



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

María Leticia Ávila Ramírez¹, Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea¹, Juan Santiago Salas Benito², Ricardo Francisco Mercado Curiel¹.

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. rfdc@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⁺ y CD8⁺ 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⁺ y CD8⁺ 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. Conteo 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⁺, y 92.22% y 91.56% para CD8⁺ (Fig 1). A las 24, 48, 72 y 120 horas la VC con y Sin Con A para CD4⁺ y CD8⁺ 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⁺ 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⁺ fue de 3.485 mg y para CD8⁺ 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 2.0x10⁴ pfu/mL.

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

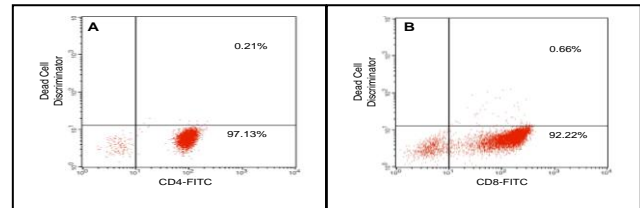


Fig. 1. Pureza de poblaciones CD4⁺ y CD8⁺. El eje de las "Y" representa las células muertas y el eje de las "X" representa la pureza de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺. A) CD4⁺. B) CD8⁺.

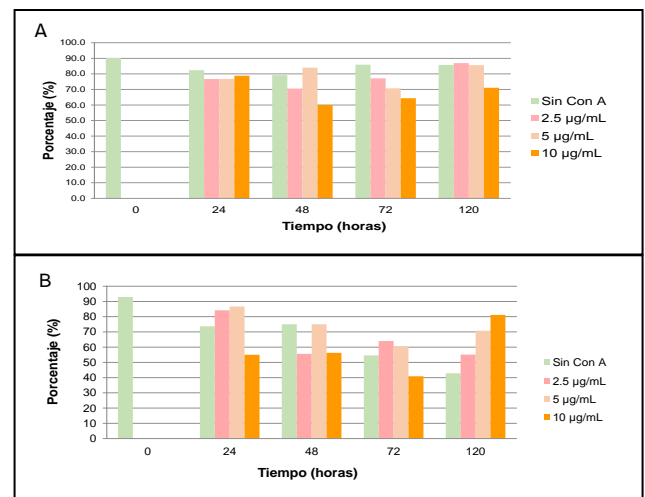


Fig. 2. Pureza de poblaciones A) CD4⁺ y B) CD8⁺. El eje de las "Y" representa las células muertas y el eje de las "X" representa la pureza de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺.

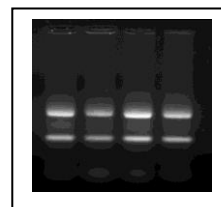


Fig. 3. Corrimiento electroforético en gel de agarosa representativo de las muestras de ARN obtenidas.

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

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