

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE TÍTULOS VIRALES POR CITOMETRÍA DE  
FLUJO: VIRUS DENGUE Y ZIKA**

**Laura Natalia Almanza Holguín**

**Juan Pablo Duque Varela**

**Universidad El Bosque**

**Facultad de Medicina**

**Programa Virología**

**Bogotá D.C**

**2020**

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE TÍTULOS VIRALES POR CITOMETRÍA DE  
FLUJO: VIRUS DENGUE Y ZIKA**

**Laura Natalia Almanza Holguín**

**Juan Pablo Duque Varela**

**Director: Felix Giovanni Delgado Tiria**

**Trabajo de Grado para Optar por el Título de Médico Cirujano**

**Universidad El Bosque  
Facultad de Medicina  
Pregrado en Medicina  
Bogotá  
2020**

## Nota de salvedad



La UNIVERSIDAD EL BOSQUE no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo de grado, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia.

## Tabla de contenido

<b>1. Resumen</b>	<b>5</b>
<b>2. Abstract</b>	<b>6</b>
<b>3. Introducción</b>	<b>7</b>
<b>4. Problema</b>	<b>8</b>
<b>5. Pregunta de investigación</b>	<b>9</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>9</b>
6.1. Objetivo general	9
6.2. Objetivos específicos	9
<b>7. Marco Teórico</b>	<b>9</b>
7.1. Epidemiología:	9
7.2. Dengue:	11
7.3. Zika	12
7.4. Métodos de cuantificación viral	12
7.4.1. Plaqueo viral	12
7.4.2. TCID 50	14
7.4.3. Focos de inmunofluorescencia	15
7.4.4. PCR	15
7.4.5. Western Blot	15
7.4.6. Inmunoprecipitación	16
7.4.7. ELISA	16
7.4.8. Hemoaglutinación	17
7.4.9. Citometría de Flujo	17
7.5. Poblaciones celulares	18
7.5.1. Células VERO	18
7.5.2. Células BHK-29	19
7.5.3. U937-DC-SIGN	19
<b>8. Antecedentes – estado del arte</b>	<b>19</b>
<b>9. Metodología</b>	<b>20</b>
9.1. Tipo de estudio	20
9.1.1. Población de estudio	20
9.1.2. Hipótesis	21
9.2. Técnica de plaqueo	21
9.3. Cultivo celular	21
9.4. Virus	21
9.5. Citometría de flujo	21

<b>9.6. Análisis estadístico:</b> .....	<b>23</b>
<b>10. Consideraciones éticas</b> .....	<b>23</b>
<b>11. Resultados</b> .....	<b>24</b>
<b>11.1. Selección de cosechas virales</b> .....	<b>24</b>
<b>11.2. Cultivo de líneas celulares</b> .....	<b>25</b>
11.2.1. Descongelación de las células.....	25
11.2.2. Mantenimiento del cultivo celular .....	25
11.2.3. Infección celular y análisis por citometría de flujo.....	26
<b>11.3. Análisis de correlación</b> .....	<b>32</b>
<b>12. Discusión</b> .....	<b>34</b>
<b>13. Conclusiones</b> .....	<b>37</b>
<b>14. Recomendaciones</b> .....	<b>37</b>
<b>15. Bibliografía</b> .....	<b>39</b>
<b>16. Anexos</b> .....	<b>44</b>

## Tabla de Gráficas

<b>Figura 1.</b> Fórmula para la determinación de Título viral en Citometría de flujo en PFU/mL.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 2.</b> <i>Fórmula para determinación de título viral en citometría de flujo</i> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 3:</b> Estrategia de análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo .....	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b> Curvas de infectividad obtenidas empleando células VERO (a), BHK-21 (b) y U937-DC-SIGN (c) con DENV 1-4 y ZIKV.....	<b>29</b>
<b>Figura 5.</b> Porción lineal de la curva de infectividad de DENV2 en células VERO.....	<b>31</b>
<b>Figura 6.</b> Ejemplo título viral DENV2 en células VERO (UIV/mL).....	<b>31</b>
<b>Figura 7.</b> Correlación estadística de los títulos virales obtenidos por Plaqueo Vs. Citometría de flujo.....	<b>33</b>

## Tabla de Cuadros

<b>Tabla 1.</b> Título viral obtenido por Plaqueo en el laboratorio de virología de la Universidad El Bosque para DENV1-4 y ZIKV .....	244
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de células VERO infectadas con DENV1-4 y ZIKV .....	277
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de células BHK-21 infectadas con DENV1-4 y ZIKV .....	288
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV1-4 y ZIKV .....	288
<b>Tabla 5.</b> Títulos virales obtenidos por Citometría de Flujo para DENV1-2 y ZIKV en células VERO, BHK-21 y U937-DC-SIGN.....	322

## 1. Resumen

La investigación básica en virología tiene como metodología Gold Estándar para el cálculo de títulos virales la técnica de plaqueo. Sin embargo, esta técnica requiere una amplia disponibilidad de tiempo y experiencias por parte del experimentador; por lo que proponer una técnica alternativa e igualmente confiable, es un reto que existe actualmente. Por tal motivo, en este proyecto se pretende comparar estadísticamente los resultados obtenidos con el método tradicional y por citometría de flujo para observar si es viable utilizar esta última como una técnica de rutina en la cuantificación de cargas virales. Para esto, fueron utilizadas tres líneas celulares diferentes (VERO, BHK-21 y U937-DC-SIGN) y los virus dengue (4 serotipos) y Zika, en un nuevo protocolo para citometría de flujo que se basa en el uso de diluciones seriadas de inóculo viral con el fin de obtener porcentajes de células infectadas y de esta manera calcular los títulos virales. Los resultados obtenidos por citometría de flujo fueron comparados con los reportados previamente por plaqueo, aplicando un análisis de correlación. Como resultado, se evidenció que los títulos virales obtenidos usando las células BHK-21 se correlacionaron significativamente con los reportados por plaqueo. Adicionalmente, se observó que las curvas de infectividad fueron diferentes entre las distintas líneas celulares empleadas, mostrando diferentes grados de susceptibilidad a la infección en el tiempo del ensayo. En conclusión, nuestros resultados muestran que la técnica de citometría de flujo puede emplearse como un método alternativo para la cuantificación de partículas virales, obteniéndose resultados que correlacionan con los obtenidos por plaqueo, siempre y cuando se empleen las células BHK-21.

**Palabras Claves:** Título viral, Dengue, Zika, Plaqueo, Citometría de flujo

## 2. Abstract

The basic research in virology has a Standard Gold methodology for the calculation of viral titer which is the plating technique. However, this technique requires a wide availability of time and experiences by the experimenter; Therefore, proposing an alternative and equally reliable technique is a challenge that currently exists. For this reason, this project aims to statistically compare the results obtained between the traditional method and flow cytometry to see if it is feasible to use the latter as a routine technique in the quantification of viral loads. For this, three different cell lines (VERO, BHK-21 and U937-DC-SIGN) and the dengue (4 serotypes) and Zika viruses were used in a new protocol for flow cytometry which is based on the use of 2-fold serial dilutions of viral inoculum in order to obtain percentages of infected cells and then calculate the viral titers. The results obtained by flow cytometry were compared with those previously obtained by plaque assay, applying a correlation analysis. As a result, it was evident that the viral titers calculated using the BHK-21 cells correlated significantly with those reported by the plaque assay. Additionally, it was observed that the infectivity curves were different between the different cell lines used, showing different degrees of susceptibility to infection at the time of the test. In conclusion, our results show that the flow cytometry technique can be used as an alternative method for the quantification of viral particles, obtaining results that correlate with those obtained by plating, as long as BHK-21 cells are used.

**Key Words:** Viral titer, Dengue, Zika, Plating Technique, Flow Citometry

### **3. Introducción**

El dengue y Zika son enfermedades virales de carácter endemo – epidémico causadas por la infección con el virus dengue (DENV) y el virus Zika (ZIKV), respectivamente (1)(2). El DENV es transmitido por el mosquito del género Aedes, principalmente por Aedes aegypti. Actualmente el dengue es la arbovirosis más importante a nivel mundial por su morbilidad, mortalidad y su alto impacto económico (1). El Zika es ocasionado por el ZIKV, arbovirus del género flavivirus (2). Estos virus han sido descritos y reportados previamente en la literatura ya que su presencia y distribución ha sido amplia a través de los años. Desde el año 2014 en América Latina el dengue era el único virus transmitido significativamente por Aedes spp; sin embargo, para mayo del año 2015, se notificaron los primeros casos de infección por el virus Zika en Brasil y en septiembre de ese mismo año en Colombia (3) (4).

