocitos T citotóxicos es relativamente baja. Además, la producción de citocinas de tipo Th1, (IFN $\gamma$  e IL-2) está disminuida (Thimme, 2007). La proteína "core" del HCV es la principal responsable de la inhibición de la respuesta de linfocitos T, incluyendo la respuesta antiviral mediada por linfocitos T citotóxicos. Aparentemente por la interacción directa de la proteína "core" con el receptor 1 del complemento (C1R). Por otra parte, se ha demostrado que la proteína "core" también afecta la expresión de la cadena de alta afinidad del receptor de la IL-2 e inhibe la activación de la vía de las cinasas ERK/MEK/MAK (Hahn col., 2001).

Otro mecanismo de inhibición de la respuesta inmune involucra la inducción de la muerte celular programada o apoptosis. En este contexto, se ha demostrado que la proteína Nef ("nuclear elongation factor") del virus de inmunodeficiencia de simio y la proteína Tax del virus de la leucemia humana de linfocitos T tipo 1 (HTLV-1), son capaces de inducir la sobre-expresión de FasL, lo que favorece la apoptosis de los linfocitos T.

En el caso del HTLV-1 se ha encontrado que la proteína Tax actúa como un trans-activador de una variedad de factores de transcripción, principalmente NFκB o AP-1. Por lo tanto, se propone que durante la etapa de replicación viral, Tax activa algunos de estos factores de transcripción, resultando en la sobre-expresión de FasL.

Por otro lado, *Salmonella* es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos T a través del contacto directo con estas células. Sin embargo, el probable mecanismo molecular que conduce a tal inhibición no ha sido identificado (Starnbachy col., 2005).

La toxina vacuolar de *Helicobacter pylori* (VacA) inhibe la activación de los linfocitos T estimulados a través del complejo TCR y la molécula CD28. Se ha demostrado que la incubación de linfocitos T, de la línea celular Jurkat, en presencia de VacA disminuye la producción de IL-2 en comparación con células Jurkat no tratadas. En experimentos posteriores se demostró que VacA bloquea la activación del factor de transcripción NFAT, en forma similar a la inhibición de este factor por ciclosporina A y FK506, las cuales tienen la capacidad de inactivar la fosfatasa calcineurina (Cover y col. 2004).

En el caso particular del virus del dengue se ha sugerido que los linfocitos T contribuyen de manera importante al desarrollo de fiebre hemorrágica y síndrome de choque, ya que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> producen grandes cantidades de IFN-γ durante la infección con el virus del dengue lo cual, a su vez, induce la secreción de otras citocinas como el TNF-α, que en conjunto inducen cambios en la permeabilidad del endotelio vascular (Chakrayarti y Kummara, 2006). Por su parte, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> participan en el fenómeno de amplificación de la infección viral dependiente de anticuerpos (ADE) mediante la cooperación de éstos con los linfocitos B específicos, en la

producción de anticuerpos no neutralizantes, que favorecerán la entrada de más virus a través del Fc $\gamma$ R (Chakravarti y Kumaria, 2006), además de la producción de IFN- $\gamma$ .

Por otro lado, el IFN- $\gamma$  incrementa la expresión de Fc $\gamma$ R en macrófagos, facilitando, a su vez, el mecanismo de ADE en infecciones secundarias.

Por lo anterior, se ha sugerido que los linfocitos T juegan un papel importante en la exacerbación de las manifestaciones clínicas del dengue (Gubler, 1998). Sin embargo, en aparente contradicción con lo anterior, se ha observado que los pacientes en etapas agudas de la infección presentan un número reducido de linfocitos T y que éstos proliferan menos en respuesta a la estimulación con fitohemaglutinina (PHA), cuando se compara con lo que ocurre en sujetos sanos. Se ha sugerido que esto es consecuencia de un mal funcionamiento de las células presentadoras de antígeno (Rothman y col., 1999). Sin embargo, otras posibilidades que expliquen la disminución en la capacidad proliferativa de los linfocitos T de pacientes con dengue no han sido exploradas.

.

### **3. Justificación**

Los linfocitos T participan en la respuesta inmune específica y hay controversia sobre si estas células se infectan o no con el virus del dengue. Independientemente de si estas células se infectan, es posible que la simple unión del virus del dengue (DEN-2) a alguna(s) molécula(s) de la membrana celular de los linfocitos T tenga algún efecto sobre algunas de sus funciones, como su capacidad para proliferar en respuesta a la estimulación.

Se ha documentado que la capacidad proliferativa de los linfocitos T provenientes de personas infectadas con el virus del dengue está disminuida, lo cual se ha atribuido a un defecto en las células presentadoras de antígeno. Un efecto directo del virus del dengue sobre los linfocitos T no ha sido analizado. Razón por la cual en este trabajo se consideró estudiar si la incubación de los linfocitos con el virus del dengue modifica la capacidad proliferativa de los linfocitos T, *in vitro*.

### **4. Hipótesis**

La proliferación celular, como una manifestación de la activación de los linfocitos T, se modifica por el contacto de estas células con el virus del dengue.

## **5.0 Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Analizar si el virus del dengue del serotipo 2 induce cambios en la proliferación de linfocitos T de sangre periférica humana.

### **5.2. Objetivos particulares**

- 5.2.1. Propagar y titular el lote del virus con el cual se realizarán los experimentos para este proyecto.
- 5.2.2. Analizar si los linfocitos T son susceptibles a la infección con el virus del dengue del Serotipo 2.
- 5.2.3. Determinar el efecto del virus del dengue serotipo 2 en la proliferación de linfocitos T humanos estimulados con PMA/Ionomicina y anti-CD3/anti-CD28.
- 5.2.4. Determinar la movilización de calcio intracelular en Linfocitos T incubados con el virus del dengue, como un mecanismo involucrado en la proliferación de los linfocitos T humanos.

## **6. Material y Métodos**

### **6.1 Obtención del lote de virus dengue serotipo 2**

Para obtener el lote de virus Dengue cepa Nueva Guinea, se baso en el en el trabajo descrito de Silva y cols (2005). El virus se propagó mediante la infección de células de mosquito C6/36, las cuales para proceder a su infección debían estar en una confluencia del 80% - 90%, cultivadas en medio mínimo esencial (MEM) (Gibco), suplementado con suero fetal bovino al 2 %. Una vez que se observó un 90% de efecto citopático se procedió a cosechar el virus, congelando y descongelando una sola vez la suspensión celular con la finalidad de liberar las partículas virales. Posteriormente, el virus fue clarificado por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos. El virus fue almacenado a  $-70^{\circ}$  C en alícuotas de 1.0 ml, hasta su uso.

### **6.2. Determinación de la replicación del virus del dengue mediante la detección de la proteína no estructural-1 (NS1)**

La glicoproteína no estructural 1 (NS1) es sintetizada solo durante la etapa replicativa del virus del dengue. Por lo tanto, con la finalidad de evaluar si en los cultivos de células C6/36 infectados con DEN2 realmente hubo replicación viral, se determinó NS1 por ELISA tipo sándwich como una estrategia para detectar de forma indirecta al virus del dengue. Se analizaron muestras de cultivos celulares infectados con el virus del dengue siguiendo el protocolo descrito en la prueba comercial Platelia™ Dengue NS1 Ag, desarrollada por Bio-Rad. Brevemente; 50  $\mu$ L de las muestras y del control fueron incubados con 50  $\mu$ L del diluyente y 100  $\mu$ L del anticuerpo conjugado diluido 1:50, por 90 minutos a  $37^{\circ}$ C. Posteriormente, las placas fueron lavadas y los complejos inmunes fueron detectados por adición de 160  $\mu$ l del cromógeno. La placa de ELISA fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz, la reacción enzimática fue detenida por la adición de 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico (8N). La densidad óptica fue leída a 450/620 nm en un lector de ELISAs (Labsystem Multiskan-plus).

### 6.3. Titulación del virus dengue por el método de hemaglutinación

La hemaglutinina es una proteína presente en el virus del dengue que induce la aglutinación de los glóbulos rojos. Por lo tanto, una técnica útil para la titulación de diferentes lotes de este virus es la hemaglutinación. Se hicieron once diluciones seriadas 1:2, por triplicado, del lote viral, obtenido como se indica en el inciso 6.1, hasta la dilución 1:1024. Posteriormente, se preparó una suspensión de glóbulos rojos de ganso al 0.025 %, los cuales se añadieron a una placa de 96 pozos, como se muestra en la tabla 1. Las placas fueron incubadas por 1 hora a 37°C.

Pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución de DEN2	0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	---
Vol. Sob. DEN2 (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	---
Sol. Glóbulos R (0.025 %) (µL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Vol. Sob. DEN2 (-) (µL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
Medio (µL)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

**Tabla 1. Condiciones para la titulación del virus por hemaglutinación.** Esta tabla muestran las condiciones de distribución y orden de reactivos para la titulación del virus del dengue por aglutinación.

