



## CULTIVOS PRIMARIOS DE LINFOCITOS T PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL VIRUS DEL DENGUE

María Leticia Ávila Ramírez<sup>1</sup>, Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea<sup>1</sup>, Juan Santiago Salas Benito<sup>2</sup>, Ricardo Francisco Mercado Curiel<sup>1</sup>.

1. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Medicina, Querétaro, C.P. 76176. 2. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, México D. F., C.P. 07320. [rhc@uaq.mx](mailto:rhc@uaq.mx)

*Palabras clave: Linfocitos T, virus del dengue.*

**Introducción.** El dengue (DEN) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en áreas tropicales y subtropicales del mundo y áreas urbanas. La infección con el virus del dengue (DENV) puede ser asintomática o causar Fiebre por Dengue (DF), Fiebre Hemorrágica por Dengue (DHF) o el Síndrome de Choque por Dengue (DSS) (1). Los cuatro serotipos del DENV son transmitidos a humanos principalmente por mosquitos *Aedes aegypti*. Los linfocitos T (LT) no son las células blanco del DENV sin embargo su participación en la patogénesis es evidente.

El objetivo fue realizar ensayos de purificación, viabilidad y proliferación de cultivos primarios de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y obtener RNA para el posterior estudio de los efectos del DENV

**Metodología.** Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por gradiente de centrifugación. Eliminación de monocitos. Enriquecimiento de LT. Purificación de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con perlas magnéticas. Pureza y viabilidad celular (VC) por citometría de flujo. Estimulación con Concanavalina A (Con A) a una concentración de 2.5, 5 y 10 µg/mL a 24, 48, 72 y 120 horas. Cuento y VC con azul de tripano. Extracción de RNA por TRIZOL. Pureza del RNA por espectrofotometría e integridad por bioanálizador y electroforesis en gel. Propagación de DENV2 New Guinea y DENV4 H-241. Titulación por ensayo de placa lítica en células BHK-21.

**Resultados.** La pureza y VC fue de 97.13% y 96.92% para CD4<sup>+</sup>, y 92.22% y 91.56% para CD8<sup>+</sup> (Fig 1). A las 24, 48, 72 y 120 horas la VC con y Sin Con A para CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se muestra en la Fig 2. A las 24 y 120 h la VC es mayor del 80% y a las 48 y 72 h la VC es alrededor del 70%; para CD8<sup>+</sup> la VC es del 80% para las 2 concentraciones de 2.5 y 5, a las 48 y 120 h las VC es del 70% con 5 µg/mL de Con A. La cantidad de RNA total extraído para CD4<sup>+</sup> fue de 3.485 mg y para CD8<sup>+</sup> de 1.45 mg. El número de Integridad del RNA de 9.4. Corrimiento electroforético en gel que muestra ausencia de degradación (Fig. 3) El título del DENV2 fue de 2.0x10<sup>4</sup> pfu/mL.

**Agradecimiento.** Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT (SALUD-2012-1-181281).

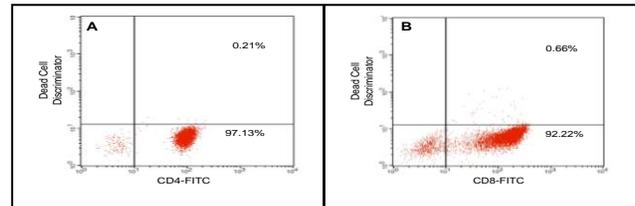


Fig. 1. Pureza de poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. El eje de las "Y" representa las células muertas y el eje de las "X" representa la pureza de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. A) CD4<sup>+</sup>. B) CD8<sup>+</sup>.

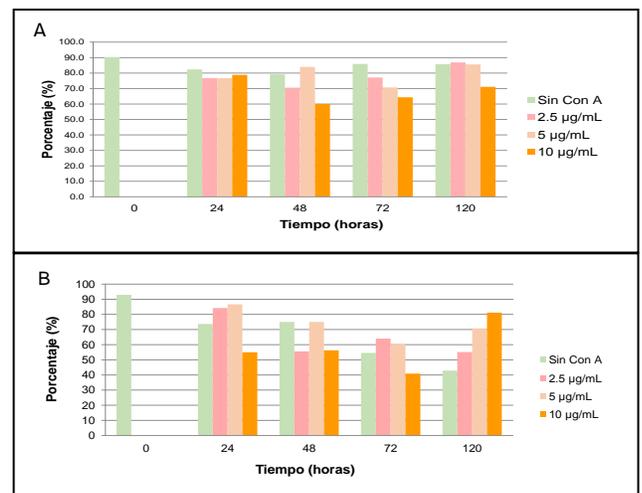


Fig. 2. Pureza de poblaciones A) CD4<sup>+</sup> y B) CD8<sup>+</sup>. El eje de las "Y" representa las células muertas y el eje de las "X" representa la pureza de las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

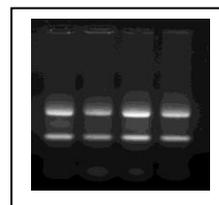


Fig. 3. Corrimiento electroforético en gel de agarosa representativo de las muestras de ARN obtenidas.

**Conclusiones.** La pureza de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> purificadas es adecuada, la viabilidad celular es del 70% aproximadamente y la integridad del RNA es de alta calidad.

**Bibliografía.** Rodenhuis-Zyberth I, Wilschut J, Smit J. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(16): 2773-2786.