Actualmente la investigación básica en virología para el estudio de virus como dengue y Zika tiene como metodología estandarizada el uso del plaqueo para obtener una carga viral de una muestra específica. Sin embargo, se requiere de amplia experiencia debido a que el mínimo descuido puede llevar a que no se obtengan resultados verídicos y confiables. Adicionalmente este método requiere de mayor tiempo para la obtención de los resultados (5). Por ende, en este proyecto se pretende plantear un método alternativo en el que se compararán estadísticamente los resultados entre el método tradicional y los obtenidos por citometría de flujo para observar si es viable utilizarlo como un método de rutina en la cuantificación de cargas virales.

#### 4. Problema

A lo largo de la historia, la cuantificación viral ha sido un paso determinante en diferentes estudios como lo son: la producción de proteínas recombinantes producidas por virus, los diversos mecanismos de infección viral y el desarrollo de vacunas (6). Esto es debido a que su valor permite que las infecciones virales se analicen con mayor precisión y que los procesos de expansión viral se controlen y se optimicen para obtener los máximos rendimientos (6).

Los métodos utilizados hoy en día se dividen en dos grupos: los tradicionales antiguos y los modernos. Los métodos antiguos tienen la ventaja de ser ampliamente aceptados, sin embargo, su principal desventaja es que requieren mucho tiempo y personal entrenado (6). Estos mismos, también pueden producir resultados que varían ampliamente entre repeticiones, modificando los valores cuantitativos precisos (6). Es por esto que los métodos modernos han sido modificados con el fin de ofrecer mejores ventajas debido a que no requieren tanto tiempo y proporcionan valores más precisos (6).

La investigación básica en virología para el estudio de virus como dengue y Zika requiere del uso del plaqueo (perteneciente a los métodos antiguos) como metodología estandarizada para la obtención de carga viral de una muestra específica (7). Este complejo proceso exige una amplia experiencia por parte del operador; así como un riguroso y dispendioso seguimiento de cada uno de los pasos por aproximadamente cinco a siete días para lograr la obtención de datos verídicos y confiables (8).

El planteamiento de un modelo alternativo, como lo es la citometría de flujo (perteneciente a los métodos modernos), utilizado como nuevo Gold Standard para la cuantificación viral, permitirá una optimización del tiempo de trabajo (24 horas) además de una disminución en el grado de dificultad y experticia que deberá manejar el operador (7). Esto facilitará los avances en laboratorio para indagar cada vez más sobre cualquier tipo de afección viral ya que la metodología a emplear podrá ser más accesible para cualquier investigador.

Para esto, se ha intentado establecer una comparación entre los resultados de la cuantificación viral obtenida por citometría de flujo y plaqueo con el fin de poder demostrar una correlación estadística

entre ambos estudios tanto para virus dengue como Zika. Hasta la fecha, solo se ha publicado un estudio que ha logrado demostrar esta correlación únicamente para Virus dengue y en células de mosquito (7). El objetivo de este estudio es demostrar esta misma correlación tanto para dengue como para Zika en líneas celulares humanas (VERO, BHK-21 y U937 que expresa DC-SIGN: receptor para entrada de virus).

## 5. Pregunta de investigación

¿Es posible obtener resultados comparables de cuantificación del título viral de DENV y ZIKV empleando los métodos de plaqueo y citometría de flujo?

## 6. Objetivos

### 6.1. *Objetivo general*

Establecer si existe correlación entre los valores de carga viral cuantificadas por método de plaqueo y de citometría de flujo en sobrenadante de cultivos infectados con virus dengue y Zika.

### 6.2. *Objetivos específicos*

1. Obtener un protocolo estandarizado de la cuantificación viral por citometría de flujo mediante el uso de células en suspensión o adheridas a una superficie.
2. Calcular el índice de correlación estadística entre los datos obtenidos por citometría de flujo comparado con el plaqueo.

## 7. Marco Teórico

### 7.1. *Epidemiología:*

El dengue y el Zika son dos enfermedades de transmisión vectorial que afecta seriamente a los países tropicales y subtropicales debido a su amplia y periódica circulación con cada vez menos restricciones ecológicas (9,10). En Colombia, ambas enfermedades representan un problema de salud pública debido a su creciente tendencia de transmisión viral con ciclos epidémicos cada vez más

cortos. Ambos virus son transmitidos por artrópodos (mosquitos) por lo que su circulación es simultánea (11,12).

El virus del Zika fue aislado por primera vez en 1947 de un mono *rhesus*. Los primeros casos en humanos se detectaron en Uganda y Tanzania en 1952. Posteriormente el virus se diseminó por África y Asia. El primer gran brote reconocido ocurrió en las Islas Yap de Micronesia en el 2007. Otro brote aún más grande ocurrió en la Polinesia - Francia entre 2013 y 2014. Sin embargo, las infecciones por Zika se detectaron por primera vez en febrero del 2014 en la isla de Pascua en Chile (12). Su presencia en el territorio colombiano fue confirmada por el Ministerio de Salud de Colombia en octubre de 2015 en donde actualmente afecta alrededor de 718 municipios en 32 departamentos que se encuentren por debajo de 2200 msnm (13). En el año 2015 fue el segundo arbovirus emergente en el territorio nacional (el primero fue chikungunya). Transcurrió solamente un año para que desde septiembre de 2015 (semana epidemiológica 40) hasta enero de 2016 (semana epidemiológica 3) para que se produjeran 20.979 casos (3, 4).

El virus del dengue aparentemente está presente desde hace más de 200 años. Sin embargo, hasta la década de 1940 es donde se establece la etiología del virus. Los cambios principales en la epidemiología de las infecciones por el virus dengue inician posterior a la segunda guerra mundial y la expansión geográfica de la transmisión continua hasta la fecha (14). Se ha visto que su comportamiento cíclico se ha caracterizado por picos epidémicos cada 3-4 años (15). Su presencia se sitúa en todo departamento que se encuentre entre 1000-2200 msnm afectando casi el 80% del territorio; 125 municipios y 22 departamentos, con predominio en Santander y Norte de Santander (16).

En el año 2014, en América Latina, el DENV era el único virus transmitido significativamente por *Aedes spp*. Sin embargo, desde ese mismo año el chikungunya se presentó como un arboviral secundario con posible circulación en zonas endémicas de la zona e incluso coinfecciones.0020Adicionalmente a lo previamente mencionado para mayo del año 2015 se

notificaron los primeros casos de infección por el virus ZIKV en Brasil y en septiembre de ese mismo año en Colombia. Incluso se han presentado casos en los que se reportan coinfección con los tres virus en un mismo paciente (4).

### 7.2. Dengue:

El dengue es una enfermedad viral aguda causada por el DENV del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*; en el cual se encuentran cuatro serotipos diferentes denominados DENV1-DENV4. Este virus es transmitido por el mosquito hembra del género *Aedes*, especie *aegypti* y *albopictus* (9,15).

La transmisión del virus al humano depende de la interacción directa entre el mosquito hembra con un individuo virémico. Al ingerir la sangre infectada del humano al mosquito cuando este se está alimentando, se favorece la infección de las células epiteliales del intestino por el virus que posteriormente se almacenará en las glándulas salivales. Estas últimas serán los órganos reservorio del virus que, al picar nuevamente a un individuo sano para alimentarse, liberará saliva y con ella el virus que entrará en contacto con el sistema circulatorio de su nuevo huésped. El periodo de incubación oscila entre 3-7 días, tiempo en el que el virus ingresa al sistema circulatoria en búsqueda de sus células dianas: monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos CD4+ y CD8+ (15). Posterior a esto, el virus inicia su ciclo replicativo en ganglios linfáticos y su diseminación, vía linfática o hemática, a otros órganos y tejidos como células endoteliales, varias líneas celulares hepáticas, fibroblastos y neuronas (9,15,17).

### Estructura DENV

DENV es un virus icosaédrico recubierto por una membrana lipídica, obtenida de la célula huésped infectada, en la que se anclan diversas proteínas de membrana y de envoltura. En su interior, se encuentra un complejo riboproteico compuesto por una cápside y un genoma viral tipo (+)ssRNA (15).

Las proteínas que conforman la membrana son la proteína M y la proteína E en donde esta última es la más relevante. Esto se debe a que es la única proteína viral que interacciona con los receptores

de membrana plasmática de la célula a infectar favoreciendo su endocitosis. Posee tres dominios denominados I, II y III que forman complejos homodiméricos tipo cabeza-cola. Los dominios II y III permiten la interacción entre el virus y los receptores de las células blanco. La glucoproteína E es el principal inmunógeno del virus que estimula la respuesta inmune y la producción de anticuerpos (15).

### 7.3. Zika

La enfermedad de Zika es ocasionada por el ZIKV del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Su vector de transmisión es el mismo para los virus dengue, fiebre amarilla y chikungunya (mosquitos hembra del género *Aedes*). Adicionalmente, se describen otras formas de transmisión como la perinatal, la transfusional y la vía sexual (18).