### 6.4. Titulación del virus dengue por el método de unidades formadoras de placa (PFU)

Para cuantificar el número de partículas virales presentes en los lotes de virus del dengue se prepararon monocapas confluentes de células C6/36 en placas de 6 pozos, mediante la adición de  $2.5 \times 10^6$  células por pozo, e incubación a 28°C sin CO<sub>2</sub>, por 2 o 3 días, la confluencia celular fue observada microscópicamente cada día. Al alcanzar una confluencia de aproximadamente 90 %, las células C6/36 fueron lavadas 2 veces con PBS, teniendo cuidado de

no levantar la monocapa. Se prepararon diluciones seriadas del virus (1:10) con MEM, pH 6.8, sin suero. Se adicionó 1.0 mL de cada dilución a pozos individuales con las monocapas celulares. Monocapas celulares de uno o dos pozos fueron incubadas en ausencia de virus, como testigos negativos. La adsorción del virus a las células C6/36 se llevó a cabo por 45 minutos, distribuyendo el inóculo viral cada 15 minutos mediante agitación moderada de las placas de cultivo. El medio de cultivo, conteniendo los virus no adsorbidos, fue retirado y las células fueron lavadas con 2.0 mL de PBS, sin levantar la monocapa. Posteriormente, se adiciono 2.0 mL de carboximetilcelulosa en MEM 2X fueron adicionados a cada pozo y las placas fueron incubadas a 28°C durante 7-10 días después de la infección, los cultivos fueron observados diariamente en busca de placas líticas. Cuando los cultivos presentaron placas líticas, lo cual ocurre normalmente entre 7 y 10 días, estos fueron fijados con formol al 5 % por 12 horas, después de lo cual las células fueron lavadas con PBS hasta retirar toda la carboximetilcelulosa. Las células fueron teñidas con cristal violeta al 1.25% en etanol al 20%, durante 10 minutos y lavadas con agua corriente para quitar el exceso de colorante. Se contó el número de placas líticas (50 - 300) en cada monocapa celular y se tomó en cuenta la dilución del virus en la que se observó ese número de placas líticas para realizar el cálculo del las unidades formadoras de placa/ml de acuerdo a la siguiente fórmula, el valor del título fue expresado como PFU/mL, considerando la siguiente formula:

$$[(\text{No. de placas})/(\text{Vol. de inóculo (mL)}) \times (\text{Inverso de la dilución})] = \text{PFU/mL}$$

## **6.5. Obtención de células mononucleares de sangre periférica humana**

Antes de iniciar los experimentos de la proliferación de linfocitos T se procedió a estandarizar la metodología con células mononucleares de sangre periférica humana, las cuales fueron obtenidas a partir de concentrados leucocitario de donaciones voluntarias de sangre, proporcionados amablemente por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, de acuerdo con el siguiente protocolo: 30 mL de cada paquete leucocitario fueron diluidos en 20 mL de PBS. 30 mL del paquete leucocitario diluido fueron cuidadosamente

depositados sobre 15 mL de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Science) en tubos Falcón de 50 ml, evitando mezclar el concentrado leucocitario con el Ficoll-Hypaque. Se centrifugó a 1800 rpm durante 45 minutos sin freno y a temperatura ambiente. Las células mononucleares (presentes en el anillo blanco que se forma sobre la interfase del Ficoll-Hypaque fueron transferidas a otro tubo de 50 mL y lavadas 3-4 veces con PBS por centrifugación a 600 rpm durante 8 minutos. Las células mononucleares fueron resuspendidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin suero, suplementado con L-glutamina, bicarbonato de sodio y antibióticos (Gibco), contadas y ajustadas a la concentración celular requerida para cada experimento de proliferación.

### **6.6. Obtención de linfocitos T a partir de una suspensión de células mononucleares de sangre periférica humana**

Células mononucleares de sangre periférica humana, obtenidas como se indica en la sección 6.5, fueron transferidas a Placas de Petri e incubadas a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub>, para permitir la adhesión de los monocitos. Las células no adherentes (linfocitos B y linfocitos T principalmente) fueron cosechadas al día siguiente. La separación de los linfocitos T se realizó pasando la suspensión de linfocitos por una columna de nylon para lo cual, 600 mg de lana de nylon fueron empaquetados en jeringas de 10 cc, las jeringas con la lana de nylon fueron colocadas en tubos Falcón de 50 mL y esterilizadas en autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos. Las columnas de nylon fueron equilibradas con 5 ml de DMEM al 1 % de SFB e incubadas a 37°C por 45 minutos. La suspensión celular, previamente concentrada por centrifugación y resuspendida en 0.5 mL de DMEM, fue depositada sobre la columna de nylon. La columna se incubo a 37°C por 45 minutos para favorecer el contacto de las células con la lana de nylon y permitir la adherencia de los linfocitos B y de los monocitos remanentes en la suspensión celular. Transcurrido el tiempo de incubación, 15 mL de DMEM a 37°C fueron agregados gota a gota sobre la columna de nylon para permitir el flujo de las células no adherentes al nylon (linfocitos T). La suspensión celular enriquecida en linfocitos T (70-85% de pureza, de acuerdo con lo indicado en la literatura y con nuestros propios resultados, datos no mostrados) fue centrifugada y el botón celular resultante fue resuspendido en 2.0 mL. Una alícuota (20 µL) de la suspensión celular fue diluida en 180 µL de

azul tripano al 1%, las células fueron contadas en cámara de Neubauer para calcular el número total de células en los 2.0 mL de la suspensión celular. Finalmente, las células fueron ajustadas a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  células/mL en DMEM.

## **6.7 Análisis de la infección de linfocitos T por el virus dengue**

Para visualizar si los linfocitos eran permisivos al virus, se procedió a realizar ensayos de inmunofluorescencia como a continuación se describe: se incubaron  $1 \times 10^6$  linfocitos T con DEN2 empleando una MOI de 0.050, por tres días. Después del periodo de incubación, los linfocitos T se cosecharon y se lavaron dos veces con PBS por centrifugación a 1200 r.p.m durante 8 minutos. Luego se fijaron con acetona durante 15 minutos y nuevamente se lavaron con PBS, los linfocitos T se incubaron con leche al 3% en PBS para bloquear por 45 minutos los sitios inespecíficos. Una vez transcurrido el tiempo se hizo una contratinción con azul de Evans (0.01%) durante 5 minutos, luego se agregó el anticuerpo de ratón  $\alpha$ -envoltura (concentración 1:2000) durante una 90 minutos, posteriormente se adicionó el anticuerpo de conejo  $\alpha$ -IgG de ratón-FITC (concentración 1:3000) durante 60 minutos. Posteriormente se colocaron en laminillas de vidrio y se observaron en un microscopio de fluorescencia.

## **6.8 Análisis de la viabilidad de los linfocitos T**

Para corroborar la viabilidad de los linfocitos T a los 3 días de infección, Los linfocitos T ( $1 \times 10^6$ ) se incubaron con DEN2 empleando una MOI de 0.050. Después del periodo de incubación se cosecharon para centrifugarse a 1200 r.p.m durante 8 minutos. Luego se hizo una dilución 1:100 y se tiñeron las células mediante la adición de azul tripano (concentración 4%) se dejaron incubar por 12 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se colocaron 10  $\mu$ L en una cama de Newauer y se contaron las células vivas y muertas.

## **6.9. Análisis de la proliferación de linfocitos T en la población mixta de células mononucleares de sangre periférica expuestas al virus del dengue**

A partir de suspensiones de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana, obtenidas como se indica en el inciso 6.5, y se ajustó a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente, se procedió a analizar la capacidad de proliferación de CMSP en respuesta a la estimulación de las moléculas CD3 y CD28 ó, en respuesta al estímulo con PMA/ionomicina. Para lo cual, 150  $\mu$ L de la suspensión celular (300,000 células) fueron depositados en pozos individuales de placas de cultivo celular de 96 pozos de fondo "U" (Costar). Las células fueron sometidas a las condiciones señaladas (Tabla 2). Cada condición se ensayó por triplicado. Las células fueron incubadas por tres días a 37°C en una atmosfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Para la estimulación de CD3 y CD28 se usaron anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 acoplados a esferas (Miltenyi Biotec) en una relación de 1 esfera por cada 2 células, como lo indica el proveedor. Para el estímulo con PMA/Ionomicina se adicionaron 10ng/mL de PMA y 500ng/mL de Ionomicina. En los cultivos celulares expuestos al virus del dengue se adicionaron 25  $\mu$ L de la suspensión viral previamente titulada por pozo, lo que equivale aproximadamente a una MOI de 0.1. Después de 56 horas de incubación con los mitógenos, o virus dengue se adicionó 10  $\mu$ L de timidina tritiada, equivalentes a 0.5  $\mu$ Ci (Amersham) a cada pozo y condición de cultivo. Luego de 16 horas (72 horas totales de cultivo), las células fueron cosechadas en un cosechador de células (Brandel) sobre papel filtro (Brandel). Los filtros con las células cosechadas fueron colocados en viales de centelleo en donde se dejaron a temperatura ambiente hasta su secado (aproximadamente 2h) después de lo cual se adicionaron 2.0 ml de líquido de centelleo (MP Biomedicals). La incorporación de timidina tritiada en las células proliferantes se determinó en un contador de centelleo (Beckman) como cuentas por minuto (cpm). El índice de estimulación, indicativo de la proliferación celular, se determinó dividiendo el promedio de los triplicados de las cuentas por minuto de los cultivos estimulados entre el

promedio de los triplicados de las cuentas por minuto de los cultivos celulares mantenidos en medio de cultivo sin ningún tratamiento adicional.

<b>Condiciones para los ensayos de proliferación celular</b>
CMSP
CMSP + DEN2
CMSP + $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28
CMSP + DEN2+ $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28
LT
LT + DEN2
LT+ $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28
LT+ DEN2+ $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28
LT +PMA/ionomicina
LTt + DEN2 +PMA/ionomicina
LTt + PMA/ionomicina (90 min.) + DEN2
LTt + PMA/ionomicina (210 min.) + DEN2
LTt + PMA/ionomicina (310 min.) + DEN2
Nota: en todos los casos el volumen de los cultivos celulares fue ajustado a 200 $\mu$ l/pozo

**Tabla 2. Ensayos de proliferación celular**

## **6.10 Análisis de la proliferación de linfocitos T enriquecidos por columnas de nylon**

A partir de suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos T mediante columnas de nylon como se indica en el inciso de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana, obtenidas como se indica en el inciso 6.6, a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  células/mL se procedió a analizar la capacidad de proliferación de los linfocitos T en respuesta a la estimulación de las moléculas CD3 y CD28 ó, en respuesta al estímulo con PMA/ionomicina. Para lo cual, 150  $\mu$ L de la suspensión celular enriquecida en linfocitos T (300,000 células) fueron depositados en pozos individuales de placas de cultivo celular de 96 pozos de fondo "U" (Costar) y tratados de la misma forma que, para las células mononucleares de sangre periférica, se indica en la tabla 1. Los ensayos de proliferación celular se realizaron como se indica en el inciso anterior (6.9).