Su periodo de incubación es de 3-12 días afectando las mismas células diana que el DENV (19). Este virus también es (+)ssRNA y comparte la mismas características estructurales con DENV, donde las proteínas M y E hacen parte de su membrana celular (20).

### 7.4. Métodos de cuantificación viral

Los métodos más utilizados para la cuantificación viral se dividen en tres grandes grupos: aquellos que miden la infectividad viral (plaqueo viral, TCID 50, ensayos de focos de inmunofluorescencia), los que buscan detectar y examinar la presencia del núcleo o proteínas virales (qPCR, inmunoprecipitación, ELISA, Ensayo de hemoaglutinación), y las que se dependen del conteo directo de partículas virales físicas en la muestra (citometría de flujo, TEM) (8).

#### 7.4.1. Plaqueo viral

Este método se implementó en el año 1952 y fue el primero en calcular cuantitativa y cualitativamente los títulos virales (21). El plaqueo es el método más ampliamente usado para la purificación de una población clonal viral o para la determinación de un título viral. Una placa es el resultado de la infección de una célula blanco por un virión (8).

Este método se practica sobre una monocapa de células susceptibles a ser infectadas en donde se adiciona el virus específico diluido en series de 10. Posteriormente, esto es cubierto con un medio semisólido (como agarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa) que evita que el virus se propague de su célula hospedera a las células vecinas (8,21). Sin embargo; actualmente los recubrimientos líquidos han venido convirtiéndose en una alternativa cada vez más atractiva debido a que tienen ventajas con respecto a las sólidas. Las superposiciones líquidas se pueden implementar en temperatura ambiente y su aplicación y eliminación es más sencilla. Debido a que no requieren calentamiento, los virus que son más propensos y lábiles al calor también pueden ser más fáciles de detectar (21).

Como resultado de este proceso, se producirá la muerte y desprendimiento de la célula infectada, dejando puntos vacíos en la monocapa que pueden ser cuantificados por microscopía de luz. Es así como se obtiene la proporción de viriones infecciosos dada por unidades formadoras de placas por mililitro. En ocasiones, es necesario el uso de tintes para mejorar el contraste entre las células vivas y las placas. Para que el ensayo de plaqueo sea exitoso, son necesarias ciertas condiciones respecto a las células blanco. Estas deben ser células sanas en fase logarítmica >95% de viabilidad en el momento de la prueba (8).

Aunque este método sea el GOLD STANDARD para la cuantificación viral, se considera como un proceso que toma mucho tiempo ya que requiere entre 4-10 días obtener resultados dependiendo del virus que se utilice y modificaciones mínimas en las condiciones del ensayo pueden alterar significativamente los resultados. Adicionalmente, este ensayo sólo es efectivo para virus que sean capaces de multiplicarse, infectar una célula y posteriormente causar su muerte (8).

#### *Protocolo:*

Se realiza el sembrado de las células huésped en placas de cultivo con medio de crecimiento, y se incuban hasta alcanzar una confluencia >80% (8). El día del ensayo, se preparan diluciones seriadas del virus (en base 10), se ponen en contacto con las células blanco y se incuban para permitir la

infección de las mismas. Posteriormente, el inóculo viral se retira y es reemplazado por medio fresco que contiene carboximetilcelulosa que evita que el virus no se disperse con facilidad a lo largo de la monocapa celular (8). Las células son incubadas por 6-10 días a 37°C y finalmente las placas son reveladas gracias al uso de cristal violeta (8). Las células no infectadas se tiñen de violeta y las placas se verán claras en un fondo a contraluz (8).

Para el cálculo del título viral se hace un conteo de estas placas y se aplica la fórmula de la figura 1 (8).

$$Título\ viral\ (PFU/mL) = \frac{Número\ de\ placas\ ×\ (Dilución)}{Volumen\ (mL)}$$

**Figura 1.** Fórmula para la determinación de Título viral por plaqueo PFU/mL

#### 7.4.2. TCID 50

Este procedimiento se utiliza para como aquellos virus que no producen placas en los cultivos sino un efecto citopático (ECP) durante un periodo de 5-20 días mientras las células del cultivo permanezcan viables. Estos efectos citopáticos son todas aquellas alteraciones morfológicas que sufren las células como consecuencia de una infección viral. Dentro de los cambios que comúnmente se ven por microscopia óptica se encuentran: la pérdida de adherencia al sustrato, la agregación celular, redondeamiento celular, formación de sincitios, cuerpos de inclusión citosólicos y nucleares y cambios de superficie celular (expresión de antígeno viral) (8).

Para que estos efectos ocurran, ya que no todo virus produce ECP, deben emparejarse adecuadamente el tipo de virus y de células blanco. TCID50 es la dosis definida de dilución viral para que infecte el 50% de las células de la monocapa. Aunque comparado con el plaqueo, los errores relativos asociados son menores (10-100% vs. 35% respectivamente) se considera muy dispendioso en términos de tiempo pues se requieren aproximadamente 7 días para lograr establecer la infección en el cultivo (8).

#### 7.4.3. *Focos de inmunofluorescencia*

Es un método rápido de cuantificación para virus que no forman placas o ECP. Este ensayo no depende de la capacidad de infección del virus o de la muerte celular; sino que utiliza métodos de tinción de anticuerpos para detectar las células infectadas en tan solo 2 días. Este se aprovecha la alta especificidad de unión de los anticuerpos con sus moléculas diana (8). Su fundamento reside en la identificación de antígenos de superficie virales gracias al uso de anticuerpo específicos unidos a una sustancia fluorescentes (22). Sus resultados se expresan como unidades formadoras de focos (FFU/ml por ml. Esta técnica, aunque se considera muy rápida, específica y sensible (ej: virus de la influenza) puesto que la identificación del virus se da entre 1-2 horas, tiene una desventaja la cual es no poder confirmar la presencia de ciertas cepas virales como ocurre con los “enterovirus”. Adicionalmente, cabe la pena resaltar su alto costo por el uso de anticuerpos que no tienen una unión específica o presentan una reactividad cruzada (8).

#### 7.4.4. *PCR*

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que consta en la obtención in vitro de un gran número de copias de fragmentos de ADN a partir de la propiedad natural de la ADN polimerasa de replicación (23). Esta técnica también se utiliza para la detección de ARN viral mediante el uso de la transcriptasa inversa. Aunque es un método con una sensibilidad muy alta, hoy en día las altas tasas de mutaciones genéticas causan cambios extensos en las secuencias de ácidos nucleicos virales impidiendo el que los PRIMERS de la PCR se acoplen adecuadamente y la prueba sea obsoleta (8).

#### 7.4.5. *Western Blot*

Esta técnica detecta proteínas víricas específicas aisladas de células, tejidos órganos o fluidos corporales. Esta muestra es disuelta con detergente para luego poder someter el contenido celular a un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que permite la separación de proteínas según su tamaño. A continuación, las proteínas víricas son transferidas a un papel de

nitrocelulosa en donde se podrán visualizar los anticuerpos unidos a sus antígenos mediante el uso de moléculas fluorescentes o indicadoras como lo son la fosfatasa alcalina o peroxidasa (8,23).

Aunque esta técnica tiene un alto grado de dificultad en la interpretación de sus resultados y su costo es elevado sigue siendo muy utilizada para el diagnóstico de VIH, estudios de seroprevalencia y análisis de donante de sangre (8).

#### 7.4.6. *Inmunoprecipitación*

Esta técnica se fundamenta tanto en la interacción antígeno-anticuerpo específica, como en la unión de la proteína A/G al fragmento FC del anticuerpo. (8) La proteína A/G tiene la capacidad de formar uniones tipo beads, microesferas o perlas con agarosa (25). Esto es útil pues posterior a la unión del anticuerpo específico al antígeno en estudio (proteínas virales), las microesferas absorberán el antígeno diana permitiendo un aislamiento fácil por medio de una centrifugación de baja velocidad. Posterior a esto, se analiza la muestra por SDS-PAGE en donde se puede estudiar la cantidad y peso molecular de la proteína, su interacción o monitorizar sus modificaciones postraduccionales (8).

#### 7.4.7. *ELISA*

La técnica de ELISA combina la sensibilidad de los ensayos enzimáticos con la especificidad de la unión antígeno- anticuerpo. Su fundamento recae en que, al detectar la presencia de un antígeno específico por anticuerpos unidos a enzimas, se podrá medir de manera indirecta la concentración viral por medio de espectrofotometría gracias a la aparición de colorantes debido a la interacción de la enzima con su sustrato (8,26).

Existen dos variaciones principales de los ensayos inmunoabsorbentes: la técnica de captura de antígeno o la técnica de captura de anticuerpo. En la primera, se busca detectar la presencia de proteínas virales mediante la captura de este por un anticuerpo unido a una matriz sólida. La segunda, mide los niveles de anticuerpo específico en la muestra al unirse estos con un antígeno de captura adherido a la matriz (8).

En general, este método ha sido considerado un ensayo de alta sensibilidad por su capacidad de detectar antígeno aún con bajas cantidades de muestra (mide proteína en rango de pico o nanomolar); sin embargo, su alto costo, la imposibilidad de desarrollar anticuerpos específicos para una muestra y la posibilidad de reacciones cruzadas implican grandes limitaciones (8).

#### 7.4.8. *Hemoaglutinación*

Este método indirecto más comúnmente usado para cuantificar partículas virales presentes en sobrenadantes de cultivo celular o líquido amniótico extraído de huevo de gallinas. Esta técnica se basa en la propiedad que tienen ciertos virus de aglutinar glóbulos rojos mediante la unión de ciertas proteínas virales. Durante la prueba, se realizarán cultivos con misma cantidad de los glóbulos rojo y diluciones de stock viral en donde dará positivo si estos primeros caen al fondo de los pozos celulares formando un punto agudo (8, 27).

Aunque el principio del ensayo es simple, la preparación de muestra tiende a ser laboriosa y complicada puesto que los glóbulos rojos a utilizar deben estar estandarizados y lo más frescos posibles pues su propiedad de aglutinación disminuye con el tiempo. Adicionalmente, esta prueba no proporciona ninguna estimación de la infectividad viral pues su capacidad replicativa no es necesaria para el ensayo (8).

#### 7.4.9. *Citometría de Flujo*

Constituye una técnica avanzada, automatizada, objetiva y altamente sensible utilizada en el estudio del inmunofenotipo de células. Este estudio permite analizar múltiples parámetros de células en suspensión de manera individual (28).

Esta técnica emplea anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos que permiten analizar antígenos de superficie y citoplasmáticos, cuantificar intensidad antigénica por medio de canales de fluorescencia y detectar co-expresión de antígenos aberrantes sobre el mismo blasto. Su principio se basa en hacer pasar células o partículas en suspensión alineadas una tras otras por un haz de luz. Posteriormente la información obtenida dada por la dispersión de la luz o por la emisión de luz dada

por fluorocromos se analiza al convertir esas señales luminosas en señales digitales que con procesadas por una computadora (28, 29).

Este proceso lo realiza un citómetro de flujo básico que tiene cinco componentes principales: Una celda de flujo (a través de esta fluyen las células), Un láser, Componentes ópticos. Detectores para amplificar señales y un Sistema electrónico / informático (30).

Las desventajas que presenta es que debido a la necesidad de utilizar una suspensión de partículas (células, núcleos, cromosomas, etc) se requiere de una cierta información sobre la arquitectura de los tejidos que componen la muestra; o incluso de la misma célula (30). También se puede llegar a perder información por la interacción de las células y el medio en la que estas se encuentran (30).

Por otro lado, las ventajas de esta técnica son: la posibilidad de emplear múltiples marcadores, de analizar un elevado número de partículas en un periodo de tiempo reducido (5000 partículas/segundo), la mayor sensibilidad y objetividad que permiten detectar enfermedades residuales y caracterizar poblaciones celulares poco abundantes en condiciones normales. Adicionalmente permite almacenar la información del análisis para poder utilizarla posteriormente en cualquier momento y re-analizar los hechos con anterioridad (28,30).

## 7.5. Poblaciones celulares

### 7.5.1. Células VERO

Son células de origen epitelial obtenidas a partir de células renales de ejemplares adultos de monos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*) (31). Se caracterizan por ser hipodiploides, adherentes, no tumorigénicas si no se prolonga su pasaje que han sido empleadas para la creación de vacunas humanas y en múltiples estudios de replicación viral y ensayos de placas por su alta susceptibilidad a diferentes tipos de virus como la rubéola, los arbovirus, reovirus, varicela y los adenovirus (32, 33). El medio base para un adecuado crecimiento de esta línea celular es MEM de Eagle suplementado con suero fetal bovino a una concentración de 10%. Su nivel de bioseguridad es 1 (33).

### 7.5.2. Células BHK-29

Son células fibroblásticas obtenidas a partir de células renales de Hámster (*Mesocricetus auratus*) (34). Se caracterizan por ser pseudo diploides, transcriptasa reversa negativa, no tumorigénicas y adherentes susceptibles a adenovirus, reovirus, estomatitis vesicular, rabia y poliovirus (34,35). El medio base para un adecuado crecimiento de esta línea celular y su nivel de bioseguridad el mismo utilizado para células VERO (34).

### 7.5.3. U937-DC-SIGN

Son células de origen mieloide obtenidas de derrame pleural de humano con linfoma histiocítico. Se caracterizan por estar en suspensión y son ampliamente utilizada en estudios de dengue por la presencia de DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin) (36). Esta molécula, una lectina tipo C expresada en células dendríticas responsable por la migración de éstas a los ganglios linfoides y la activación de linfocitos T gracias a su unión con ICAM-3. Se cree que es un receptor endocítico con alta afinidad por cierto tipo de virus como VIH y adenovirus; entre otros (37,38). El medio base para su adecuado crecimiento es RPMI-1640 asociado a 2mM L- glutamina, aminoácidos no esenciales a una concentración de 0.1 mM, 2-mercaptoetanol a una concentración de 0.005 mM y suero fetal bovino al 5% (36).

## 8. Antecedentes – estado del arte

Hasta la fecha solo se ha realizado una revisión que evidencia la correlación entre la metodología de plaqueo y citometría de flujo. La revisión que se mencionó previamente “Flow Cytometry-Based Assay for Titrating Dengue Virus” publicado en el año 2005 se realizó empleando línea celular de mosquito. Las líneas celulares utilizadas en este estudio fueron: C6/36, VERO 76 (7). La línea c6/36 se mantuvo medio suplementado con suero bovino al 10%, penicilina G, estreptomicina, L-glutamina, y aminoácidos no esenciales en 25% de CO<sub>2</sub> (7). La línea VERO 76 se mantuvo en medio suplementado con Buffer y suero fetal bovino al 10%, penicilina G, estreptomicina, L-glutamina, y aminoácidos no esenciales en 5% de CO<sub>2</sub>. Los virus que se utilizaron fueron los serotipos DENV 1-

4. Posteriormente cuando se arrojaron los resultados se pudo observar que los títulos que arrojaba la citometría de flujo fueron comparables con los resultados que arrojaban métodos como la técnica de plaqueo (7). Se evidenció adicionalmente que el periodo de infección fue bastante menor en la citometría de flujo en comparación con la técnica de plaqueo. (7) Además se pudo concluir que los nuevos métodos basados en citometría de flujo facilitarían los estudios de laboratorio de dengue (7).

Hasta el momento no se ha realizado algo similar para el virus Zika, por ende, aún no se puede concluir si los resultados pudieran ser comparables o no.

## **9. Metodología**

### *9.1. Tipo de estudio*

Es un estudio experimental, analítico, prospectivo y transversal, que tiene como objetivo establecer una correlación estadística entre los títulos virales de soluciones de virus DENV 1-4 y ZIKV obtenidos por el método de plaqueo y los obtenidos por citometría de flujo en las células VERO, BHK-21 Y U937-DC-SIGN. Los datos de título viral calculados por la técnica de plaqueo fueron obtenidos en el laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque como parte de los protocolos rutinarios de la cuantificación viral. Los datos de título viral calculados por citometría de flujo serán obtenidos en el marco de este proyecto usando los recursos disponibles en el laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque.

#### *9.1.1. Población de estudio*

La población de estudio en este trabajo corresponde a las soluciones de virus DENV 1-4 y ZIKV que serán puestas en contacto con las líneas celulares VERO, BHK-21 y U937-DC-SIGN para su posterior infección. Estas muestras, tanto líneas celulares como soluciones de virus, serán obtenidas del stock disponible en el laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque.

### 9.1.2. *Hipótesis*

1. H1: Existe una correlación estadística entre los títulos virales obtenidos por el método de plaqueo y los obtenidos por citometría de flujo para los virus DENV1-4 y ZIKV.
2. H0: No existe una correlación estadística entre los títulos virales obtenidos por el método de plaqueo y los obtenidos por citometría de flujo para los virus DENV1-4 y ZIKV

### 9.2. *Técnica de plaqueo*

Los títulos virales de las soluciones de virus que serán empleadas en este proyecto ya fueron previamente calculados por el método de plaqueo en el Laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque.

### 9.3. *Cultivo celular*

U937-DC-SIGN serán cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina. Las células VERO y BHK21 serán cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina. Los cultivos celulares serán incubados en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5% y a 37°C.

### 9.4. *Virus*

Los virus DENV1-4 y ZIKV hacen parte del stock de virus del laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque.