## **6.11 Movilización de calcio intracelular en linfocitos T**

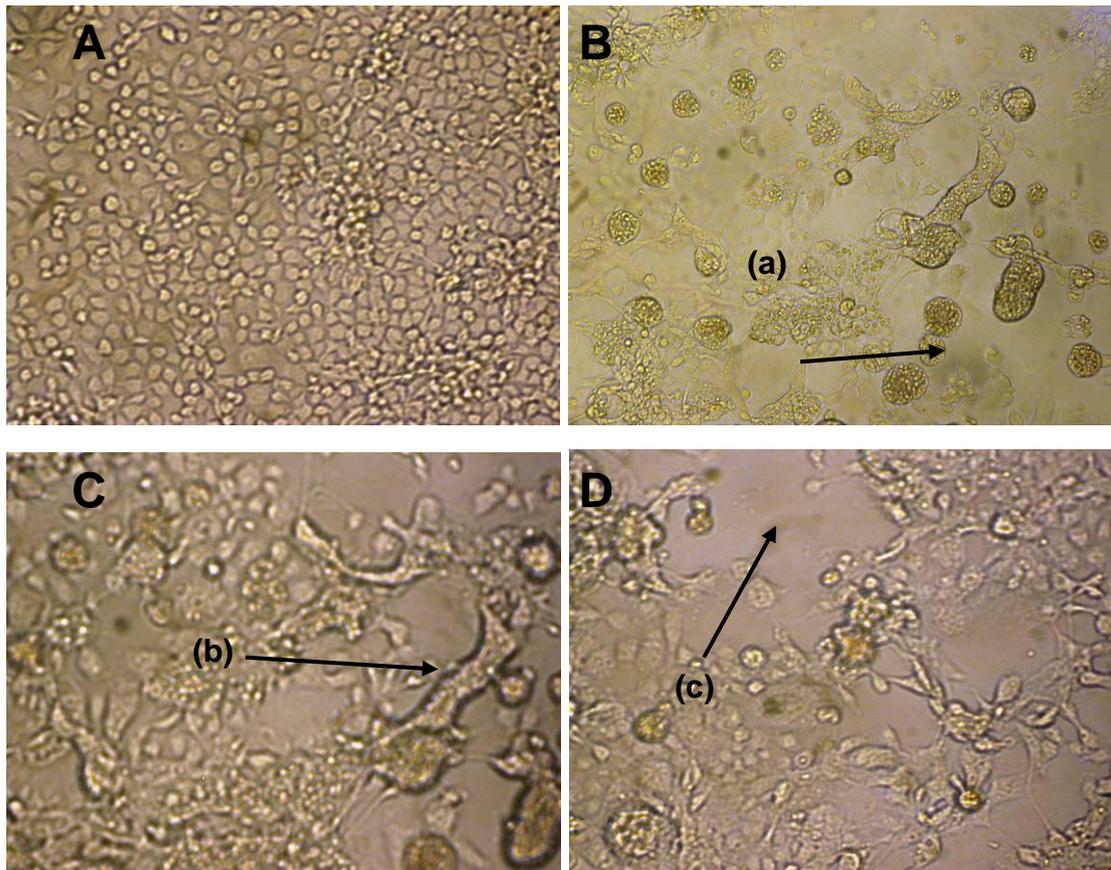
Como una forma de determinar si el virus del dengue tiene algún efecto sobre la vía de activación calcio-calcineurina-NFAT, se realizaron ensayos de movilización de calcio. Para lo cual,  $1.0 \times 10^7$  células en 1.0 mL de PBS libre de calcio fueron incubadas en presencia de 1.0 nM de ácido plurónico durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir la permeabilización celular y facilitar el ingreso del indicador de calcio (Fluo-3, Invitrogen), el cual fue adicionado, pasados los 5 minutos con ácido plurónico, a una concentración final de 1.0  $\mu$ M, las células en suspensión fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación moderada cada 10 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con PBS libre de calcio y magnesio, por centrifugación a 1200 rpm durante 8 minutos y resuspendidas en 1.0 mL de PBS. De esta suspensión celular se prepararon alícuotas de 100  $\mu$ l ( $1 \times 10^6$  células) en tubos para FACS (BD Biosciences) a las cuales se les adicionaron 900  $\mu$ L de PBS y se adicionó 2  $\mu$ L  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final de 200mM.

El Fluo-3 es una molécula con afinidad por el calcio. En ausencia de calcio el Fluo-3 no emite fluorescencia y, al unirse al calcio (en forma equimolar) emite fluorescencia, por lo que la intensidad de fluorescencia es indicativa de la concentración de calcio en el citoplasma de las células “cargadas” con Fluo-3. La fluorescencia emitida por los complejos Fluo-3-Calcio fue cuantificada en tiempo real en un citómetro FACScan (BD Biosciences) con ayuda del software Cellquest (BD Biosciences). La concentración basal de calcio fue determinada durante 30 segundos, después de lo cual se adicionó el estímulo (1.0 mM Ionomicina) y, la concentración de calcio intracitoplásmico se siguió durante 7.5 minutos adicionales. La cinética de movilización de calcio se determinó en células previamente incubadas con el virus de dengue (DEN2) (45 minutos al momento del inicio del ensayo de movilización de calcio), así como en células sin virus para efectos de comparación.

## 7.0. Resultados

### 7.1 Obtención del virus del dengue serotipo 2

Después de 7 días de propagación del virus de dengue en células C6/36 se observó un efecto citopático del 90%, indicativo de la replicación viral (Fig. 5)

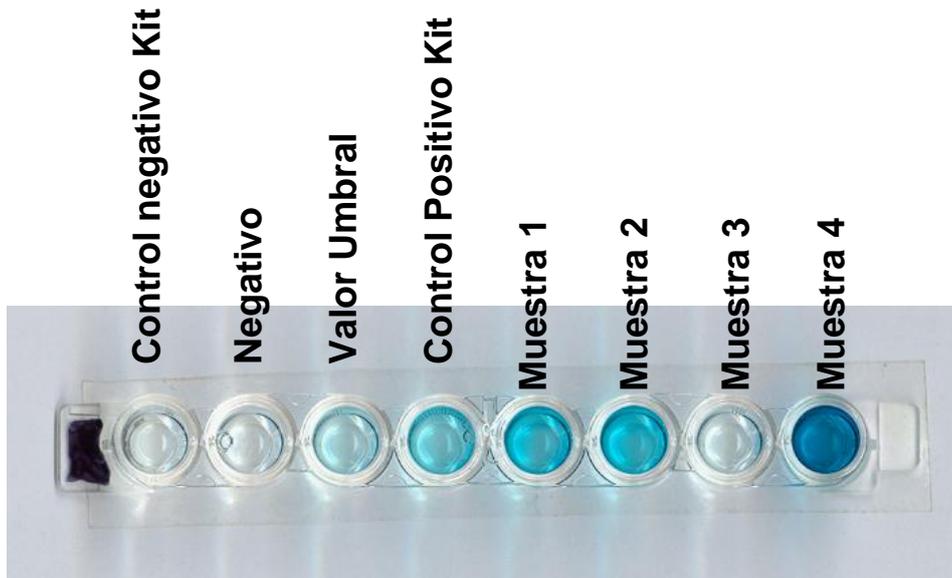


**Figura 5. Células C6/36 infectadas con DEN2.** Las células se observaron en un microscopio óptico de luz visible. A) Sin infectar y B) Células infectadas vista en aumento de 10X, C y D) Células infectadas, vistas en aumento de 100X. Nótese las células multinucleares o formación de sincicios (fusión celular) (a), alteraciones de la morfología celular (b) y los espacios carentes de células por acción de la lisis celular (c) todos, ejemplos característicos del efecto citopático del virus del dengue serotipo 2.

## 7.2. Análisis de la replicación del virus del dengue serotipo 2 mediante la detección de la proteína no estructural 1

La proteína no estructural-1 del virus del dengue es una proteína que esta ausente en el virión, pero que se sintetiza durante la replicación viral. Con base en esto, para monitorear la replicación del virus del dengue en cultivos celulares se uso el sistema comercial de ELISA por captura del antígeno (NS-1), el cual usa anticuerpos monoclonales de ratón para la captura y detección de esta glicoproteína. Se analizaron muestras provenientes de cuatro cultivos celulares, siguiendo la técnica descrita en materiales y métodos.

El criterio para considerar la ausencia o la presencia de NS1 se basó en el inserto técnico que acompaña al estuche comercial (platelia) de inmunodetección, el cual consiste en comparar la densidad óptica de las muestras con los sueros control y siguiendo la fórmula: Relación de la muestra =  $S/CO$ , que viene en el inserto técnico. El valor de corte (CO) corresponde al valor de la densidad óptica para el control de valor umbral del estuche comercial, S es la densidad óptica que se obtuvo de las muestras, los valores fueron expresados como relación entre las muestras. De acuerdo a las indicaciones, las muestras consideradas como negativas para NS1 es si la relación es menor a 0.5 y positivas es si el valor entre los positivos y negativos es 1 o mayor de 1. Se tenían 4 lotes de virus a los cuales se les determinó cantidad de proteína NS1, tres resultaron positivos ya que sus valores fueron de 4.115 muestra 1, 4.179 muestra 2, 0.44 muestra 3 y 6.2539 muestra 4. El lote utilizado en los experimentos de este proyecto fue el lote con un valor de 6.2539, al cual se dio en nombre de "stock Viral DEN2, **Figura 6**.



**Figura 6. Determinación de la glicoproteína NS1 del virus dengue.** Se probaron muestras provenientes de sobrenadantes de cuatro cultivos celulares, encontrándose que en la muestra 4 se obtuvo una mayor replicación viral, por tanto se trabajó con este lote de virus.