### 9.5. *Citometría de flujo*

Para determinar las curvas de infectividad de cada virus, serán usadas las líneas celulares VERO, BHK-21 y U937-DC-SIGN. Para esto, inicialmente se harán diluciones seriadas en base 10 de las soluciones de virus DENV1-4 y ZIKV, las cuales se encuentran en el banco de virus del laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque. Estas diluciones se harán usando medio RPMI1640 en tubos de microcentrífuga a un volumen final del 200 $\mu$ L. Posteriormente, se pondrán en contacto cada

una de las diluciones virales ( $50\mu\text{l}/\text{pozo}$ ) con las células, las cuales fueron previamente cultivadas en placas de 96 pozos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pozo, por triplicado (7).

Luego, las placas serán incubadas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% por dos horas. Al término de este tiempo, el medio de cultivo con el virus será retirado y reemplazado por medio fresco suplementado con suero fetal bovino al 2% y antibiótico (penicilina 100 U/ml + estreptomicina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y la placa será nuevamente incubada por 24 horas en las mismas condiciones anteriormente descritas (7).

Pasado este tiempo, las células adherentes (VERO y BHK-21) serán desprendidas usando tripsina al 0,25% para posteriormente, junto con las U937+DC-SING (ya en suspensión) ser lavadas con Buffer PBS, fijadas y permeabilizadas usando el Kit Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience) por 20 min a  $4^\circ\text{C}$  siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1) (7).

Para la detección del virus, se adicionará el anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína E de los flavivirus (4G2, amablemente donado por el Dr. Claude Roth del Instituto Pasteur, París, Francia) acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488 a una dilución de 1/800 por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  protegido de la luz. Este anticuerpo se usará para la detección de los 4 serotipos del virus dengue y el virus Zika (7).

Luego de la incubación, las células serán lavadas 2 veces para retirar el exceso de anticuerpo con solución Perm/Wash 1X y serán resuspendidas en  $150\mu\text{L}$  de PBS. El análisis de las células infectadas marcadas con el anticuerpo será realizado usando el citómetro de flujo BD Accuri C6 presente en el laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque analizando 10,000 eventos por pozo. El porcentaje de células infectadas será definido usando el software FlowJo X (7). El título de virus será determinado empleando la fórmula descrita en la figura 2 (8) que transforma el porcentaje de células infectadas a Unidades infecciosas virales/ml. El resultado final por cada dilución de virus será el promedio obtenido de los triplicados (7).

$$\text{Título viral } \left(\frac{\text{UIV}}{\text{mL}}\right) = \frac{(\% \text{ células infectadas}) \times (\text{total \# cel en el pozo}) \times (\text{factor de dilución})}{\text{Volumen del inóculo viral}}$$

**Figura 2.** Fórmula para determinación de título viral en citometría de flujo

### 9.6. Análisis estadístico

Será realizado usando el software GraphPad versión 7.0. El cálculo del coeficiente de correlación de Spearman y su valor p de significancia se hará a partir de la comparación de los datos UFP/ml obtenidos previamente por plaqueo en el laboratorio y las UIV/ml obtenidas por citometría de flujo para cada solución viral. Las significancias estadísticas serán consideradas con valores de p menores a 0,05.

## 10. Consideraciones éticas

Este proyecto no requiere de aval ético debido a que no se usarán muestras provenientes de individuos ni se usarán animales de experimentación; por lo tanto, las disposiciones hechas en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud no aplica para este proyecto. El estudio se realizará empleando cultivos de líneas celulares obtenidas comercialmente a través de la ATCC (American Type Culture Collection); <https://www.atcc.org/>.

## 11. Resultados

### 11.1. Selección de cosechas virales

Basados en los registros del banco de virus del laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque, logramos seleccionar los inóculos virales disponibles para ser incluidos en este estudio. Para el virus Zika se seleccionó la cosecha viral plaqueada en células BHK. Para los distintos serotipos de dengue, los plaques fueron obtenidos usando células VERO. Los títulos virales son mostrados en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Título viral obtenido por Plaqueo en el laboratorio de virología de la Universidad El Bosque para DENV1-4 y ZIKV

SEROTIPO VIRAL	LINEA CÉLULAR	ID	TÍTULO VIRAL POR PLAQUEO
DENV1	VERO	7839	$1,4 \times 10^6$
DENV2		5431	$1,20 \times 10^6$
DENV3		6648	$3,00 \times 10^5$
DENV4		8489	$1,2 \times 10^6$
ZIKV	BHK	8780	$5 \times 10^5$

Estos mismos virus seleccionados posteriormente serán usados para infectar las distintas líneas celulares que serán analizadas por citometría de flujo. Los resultados de Plaqueo reportados se encuentran disponible únicamente en células VERO y BHK-29 por su característica de ser células adherentes que permiten la realización de la técnica. Las células U937-DC-SIGN, al ser células en suspensión, impiden ser analizadas por plaqueo, por lo que los resultados que esperamos obtener por citometría de flujo usando estas células serán comparados mediante una correlación estadística con los datos obtenidos.

## *11.2. Cultivo de líneas celulares*

### *11.2.1. Descongelación de las células*

Las líneas celulares utilizadas en este proyecto se encontraban congeladas en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-195.8^{\circ}\text{C}$  en tanques especializados destinados para tal propósito en el cuarto de cultivo del laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque. El proceso de descongelación consiste en extraer las células de los tanques e inmediatamente sumergirlas en un baño de agua previamente calentado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Posteriormente, a un 1ml de la solución descongelada, se le hace un lavado adicionando 9 mL del medio de cultivo específico para cada línea celular ya explicado en la metodología. Esta solución es centrifugada y el pellet celular fue resuspendido en medio de cultivo fresco y puestas en cultivo usando una botella T25 con 5ml de la suspensión celular.

Para verificar la presencia de células en el cultivo, se observan las muestras bajo microscopio de luz evidenciando las células VERO y BHK-21 adheridas al pozo, mientras que U937-DC-SIGN se encuentran suspendidas; haciendo correlación con la teoría (Anexo 2).

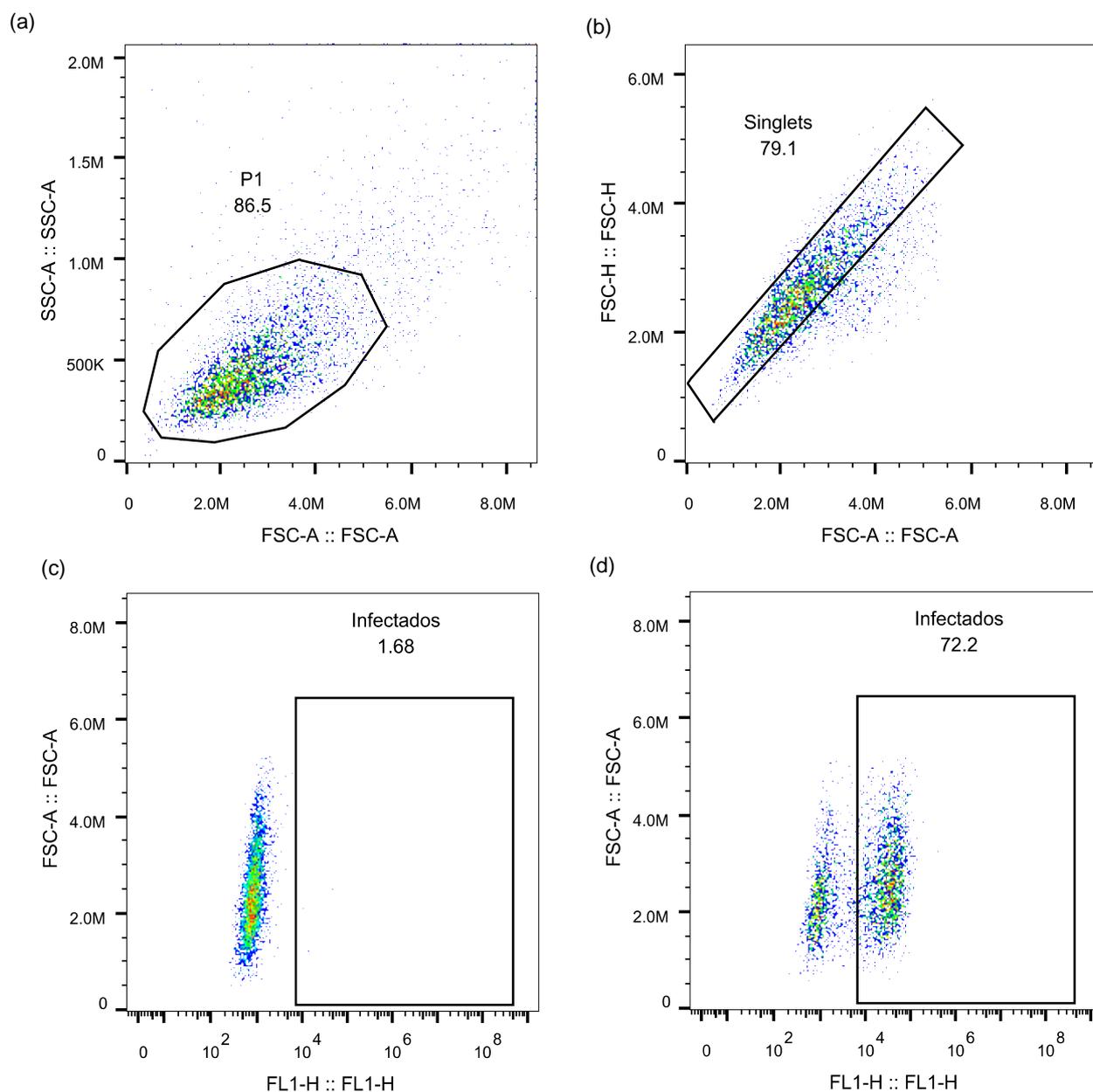
### *11.2.2. Mantenimiento del cultivo celular*