### 7.3 Titulación del virus del dengue serotipo 2 por el método de hemaglutinación

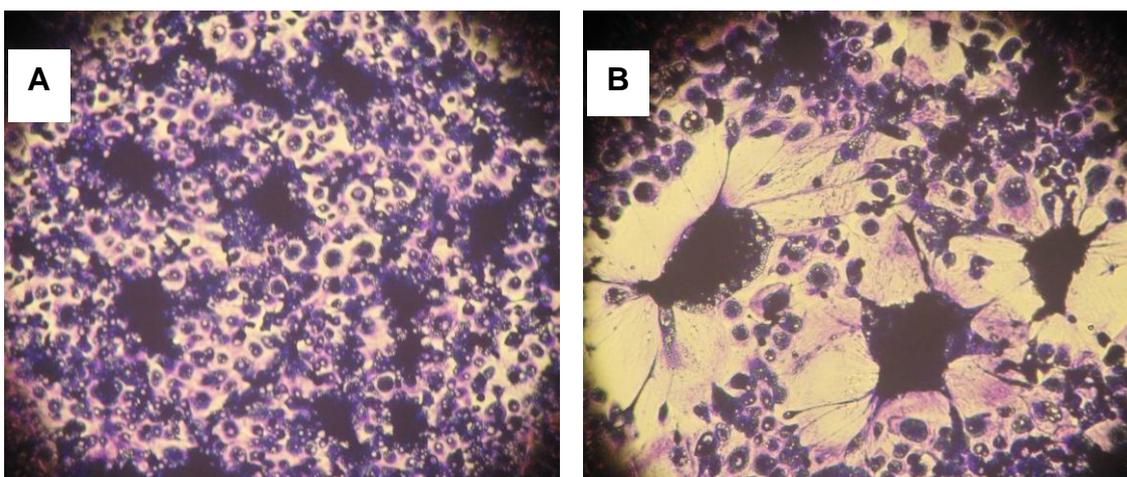
Se determinó el título para el “stock” viral DEN2 por el método de hemaglutinación, para lo cual se prepararon 11 diluciones comenzando con la dilución 1:2 del virus hasta la dilución 1:1024. Se incubaron las diluciones del virus con la solución de glóbulos de ganso según el método previamente descritos. El título viral se determinó con base en la última dilución donde aún se observaron cuatro replicas positivas (aparición de la hemaglutinación). La interpretación de la titulación se tomó considerando que el punto final de la dilución es la dilución más alta del antígeno en la que se observa el 100% de la hemaglutinación. Por lo que se considera que en esta dilución existe una unidad hemaglutinante (UHA). La dilución que contiene las UHA deseada del Antígeno, se determinó dividiendo el punto final de la hemaglutinación entre 4 para obtener UHA en 20  $\mu$ L de suspensión del antígeno (de la Modificación a la

norma oficial mexicana NOM-044-Z00-1955, Campaña nacional contra la influenza aviar).

La dilución donde el valor de concentración fue el más bajo para el cual se obtuvo resultados positivos fue de 1:256. De acuerdo a lo anterior la dilución que contiene las UHA deseada es 1/64 ya que en esa dilución contiene 4 UHA.

#### **7.4 Titulación del virus del dengue serotipo 2 por el método de unidades formadoras de Placa**

Las células C6/36 es una línea altamente permisiva al virus del dengue (White, 1987). Y dicha infección ocurre eficientemente a pH bajos. Tomando en consideración esto, para la titulación del “stock viral” se preparó una placa de 6 pozos con células de la línea C6/36, se prepararon 5 diluciones seriadas del virus, con un factor de dilución de 10 en medio MEM. Las células C6/36 se infectaron y el número de partículas virales se determinó por el método de formación de placas, siguiendo la técnica previamente descrita.

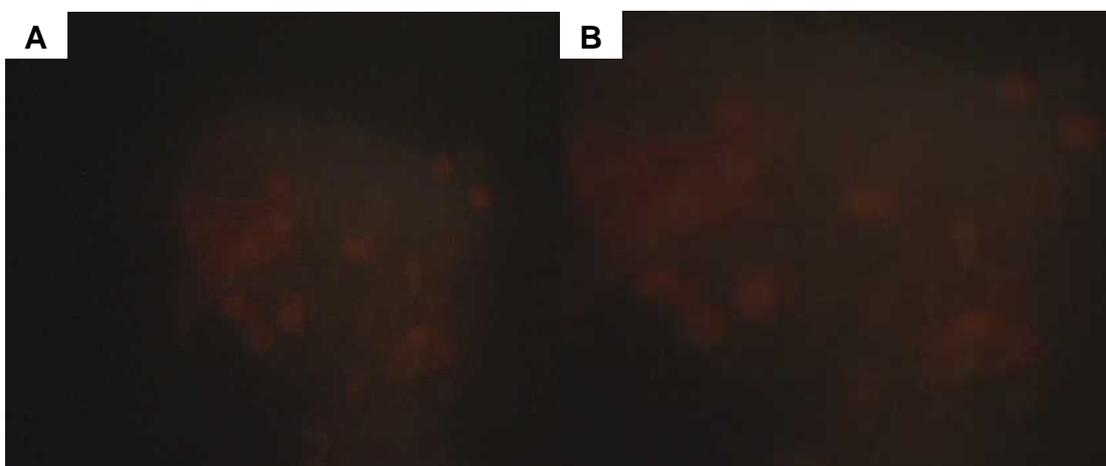


**Figura 7. Unidades Formadoras de Placa.** Células C6/36 infectadas con DEN2 fueron teñidas con cristal violeta. Las células fueron analizadas en un microscopio de óptico de luz visible. A) Sin infectar y B) Células infectadas. Nótese la presencia de placas líticas en las células C6/36 infectadas con dengue en comparación a las células no infectadas.

La dilución en la cual se realizó el conteo fue de  $10^4$ , donde el número de placas fue de 111. De acuerdo a lo anterior el título del stock viral es  $1.11 \times 10^6$  PFU./mL.

## 7.5 Análisis de la infección de linfocitos T con el virus de dengue serotipo 2, estimulados y sin estimular con PMA/Ionomicina

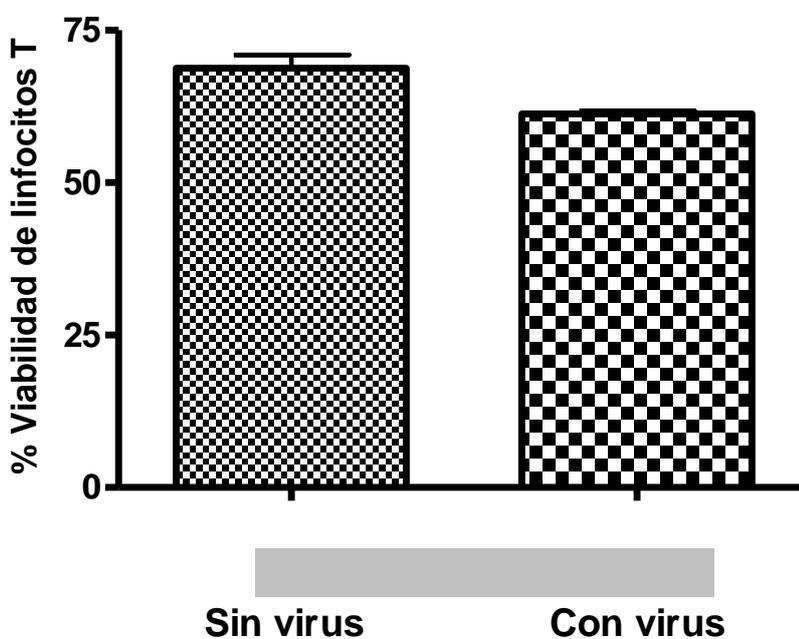
Siguiendo el protocolo de infección de linfocitos T con el virus de dengue, descrito en materiales y métodos, se encontró que los linfocitos T ya sean estimulados o no estimulados con PMA/Ionomicina por 45 minutos e incubados por tres días con el virus del dengue no se infectan, Fig. 8. Como se puede observar en las imágenes de la figura 8 no existe infección de los linfocitos T por el virus del dengue serotipo 2 ya que no existe marca fluorescente en los linfocitos infectados.



**Figura 8. Infección de linfocitos T con DEN 2.** Linfocitos T estimulados con PMA/Ionomicina por 45 min. (A) y sin estímulo (B). Se incubaron con DEN2 por tres días y después fueron marcados con anticuerpos de Ratón anti-envoltura seguido por un conjugado (anti-IgG de ratón-FITC) Las células se analizaron con un microscopio de inmunofluorescencia. Nótese la ausencia de marca fluorescente en los linfocitos T, confirmando que no hay infección.

## 7.6 Análisis de la viabilidad de linfocitos T incubados con y sin el virus del dengue serotipo 2

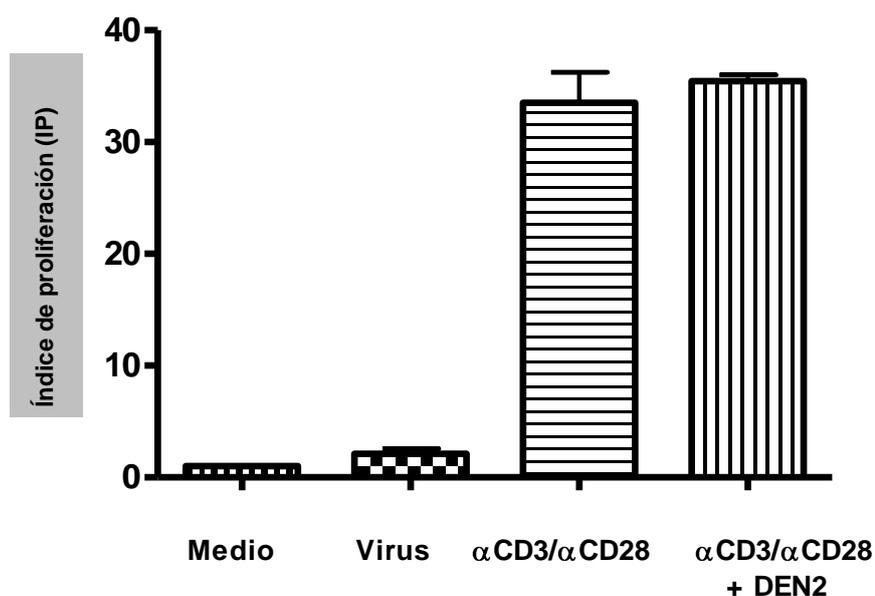
Para determinar la viabilidad de los linfocitos T sin infectar e infectados con el virus del dengue serotipo 2 (DEN2) por tres días fue observada. Después de 3 días de incubación de los linfocitos con DEN2. Los linfocitos se tiñeron con azul tripano, la **Figura 9** nos indica el porcentaje de células muertas y vivas, después de los tres días de infección.