Cuando las células adherentes (VERO Y BHK-21) alcanzaron una confluencia cercana al 100%, la monocapa celular fue desprendida usando una solución de tripsina al 0, 25% y subcultivadas realizando una dilución de 1:10 en otra botella de cultivo con medio fresco.

Las líneas celulares que crecen en suspensión (U937-DC-SIGN) se verificó la densidad celular haciendo un conteo empleando cámaras de Neubauer. Cuando la densidad celular estuvo alrededor de  $1 \times 10^6$  células/mL, la línea celular fue subcultivada realizando una dilución de 1:10 (densidad celular aproximada de 100000 células/mL) y puestas en otro frasco de cultivo con medio fresco.

### 11.2.3. Infección celular y análisis por citometría de flujo

Una vez se alcanzó el número adecuado de células para hacer los experimentos, cada línea celular fue infectada con las diferentes diluciones de virus de acuerdo a lo descrito en la metodología. Las suspensiones celulares fueron analizadas por citometría de flujo empleando la estrategia de análisis mostrada en la Figura 3.



**Figura 3:** Estrategia de análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo

En primer lugar, se hizo una selección de la población celular dependiendo en la homogeneidad de sus características de tamaño celular (FSC) y complejidad interna (SSC) (Figura 3 a). Basados en esta primera selección (área definida como P1), se seleccionaron los *singlets* (células que pasan una a la vez frente al laser) definidos por tener un área (FSC-A) y una altura de señal (FSC-H) uniforme (Figura 3 b). De esta manera se descartaron del análisis los agregados celulares (2 o más células que pasan juntas frente al laser). Sobre esta población de *singlets*, se identificaron las poblaciones celulares infectadas con el virus usando el anticuerpo 4G2 acoplado a fluorocromo Alexa Fluor 488, el cual se detecta en el canal FL1 del citómetro de flujo (Figura 3 c, d).

En las siguientes tablas (Tabla 2, 3 y 4) se muestran los promedios de los porcentajes de infección de las 3 réplicas de cada dilución viral para cada línea celular con cada uno de los virus incluidos en este estudio. A cada uno de estos valores se le sustrajo el valor correspondiente al promedio de 3 réplicas de células no infectadas (Background) con el fin de obtener valores de porcentaje de infección netos.

**Tabla 2.** Porcentaje de células VERO infectadas con DENV1-4 y ZIKV

DILUCIÓN DE SOLUCIÓN VIRAL	PROCENTAJE DE CÉLULAS INFECTADAS (%)				
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	ZIKV
1/2	89,1	29,7	64,6	59,3	74,3
1/4	88,0	19,5	55,7	54,3	66,7
1/8	79,6	8,0	41,1	39,5	47,3
1/16	64,8	3,3	22,2	20,6	29,9
1/32	37,2	1,5	13,2	11,0	16,9
1/64	27,9	0,9	5,0	6,2	9,4
1/128	10,2	0,3	1,8	2,6	5,3
1/256	6,7	0,2	0,7	1,0	2,6
1/512	3,3	0,2	0,4	0,5	1,4
1/1024	1,9	0,1	0,2	0,2	0,7
1/2048	0,9	0,0	0,6	0,1	0,6

**Tabla 3.** Porcentaje de células BHK-21 infectadas con DENV1-4 y ZIKV

DILUCIÓN DE SOLUCIÓN VIRAL	PROCENTAJE DE CÉLULAS INFECTADAS (%)				
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	ZIKV
1/2	90,6	8,1	2,1	4,4	0,2
1/4	71,2	4,9	0,9	1,7	0,2
1/8	41,9	2,5	0,2	0,7	0,1
1/16	24,6	1,5	0,0	0,2	0,1
1/32	9,6	0,8	0,0	0,1	0,0
1/64	3,3	0,4	0,0	0,0	0,0
1/128	1,4	0,2	0,3	0,0	0,0
1/256	0,7	0,2	0,0	0,0	0,0
1/512	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0
1/1024	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0
1/2048	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabla 4.** Porcentaje de células U937-DC-SIGN infectadas con DENV1-4 y ZIKV

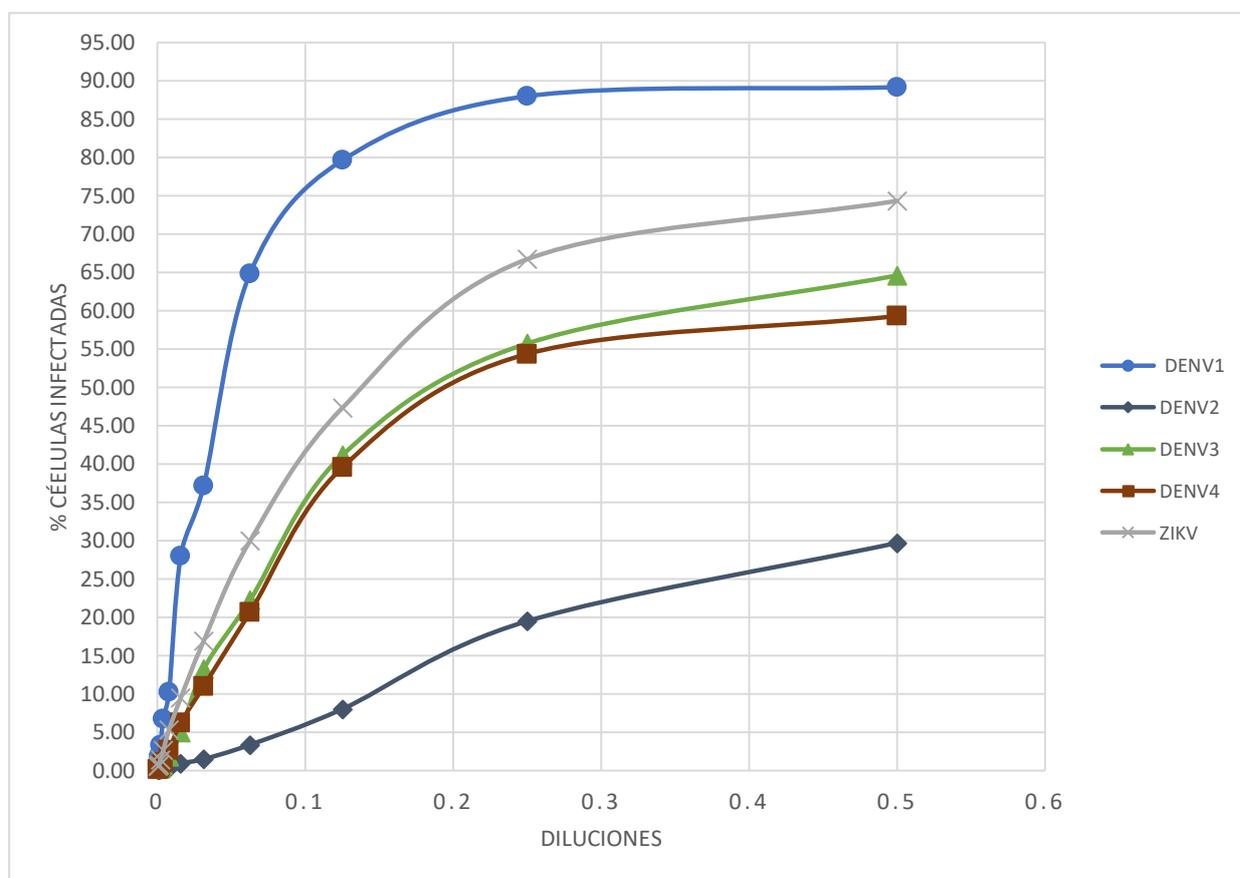
DILUCIÓN DE SOLUCIÓN VIRAL	PROCENTAJE DE CÉLULAS INFECTADAS (%)				
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	ZIKV
1/2	38,0	12,7	41,6	32,7	8,8
1/4	42,4	15,6	23,8	49,5	4,4
1/8	46,9	4,6	11,1	36,0	2,1
1/16	48,2	2,5	5,4	21,5	1,1
1/32	49,2	0,6	3,0	13,3	0,5
1/64	44,5	0,2	1,7	6,5	0,5
1/128	35,4	0,0	0,6	3,2	0,3
1/256	22,2	0,0	0,8	2,1	0,0
1/512	14,4	0,0	0,3	0,9	0,0
1/1024	7,1	0,0	0,0	0,6	0,0
1/2048	3,3	0,0	0,0	0,1	0,0

Con base en estas tablas, se puede evidenciar como la línea celular VERO, comparado con BHK-21 y U937-DC-SIGN, exhibe porcentajes de infección mas altos para todos los serotipos virales; sin embargo, el punto máximo de infección fue muy similar en VERO y BHK-21 para DENV 1.

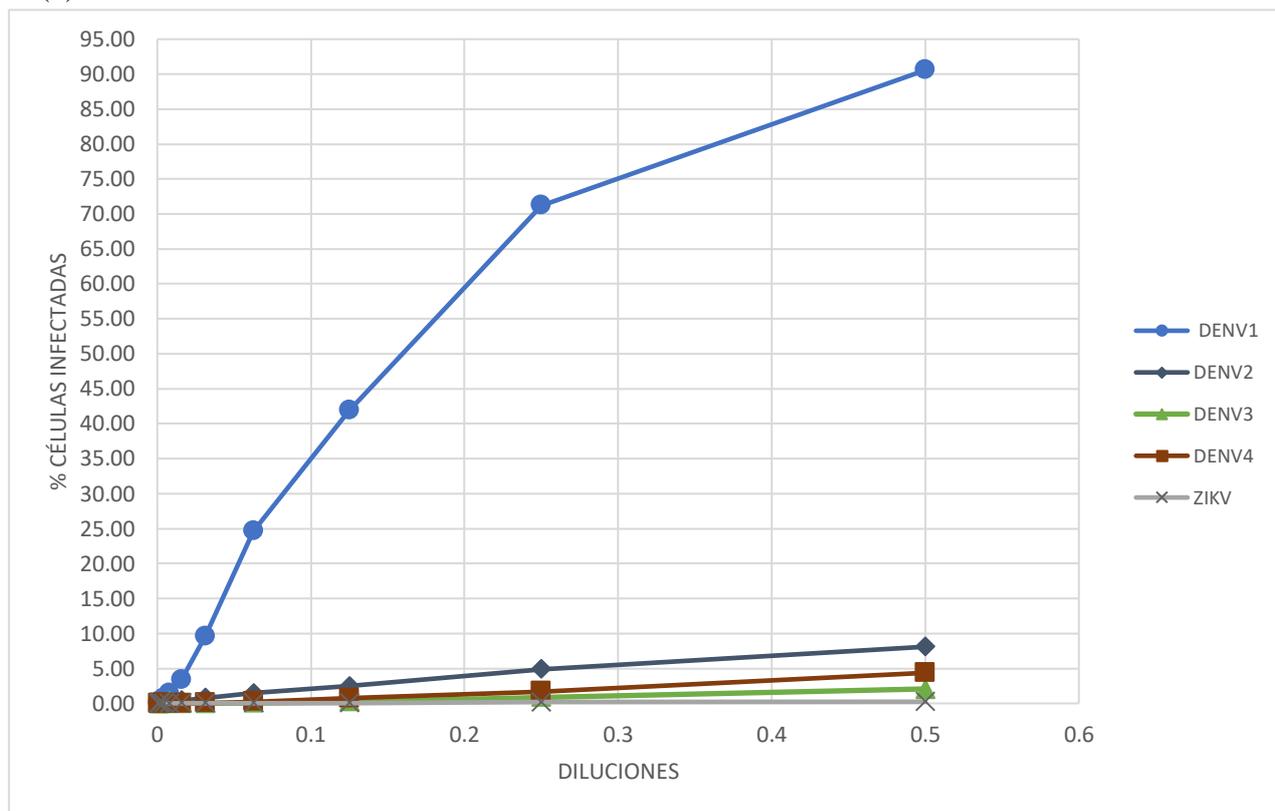
Al observar con más en detalle las curvas de infectividad mostradas en las Figura 4, las cuales fueron construidos con los porcentajes de infección de las Tablas 1, 2 y 3, se evidencia que incluso dentro de 1 mismo tipo celular cada virus posee un patrón de infección diferente. En las células VERO es posible observar una relación directamente proporcional entre las concentraciones de virus y los porcentajes de infección formando una curva asintótica hasta alcanzar una fase de meseta (*plateau*) en las diluciones más bajas.

Cuando estos mismos virus fueron utilizados para infectar las líneas celulares BHK-21 y U937-DC-SIGN se observó esta misma tendencia, pero a una escala diferente en donde BKH tuvo los porcentajes de infección más bajo a excepción de DENV1.

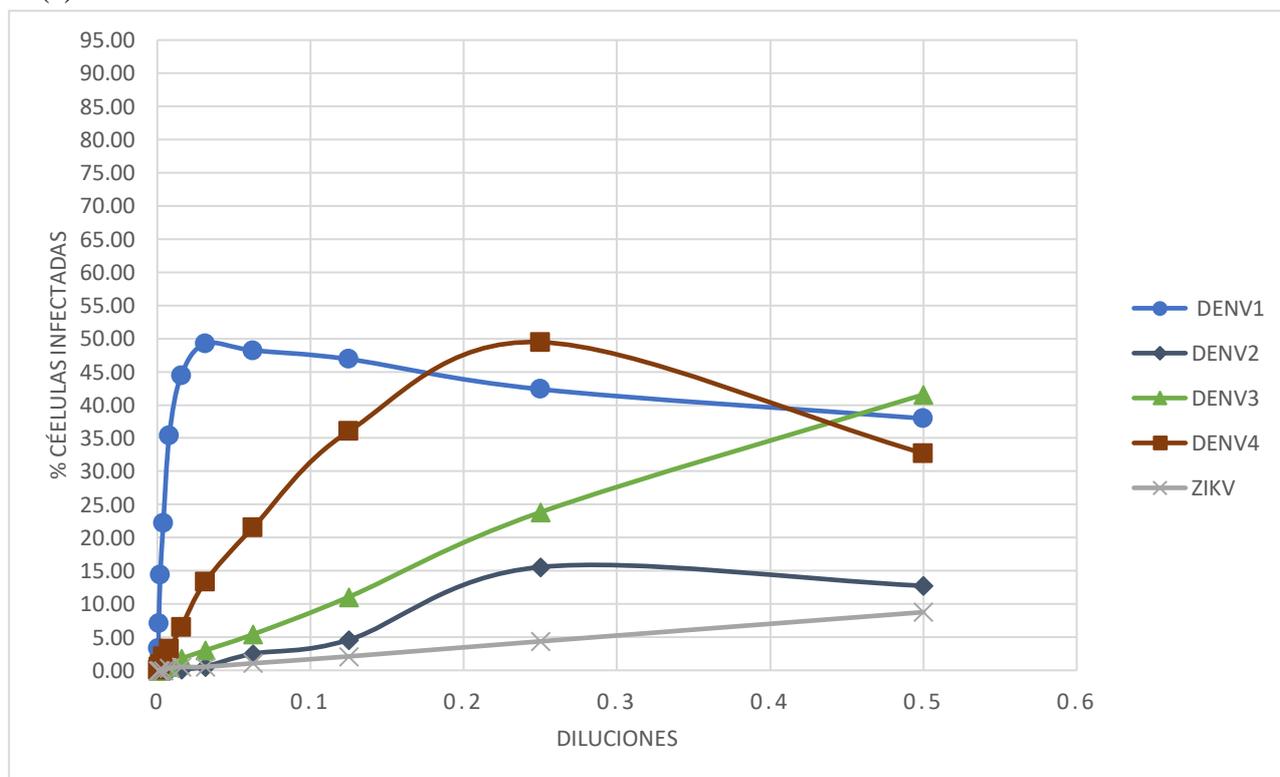
(a)



(b)