**Figura 9. Porcentaje de viabilidad de linfocitos T.** Los linfocitos se incubaron con y sin DEN2 durante 72 horas, después se tiñeron con azul tripano para posteriormente cuantificar los linfocitos vivos. Se encontró un alto porcentaje de linfocitos T vivos en ambas condiciones.

## 7.7 Análisis del efecto del virus del dengue serotipo 2 en la proliferación de los linfocitos T

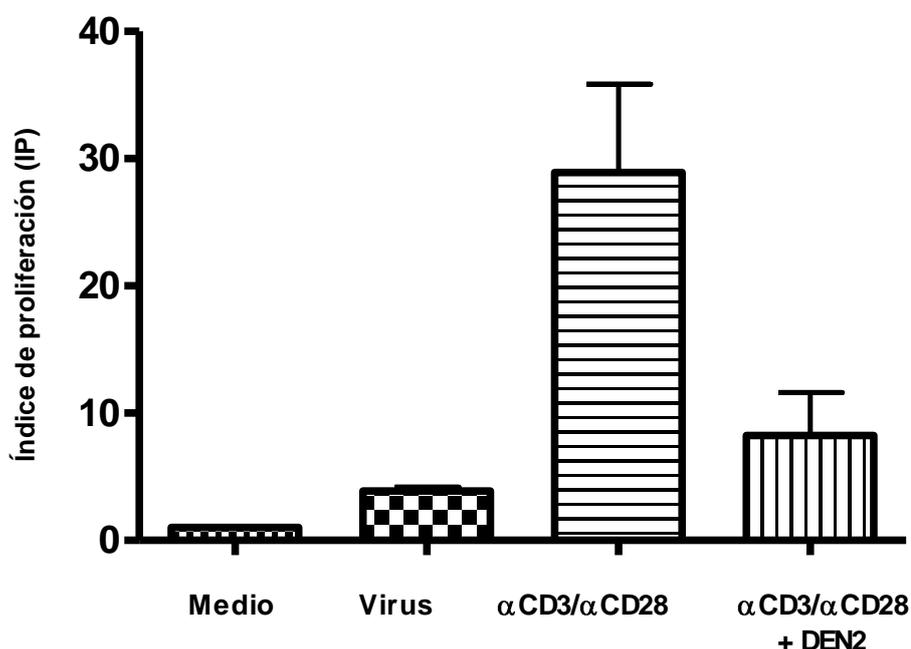
El efecto del virus del dengue serotipo 2 (DEN2) se analizó mediante la determinación de la proliferación de los linfocitos T activados. Inicialmente se incubaron células mononucleares totales de sangre periférica con DEN2 por 45 minutos y posteriormente se estimularon con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. La proliferación se determinó por la incorporación de [ $^3$ H] timidina. El experimento se realizó cuatro veces por triplicado (figura 10). Se observó que no existe una disminución en la proliferación de los linfocitos T activados en respuesta a la incubación previa con DEN2.



**Figura 10. Efecto del virus del dengue en células mononucleares de sangre periférica activadas con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28.** Representación de dos experimentos diferentes. Las células fueron incubadas con el “stock viral DEN2” por 45 minutos. Posteriormente fueron estimuladas con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. La incubación duró 72 horas.

Posteriormente, se realizaron tres experimentos por triplicado con linfocitos T enriquecidos por columnas de Nylon.

Inicialmente los linfocitos T se incubaron con DEN2 por 45 minutos y posteriormente se estimularon con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (figura 11), se observa que existe una disminución en la proliferación de los linfocitos T previamente incubados con DEN2 en comparación con las células que se incubaron solo con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28.

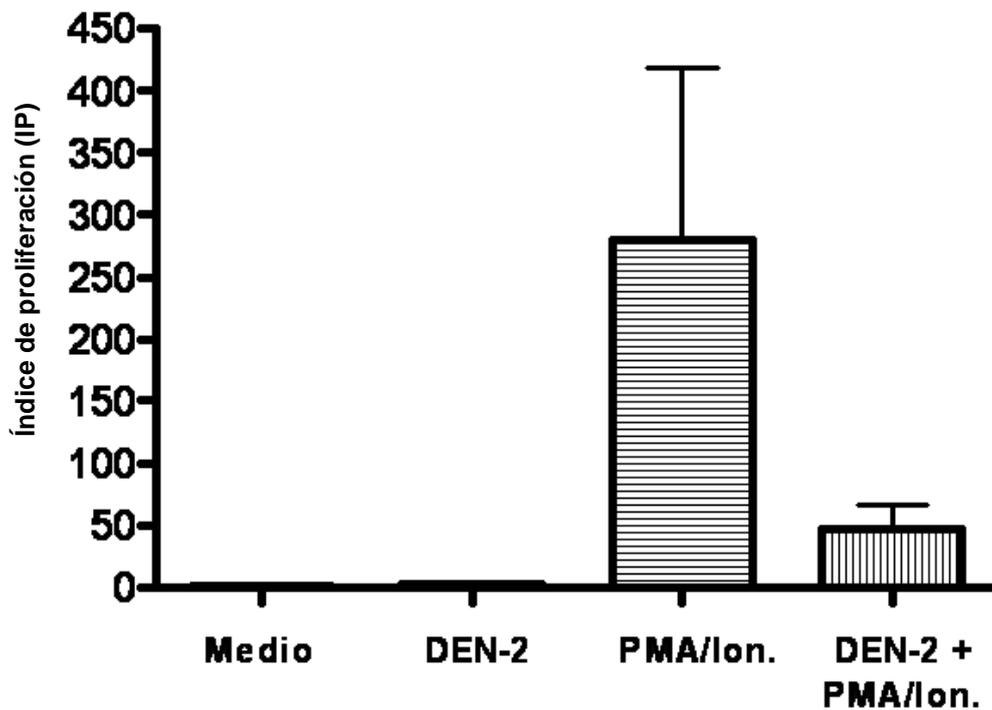


**Figura 11. Efecto de DEN2 en la proliferación de linfocitos T activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28.** Resultado de linfocitos T sin y con DEN2. Las células fueron incubadas con DEN2 por 45 minutos y posteriormente estimuladas con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 e incubadas por 72 horas. El grafico muestra la reducción de la proliferación de los linfocitos T estimulados cuando fueron incubados con DEN2.

En un tercer experimento, los linfocitos T se incubaron con DEN2 por 45 minutos y se estimularon con PMA/Ionomicina.

El experimento se realizó con linfocitos T provenientes de tres individuos por triplicado, figura 12. El resultado, muestra que existe una disminución en la

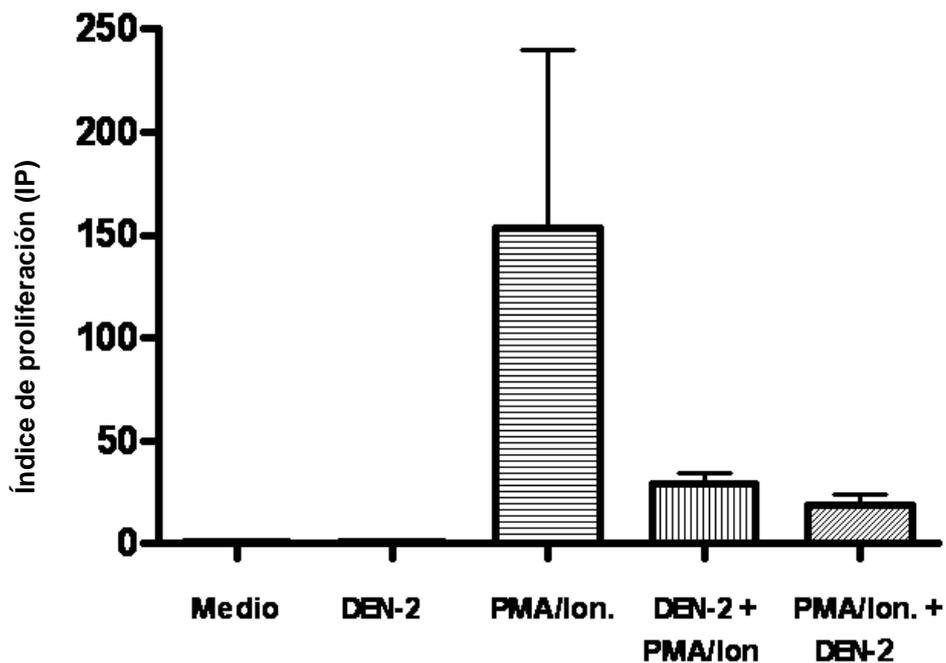
proliferación de los linfocitos T activados en respuesta a la incubación previa con DEN2.



**Figura 12. Efecto de DEN 2 en la proliferación de linfocitos T activados con PMA/Ionomicina.** Las células fueron estimuladas con PMA/Ionomicina por 45 minutos. Posteriormente fueron incubadas con el virus por 72 horas. El grafico muestra la reducción en la proliferación de los linfocitos T cuando fueron incubados con DEN2.

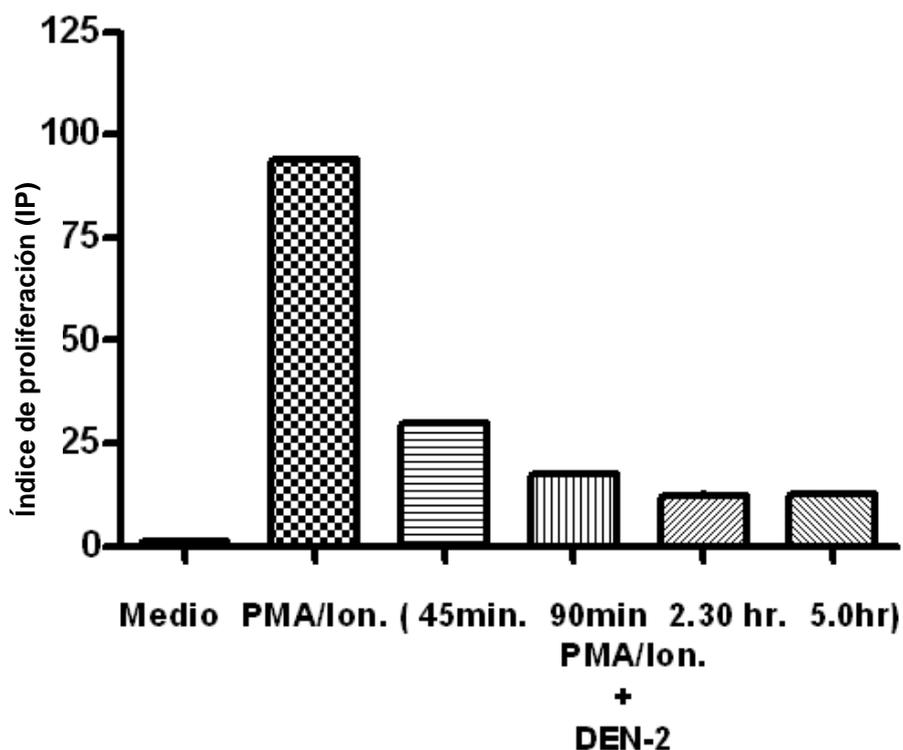
Para confirmar este resultado se realizó otro experimento a fin de determinar si el efecto de inhibición es un evento que ocurre en etapas tempranas.

Los linfocitos T fueron primero activados con PMA/Ionomicina por 45 minutos y posteriormente incubados con DEN2. El resultado que se observa en la figura 13, muestra que la inhibición en la proliferación persiste cuando las células fueron inicialmente estimuladas con PMA/Ionomicina.



**Figura 13. Efecto de dengue en linfocitos T activados con PMA/Ionomicina.** Representación del resultado de linfocitos T estimulados con PMA/Ionomicina sin y con la incubación con DEN2. Las células fueron incubadas con DEN2 o PMA/Ionomicina por 45 minutos. Posteriormente fueron estimuladas o incubadas con DEN2 e incubadas por 72 horas. El gráfico muestra la reducción en la proliferación de los linfocitos T aún cuando fueron primero incubados con PMA/Ionomicina.

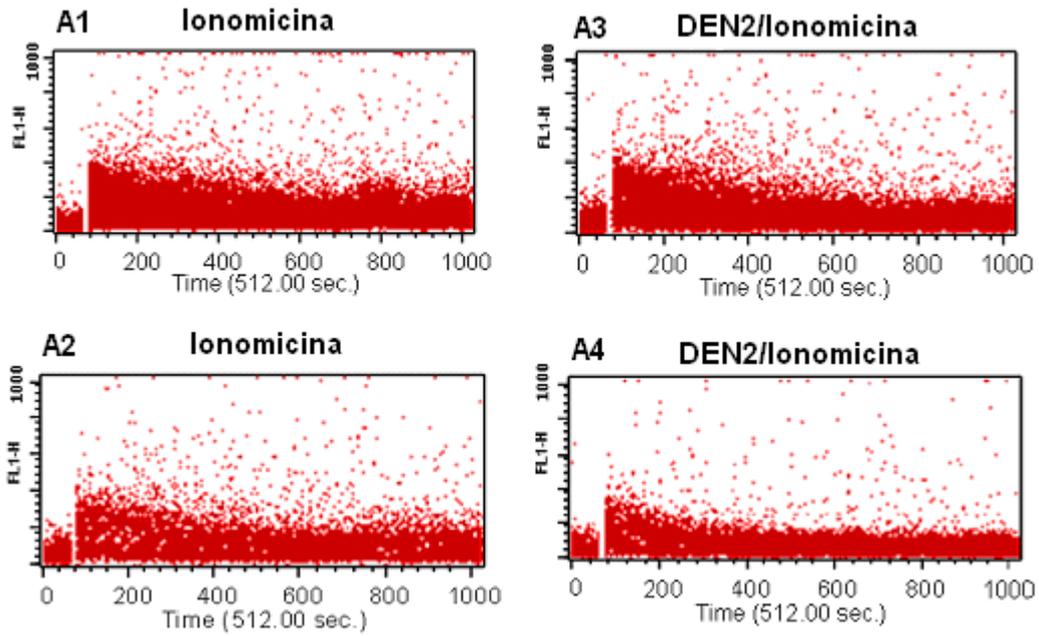
Posteriormente se contempló la posibilidad de que al incrementar los tiempos de activación podría no ocurrir la inhibición de la proliferación de los Linfocitos T. Para esto se realizó otro experimento en el que se estimularon los LT con PMA/Ionomicina en diferentes tiempos hasta llegar a las 5 horas de estimulación. En este experimento se observa, que la inhibición se mantiene aun después de 5 horas de estimulación.



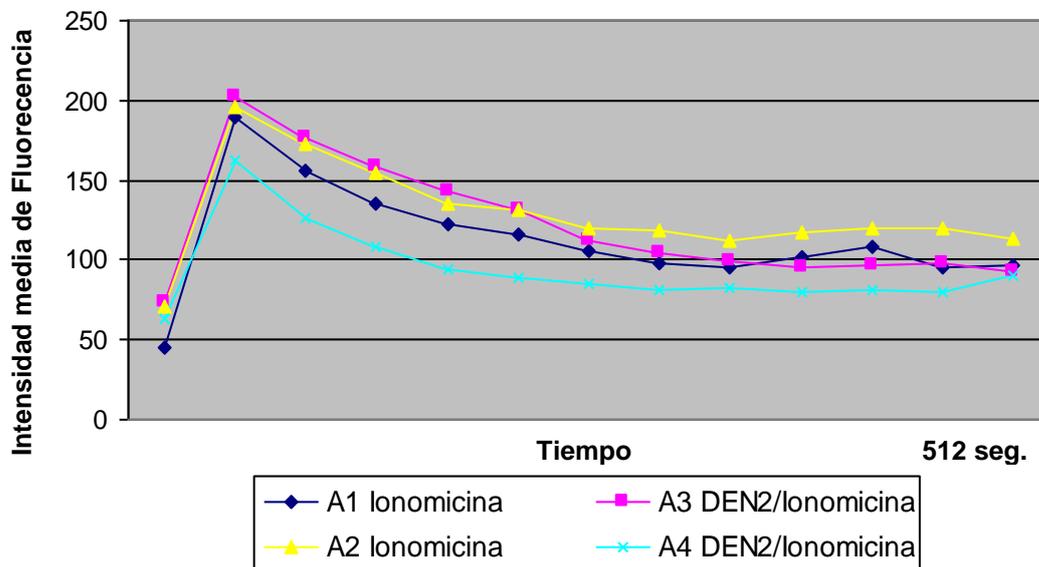
**Figura 14. Efecto de DEN2 en la proliferación de linfocitos T activados con PMA/ionomicina.** Los linfocitos T fueron primero estimulados con PMA/ionomicina por 45, 90, 2:30 horas y 5 horas. Posteriormente se adicionó DEN2 y se incubaron por 72 horas.

## 7.8 Análisis del efecto del virus del dengue serotipo 2 en la movilización de calcio intracelular en linfocitos T

Como se mencionó previamente, la translocación de NFAT al núcleo esta regulada por el aumento de calcio intracelular. Así que cualquier variación en los niveles de calcio a causa del virus dengue repercutiría en la activación de NFAT. Para esto se analizaron tres muestras de linfocitos T por duplicado de diferentes individuos. Linfocitos T, previamente expuestos a DEN2, fueron estimulados con Ionomicina. Como control positivo lo linfocitos T fueron estimulados solo con Ionomicina. En las Figuras 15 y 16 se observa que no hay cambios que indiquen que el virus del dengue esta induciendo modificaciones en la movilización de calcio en comparación a las células estimuladas con Ionomicina.



**Figura 15. Ensayo de movilización de calcio.** Este es una representación de un experimento por duplicado. Muestra la movilización de calcio intracelular en linfocitos T en 8 minutos. A1 y A2 son linfocitos T estimulados con sólo ionomicina, A3 y A4 son linfocitos T incubados con DEN2 y estimulados con Ionomicina.



**Figura 16. Efecto de DEN2 en la movilización de calcio intracelular en linfocitos T.** Se comparo la cinética de la movilización de calcio intracelular de los cuatro esquemas anteriores. En las dos condiciones, no se observa diferencia en la movilización de calcio.

## 8. Discusión

El Dengue hemorrágico, que es la forma clínica más severa de la enfermedad y que puede conducir al síndrome de choque y a la muerte, se caracteriza por alteraciones bien definidas en los mecanismos de la coagulación. Estas alteraciones han sido propuestas por la organización Mundial de la Salud y el “Center for Disease Control” (CDC) de Atlanta, como criterios para la clasificación de los caso clínicos del dengue.

Numerosos estudios han abordado el efecto del virus del dengue en el humano y se han logrado identificar algunas de las células que son susceptibles de ser infectadas, así como algunos de los mecanismos por los que las células son infectadas. Sin embargo, son pocos los trabajos en los que se ha analizado el impacto directo que el virus tiene sobre las funciones de las células hospederas y sus repercusiones en el organismo. De alguna forma esto ha sido una de las limitantes para conocer las causas que conducen al cuadro clínico más grave.

Una observación poco analizada es la disminución del número de linfocitos durante la etapa aguda de la infección (Rothman y col., 1999).

Los estudios sobre la susceptibilidad de los linfocitos T a la infección con el virus del dengue concluyen que los linfocitos T no son permisibles a la infección. Así, se ha observado que linfocitos T incubados con el virus del dengue (DV2-16681) y marcados con anticuerpos anti-envoltura acoplados a algún fluorocromo para la detección del virus por citometría de flujo no presentan un incremento significativo en la fluorescencia, lo que indica que no hay infección (Clyde y col., 2006). Sin embargo, hay reportes contradictorios (Mentor y Kurane, 1997). Por otro lado, está ampliamente aceptado que durante infecciones posteriores con nuevos serotipos, los linfocitos T son una fuente importante de citocinas con actividades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias aunque esto, por si mismo, no explica la disminución en el número de linfocitos T durante la infección.

La activación de los linfocitos T requiere al menos de la estimulación de dos tipos de moléculas; el TCR y el CD28. La estimulación de estas moléculas desencadena una cascada de señales intracelulares que desembocan en la activación de varios factores de transcripción, de los cuales los mejor

caracterizados y relacionados en la activación de los linfocitos T son NF $\kappa$ B, AP-1 y NF-AT. Un vez que estos factores nucleares son activados, se inicia, en el núcleo, la transcripción de mRNAs para varias citocinas. De todas las citocinas que son producidas por los linfocitos T, la IL-2 juega un papel esencial en la inducción de la proliferación clonal, la cual es producida únicamente por linfocitos Th1 y linfocitos Tc1.

Por lo tanto, una forma para evaluar la activación de los linfocitos T, es a través de la determinación de IL-2 e IL-2R, así como de la proliferación clonal. La determinación de IL-2R y la proliferación celular son importantes por dos razones, primero porque los linfocitos Th2 no son productores de IL-2 y segundo porque los linfocitos T requieren de IL-2 para proliferar. Por lo tanto la disminución en la capacidad proliferativa puede deberse a defectos específicos en alguna de las vías de señalización involucradas en la producción de IL-2, la expresión de IL-2, así como las vías de señalización involucradas en la activación de IL-2R.

Para determinar el efecto de DEN2 en la proliferación celular, células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos T fueron incubados en presencia de DEN2 y estimulados con estímulos policlonales (PMA/Ionomicina o  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28). La primera parte de este estudio consistió en la preincubación de CMSP con DEN2 por aproximadamente 45 minutos y la posterior estimulación con anticuerpos  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 acoplados a esferas. Los resultados (figura 6), muestran que la incubación de las CMSP con DEN2 no afecta la proliferación inducida con anticuerpos  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. Posteriormente se realizaron experimentos con suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos T, las cuales se incubaron en presencia de DEN2 por 45 minutos previos a la estimulación con anticuerpos  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 acoplados a esferas ó con PMA/Ionomicina. Las figura 7 y 8 muestran que la preincubación de los linfocitos T con DEN2 afecta la proliferación celular inducida por anticuerpos  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. Así mismo, las figura 9 y 10 muestran que la pre-incubación con DEN2 afecta la proliferación celular inducida por PMA/Ionomicina.

En un estudio realizado por Rothman y col. (1999) se observó que las células mononucleares de sangre periféricas (CMSP) provenientes de pacientes en etapas agudas de la infección con dengue no proliferaron en respuesta a la

estimulación con fitohemaglutinina (PHA), antígenos de virus dengue ó toxoide tetánico. Por el contrario, las CMSP provenientes de pacientes en fase de convalecencia si respondieron a la estimulación. Los autores sugieren que la respuesta proliferativa *in vitro* de CMSP a mitógeno o antígenos específicos está suprimida en las etapas agudas de la infección. Al adicionar IL-2, IL-7 o con anticuerpos  $\alpha$ CD28, así como CMSP alogénicas irradiadas y no irradiadas de individuos sanos, además de anticuerpos  $\alpha$ CD3 o PHA, la proliferación celular fue restaurada.

No hay estudios que expliquen los mecanismos por lo cuales se inhibe la proliferación de linfocitos T, ni los mecanismos por los cuales se reestablece la capacidad proliferativa al adicionar IL-2, IL-7 o con anticuerpos  $\alpha$ CD28, en células provenientes de sujetos infectados.

Este trabajo muestra que la proliferación de CMSP de sujetos sanos en respuesta a la estimulación con anticuerpos  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 no es afectada por la incubación previa con DEN2, lo que contrasta con la inhibición de la proliferación de suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos T, en las que si se observó un efecto inhibitorio inducido por la presencia de DEN2 en los cultivos.

La primera señal para la activación para los linfocitos T proviene de la estimulación del TCR. *In vitro*, esta señal se puede imitar utilizando anticuerpos  $\alpha$ CD3, PHA como primera señal de activación y como segunda señal tenemos los ligandos de CD2, CD28, CD40, CD137, 4-1BB ligando, así como de citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  ó moléculas de adhesión, como ICAM-1 y LFA-3. Por otro lado PMA/Ionomicina activa proteína cinasa C e induce la movilización de calcio en la célula.

De las citocinas producidas por monocitos que actúan como segunda señal para la activación de linfocitos T están IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  cuya producción se mantiene aún después de haber sido irradiados (Thorsby y col. 1988; Fujihara y col. 1996; Boonstra y col., 2000). Billiau y col. (1988) mostraron que IL-6 incrementa la proliferación de linfocitos T estimulados con PHA y que, IL-1 $\beta$  tiene un efecto sinérgico con la IL-6 (Aarde y col., 1989). Además, la estimulación de linfocitos T con PHA/IL-6 sigue una vía independiente de la

inducida por IL-2 y que no induce la síntesis de IL-2. Sin embargo, tiene un efecto sinérgico con IL-2 e induce la expresión de IL-2R (Junming y col., 1988).

Con base en lo anterior, una posible explicación para el hallazgo de que DEN2 no inhibe la proliferación de CMSP en respuesta a con anticuerpos  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 es que los monolitos presentes en el cultivo son una fuente de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , lo que no ocurre en las suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos y por lo tanto DEN-2 inhibe la respuesta proliferativa.

Adicionalmente, se ha demostrado que IL-6 e IL-2 inducen la fosforilación de STAT3 y STAT5, respectivamente (Schindler y col., 1996), ambos factores de transcripción están asociados con la proliferación celular y con la inhibición de la apoptosis de linfocitos T.

Este trabajos muestra que la proliferación celular inducida con PMA/Ionomicina o con anticuerpos  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 en suspensiones celulares enriquecidas en linfocitos T, se inhibe en presencia de DEN2.

La estimulación de CD28 induce la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF $\kappa$ B, mientras que la estimulación del TCR con o sin la participación de CD28 resulta en la activación de NFAT, AP-1 y NF $\kappa$ B (Sansom y col., 1996), mientras que PMA es un activador de PKC, RAS y de la cascada ERK, así como P38 y JNK y la Ionomicina activa el sistema Calcio/calmodulina (Ferrante y cols. 199), que en conjunto inducen la activación de NFAT, AP-1 y NF $\kappa$ B.

Funcionalmente, NFAT (del inglés Nuclear Factor of activated T cells) es un factor de transcripción involucrado en la proliferación de linfocitos T. Su activación y translocación al núcleo está regulada por la concentración de calcio intracitoplásmico, ya que éste se une a calcineurina confiriéndole actividad de fosfatasa, en su forma activa desfosforila al NFAT que se localiza en el citoplasma (NFATc), lo que permite su translocación al núcleo (NFATn). Por lo tanto las variaciones en los niveles de calcio citoplásmico determinara la desfosforilación de NFAT. En estado de reposo, los linfocitos T mantienen una concentración de calcio intracitoplásmica baja y prácticamente constante. Cuando los linfocitos T son activados, la concentración de calcio en el citoplasma aumenta como consecuencia de la liberación de calcio de reservorios intracelulares (calciosomas) y del ingreso de calcio extracelular a

través de canales de calcio que se abren como consecuencia del vaciamiento de los calciosomas. Gradualmente, las concentraciones de calcio citoplásmico regresan a su nivel basal. Como una forma de determinar si el virus del dengue tiene algún efecto sobre la vía de activación de NFAT, se analizó la concentración de intracitoplásmica de calcio en linfocitos T incubados en presencia o ausencia de dengue, utilizando fluo-3 como indicador y citometría de flujo en tiempo real. La cinética de movilización de calcio fue analizada durante 8 minutos posteriores al estímulo con ionomicina. Este análisis mostró que no hay diferencia significativa en la movilización de calcio entre las células preincubadas con DEN2 y las que no estuvieron expuestas a DEN2 (figura 11 y 12). Lo que sugiere que en el mecanismo por el cual dengue inhibe la respuesta proliferativa de los linfocitos T no depende de alteraciones en las concentraciones de calcio y, posiblemente, tampoco de alteraciones en NFAT, aunque esto último deberá ser confirmado en estudios posteriores, además de analizar posibles alteraciones en AP-1 y NFκB.

## 9. Conclusiones

- ❖ DEN2 no inhibe la proliferación de CMSP estimuladas con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28.
- ❖ DEN2 inhibe la proliferación de linfocitos T enriquecidos por columnas de nylon estimulados con PMA/Ionomicina y  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28.
- ❖ La movilización de calcio no es alterada por DEN2.
- ❖ La disminución de la proliferación de linfocitos T no depende de la movilización de calcio intracelular.

## 10. Bibliografía

1. Aarde L, Boeije L y Helle M. 1989. IL-6 is an intermediated in IL-1-induced thymocytes proliferation. *J. Immunol.* 142: 4335-4338.
2. Allison S, Chalice J, Stains K, Mandy C y Heinz F. 2001. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flagitious envelope protein *Eur. J. Virol.* **75**(9): 4268-4275.
3. Averutian P, Malaise P, Salinger B, Brandi S y Human M. 1998. Dengue virus infection of human endothelial cell leads to chamomile production, complement activation, and apoptosis. *J. Immunol.* 168: 6338-6346.
4. Behrens y Riera Sans. 2007. Regulation of  $\alpha\beta/\gamma\delta$  T cell development by the activator protein 1 transcription factor C-Jun. *J. Immunol.* 178: 5690-5700.
5. Billiau A, Damme J, Lorre K, Baroja M, Ceuppens J. 1988. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as accessory signal. *J. Immunol.* 141: 3868-3874.
6. Bressanelli S, Stiasny K, Allison S, Stura E, Duquerroy S, Pescar J, Heinz F y Rey F. 2004. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrana fusion conformation. *EMBO J.* 23: 728-738.
7. Boonstra A, Oudenaren A, Barendregt B, Leenen P and Savelkoul H. 2000. UVB irradiation modulates systemic immune responses by affecting cytokine production of antigen-presenting cell. *Int. Immunol.* 12(11): 1531-1538.
8. Cabeza C. 2005. Dengue en el Perú: Aporte para su diagnóstico y control. 2005. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 22(3): 212-228.
9. Carrington C, Foster J, Pybus O, Bennett S y Colmes E. 2005. Invasion and Maintenance of dengue virus type 2 and type 4 in Americas. *J. Virol.* 79(23): 14680-14687.

10. Chakravarti A y Kumaria R. 2006. Circulating levels of tumour necrosis factor- $\alpha$  & interferon- $\gamma$  in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J. Med. Res* 123: 25-30.
11. Chu J y Ng M. 2004. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-Mediated endocytic pathway. *J. Virol.* 78(19): 10543-10555
12. Clyde K, Kyle J y Harris E. 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.* 80 (23): 11418-11431.
13. Connors M, Metcalf J, Vogel S, Dybul M, Davey R, Hallahan C, Shupert W, Laborico A, Migueles S, Kwok W, Sekaly R, Yassine-Diab B, Younes S, Johnson A, Tilton J y Lyasere C. 2003. Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4 T cell is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *J. Virol.* 77(20): 10900-10909.
14. Cover T, Unutmaz D, Torres V, Sundrud M. 2004. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(20): 7727-7732.
15. Fabbri M, Smart C, Partdi R. 2003. Cell in focus T lymphocytes. *IJBCB.* 35:1004-1008.
16. Ferrante A, Der C Hii C Li Y. 1999. Direct evidence that ERK regulates the production/secretion of interleukin-2 in PHA/PMA-stimulated T lymphocytes. *Immunol.* 96: 524-528.
17. Fujihara M, Takahashi t, Azuma M, Omiso C, Maekawa T, Yagita H Okumura K y Sekiguchi S. 1996. Decreased inducible Expresión of Cd80 and CD86 in Human Monocytes Alter ultraviolet-B Irradiation: Its involvemen in inactivation of allogenicity. *JORNAL??87(6):* 2386-2393.
18. García-Sastre A, Laurent-Rolle M, Sánchez-Burgos G y Muños-Jordán J. 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 100(24): 14333-14338.

19. Gubler D. 1998. Dengue fever y Dengue hemorrhagic. Clin. Microbiol. Rev. 11(3): 480-496.
20. Hahn Y, Hiotellis A, Nguyen D y Yao Z. 2001. Hepatitis C virus core proteins inhibit human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. J. Immunol. 167: 5264-5272.
21. Hernández M y Alvarado A. 2001. Interleuquinas e inmunidad innata. Rev. Biomed. 12: 272-280.
22. Junming L, Gay F, Reis L, Diamantstein T, Hirano T, Kishimoto T, Vilcek J. 1988. Interleukin 2-dependent an interleukin 2-independent pathways of regulation of thymocytes function by interleukin-6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8643-8647.
23. Kielian M. 2006. Class II virus membrane fusion proteins. Virol. 44: -8-47.
24. Lin C, Lei H, Shiau A, Liu H, Yeh T, Chen S, Liu C, Chiu S y Lin Y. 2002. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. J. Immunol. 169: 657-664.
25. Livingston P, Kurane I, Lai, C, Bray M y Ennis F. 1994. Recognition of envelope protein by dengue virus serotype-specific human CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell clones. J. Virol. 68(5): 3283-3288.
26. Mackenzie J, Jones M y Westaway E. 1999. Markers for *trans*-golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. J. Virol. 73(11): 9555-9567.
27. Matsuda T, Almasan A, Tomita M, TamaKi K, Saito M, Tadano M, Yagita H, Ohta T y Mori N. 2005. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cell is partly mediated by Apo2 ligand/Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. J. Gen. Virol. 86: 1055-1065.
28. Mehlhop E, Whiby K, Oliphant T, Marri A, Engle M y Diamond M. 2005. Complement activation is required for induction of a protective antibody response against West Nile virus infection. J. Virol. 79(12): 7466-7477.

29. Mentor NA y Kurane I. 1997. Dengue virus infections of human lymphocytes. *Acta Virol.* 41(3):175-176
30. Miller S, Sparacio S y Bartenschlager R. 2006. Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. *J. Biol. Chem.* 281(13): 8854-8863.
31. Mizel S, Brooks J y Yoza B. 1992. Induction of AP-1 transcription factor components during T cell activation by interleukin 1 and Phorbol Esters. *Cell Growth Diff.* 3: 677-684.
32. Moreno B, Sánchez F y Lourdes M. 2002. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophage by dengue virus serotype 2. *J. Gen. Virol.* 83. 1123-1130.
33. Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, Tadano M, Konishi E, Moriishi K y Matsuura Y. Nuclear localization of japanese encephalitis virus core protein enhance viral replication. *J. Virol.* 79(6): 3448-3458
34. Navarro E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier J, Arenzana F y Despres P. 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cell by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO report* 4: 723-728.
35. Pierre M, Frenkiel M, Duarte C, Deubel V y Despres P. 2000.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial step of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 74(1):564-572.
36. Ray D y Shi P. 2006. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. *Recent Patents on Infective Drug Discovery* 1. 45-55.
37. Reyes J, Chávez S, Medina F y Angel R. 2005. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol.* 79(8): 4557-4567.

38. Rothman A, Ennis F, Suntayakorn S, Kalayanarooj S, Vaughn D, Green S, Kurane I, Mathew A. 1999. Impaired T cell proliferation in acute dengue infection. *J. Immunol* 162:5609-5615.
39. Shaw S, Grey H, Sullivan D, Ennis E, Gopal T, Horgan K, Tanaka Y, Nutman T, Shimizu Y, Newman W y Seventer G. 1991. Major Histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1 but not ELAM-1. *J. Exp. Med.* 174: 901-913.
40. Schmitz L, Bacher S y Dienz O. 2003. NF- $\kappa$ B activation pathways induced by T cell costimulation. *FASEB J* 17: 2187-2193.
41. Simith D y Cabrera-hernandez A. 2005. Mammalian Dengue virus receptor. *Dengue Bull.* 29:118-135.
42. Seema and Jain S. 2005. Molecular Mechanism Of pathogenesis of dengue virus: entry and fusion with target cell. *Indian J Clinic Biochem.* 20(2): 92-103.
43. Sepulveda H, Cerwenka A, Morgan T y Dutton R. 1999. CD28, IL-2 independent costimulatory pathways for CD8T lymphocyte activation. *J. Immunol* 163: 1133-1142.
44. Tassaneeritthep B, Burgess T, Granelli A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller M, Pattanapanyasat E, Sarasombath S, Birx D, Steinman R, Schlesinger S y Marovich M. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cell. *J. Exp. Med.* 197(7): 823-829.
45. Thorsby E, Gaudernack G, Halvorsen R y Leivestad T. 1988. Activation of resting pure CD4 and CD8 T cells. *Scand. J. Immunol.* 27:565-572.
46. Sansom M, Edmead, Patel, Wilson A, Boulougouris G, Hall ND. 1996. Induction of activator protein (AP)-1 and nuclear factor- $\kappa$ B by CD28 stimulation involves both phosphatidylinositol 3-kinase and acidic sphingomyelinase signals. *J. Immunol.* 157(8): 3290-3297.
47. Silva M, Johnston R, White L, Lambeth C. 2005. Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *J. Clin. Microbiol.* 43:3267-3272.

48. Schindler U, Hoey T y Mcknight. Differentiation of T-helper Lymphocytes: selective regulation by members of the Stat family of transcription factor. 1996. *Genes to cells* 1: 507-515.
49. Starnbach M, Copass M y Van der Velden A. 2005. Salmonella inhibit T cell proliferation by a direct contact-dependent immunosuppressive effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(49): 17769-17774.
50. Thimme R. 2007. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 13(36): 4831-4838.
51. Thyphronitis G, Young H, Paliogianni F, Baldari C, Mavrothalassitis G, Tzako E y Kogkopoulou O. 2006. Conditional up-regulation of IL-2 production by p38 MAPK inactivation is mediated by increased ERK1/2 activity. *J. Leukoc. Biol.* 79: 1052-1060.
52. Vargas M, Plengue O, Ognio S, Arquíñigo S y Ruiz P. 2005. Dengue clásico y hemorrágico: una enfermedad reemergente y emergente en el Perú. *Rev. Med. Hered.* 16(2):120-140.
53. Verwilghen J, Baroja M, Vaeck F, Damme J y Ceuppens. 1991. Differences in the stimulating capacity of immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies: variable dependence on interleukin-1 as a helper signal for T-cell activation. *Immunol* 72: 269-276
54. Zhang Y, Corver J, Chipman P, Zhang W, Pletnev S, Sedlak D, Baker T, Strauss J, Kuhn R y Rossmann M. 2003. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* 22(11): 2604-2613..
55. Wang S, He R y Anderson R. 1999. PrM- and cell binding domains of the dengue virus E protein. *J. Virol.* 73(3): 2547-2555.