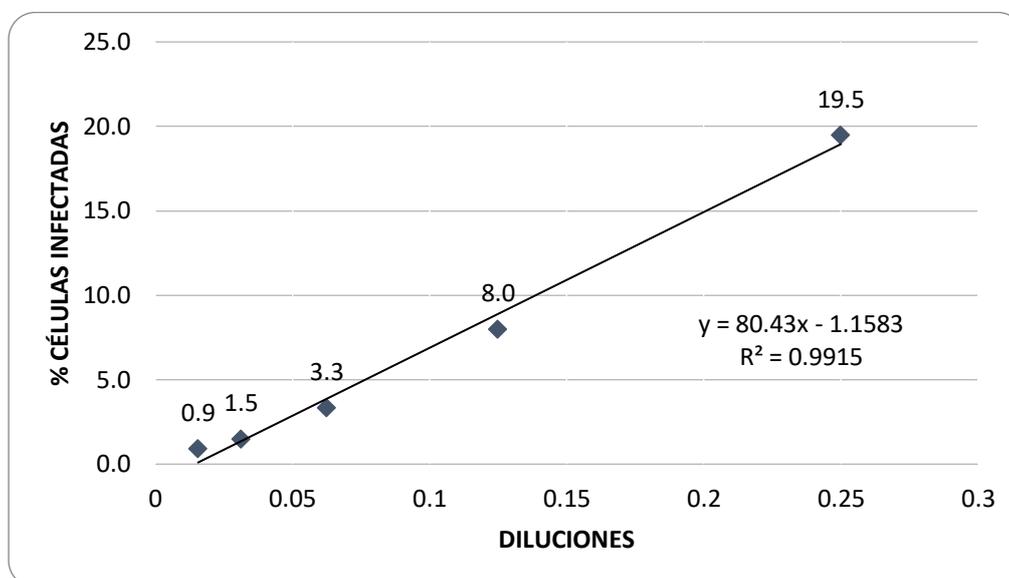


(c)



**Figura 4.** Curvas de infectividad obtenidas empleando células VERO (a), BHK-21 (b) y U937-DC-SIGN (c) con DENV 1-4 y ZIKV

Para el cálculo de los títulos virales empleando los datos de porcentaje de infección, en primer lugar, se calculó la correlación lineal para cada una de las curvas de infectividad y se seleccionaron aquellos puntos dentro de la curva donde se evidenciaba un valor de  $R^2$  cercano a 1 demostrando la proporcionalidad directa entre las dos variables



**Figura 5.** Porción lineal de la curva de infectividad de DENV2 en células VERO

Posteriormente, el valor del título viral fue calculado escogiendo el último punto de la línea recta donde aún se mantiene la proporción directa entre porcentaje de infección y la dilución de virus. Por ejemplo, para el cálculo del título viral de DENV2 en las células VERO utilizando la Figura 5, este valor corresponde a 19,5%. Este dato, es reemplazado en la fórmula de la Figura 2 obteniendo el resultado final del título viral en UIV/mL.

$$7,8 \times 10^5 \left( \frac{UIV}{mL} \right) = \frac{(19,5\%) \times (50,000) \times (4)}{0,05}$$

**Figura 6.** Ejemplo título viral DENV2 en células VERO (UIV/mL)

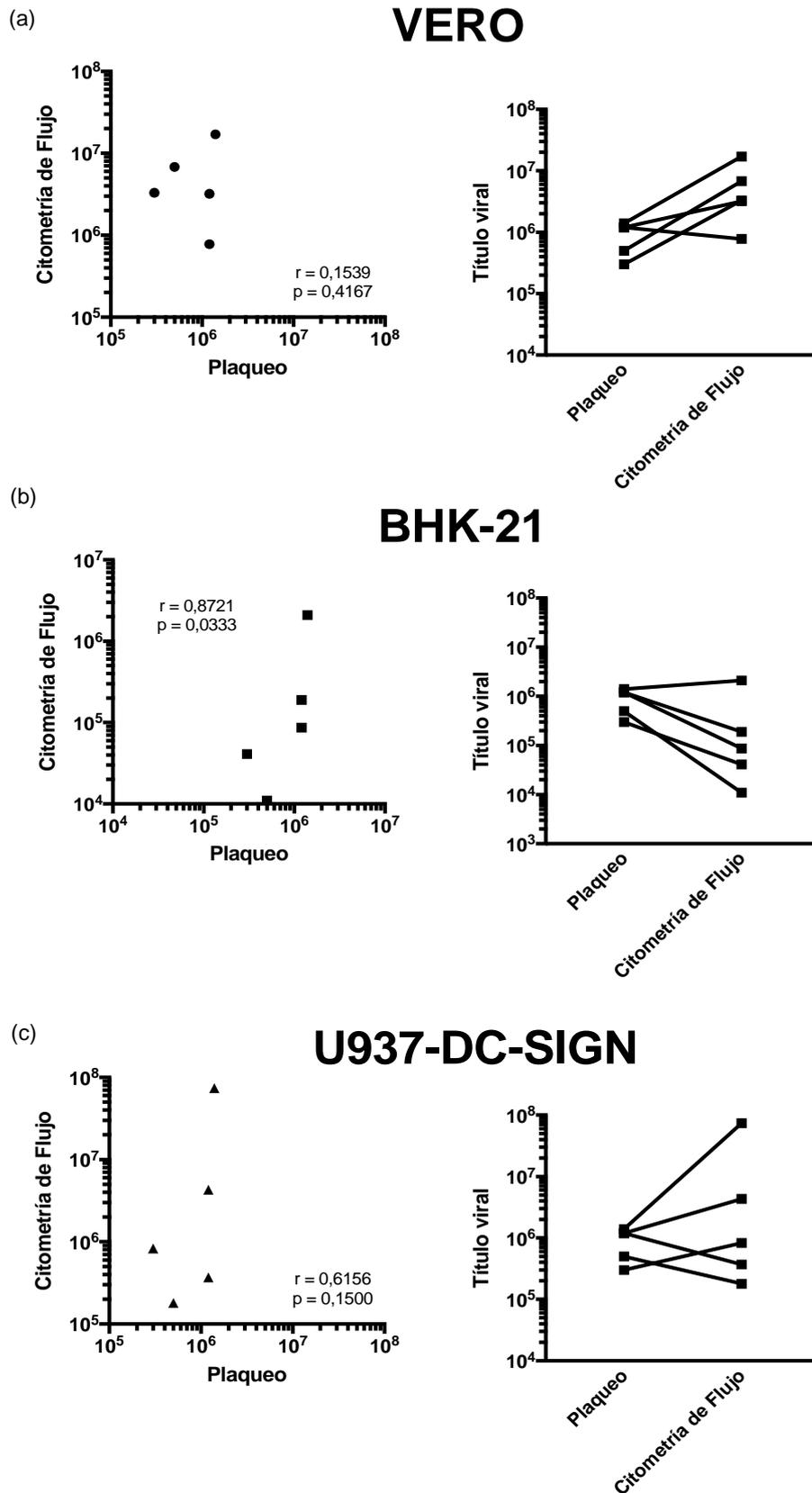
Aplicando esta misma metodología fueron calculados todos los títulos virales en cada línea celular (Tabla 5).

**Tabla 5.** *Títulos virales obtenidos por Citometría de Flujo para DENV1-2 y ZIKV en células VERO, BHK-21 y U937-DC-SIGN*

SEROTIPO VIRAL	LINEA CELULAR	TÍTULO VIRAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO
DENV1	VERO	$1,70 \times 10^7$
	BKH-21	$2,10 \times 10^6$
	U937-DC-SIGN	$7,40 \times 10^7$
DENV2	VERO	$7,80 \times 10^5$
	BKH-21	$1,90 \times 10^5$
	U937-DC-SIGN	$3,70 \times 10^5$
DENV3	VERO	$3,30 \times 10^6$
	BKH-21	$4,10 \times 10^4$
	U937-DC-SIGN	$8,30 \times 10^5$
DENV4	VERO	$3,20 \times 10^6$
	BKH-21	$8,70 \times 10^4$
	U937-DC-SIGN	$4,30 \times 10^6$
ZIKV	VERO	$6,80 \times 10^6$
	BKH-21	$1,10 \times 10^4$
	U937-DC-SIGN	$1,80 \times 10^5$

### 11.3. Análisis de correlación

Una vez se han obtenido todos los datos de títulos virales por las dos técnicas planteadas, se realizó el análisis de correlación empleando el software GraphPad versión 7.0. y los resultados son mostrados en la Figura 7. Inicialmente se graficaron los resultados de títulos virales obtenidos por plaqueo y citometría de flujo construyendo graficas de dispersión para posteriormente calcular los valores de coeficiente de correlación de Spearman (r) y la significancia estadística (p) (Figura 7, paneles izquierdos). Adicionalmente, los títulos virales fueron comparados para verificar si existían diferencias significativas entre los valores obtenidos con un método u otro (Figura 7, paneles derechos).



**Figura 7.** Correlación estadística de los títulos virales obtenidos por Plaqueo Vs. Citometría de flujo

Como se muestra en la Figura 7, los valores de títulos virales obtenidos utilizando las líneas celulares VERO y U937-DC-SIGN, no mostraron ninguna correlación estadísticamente significativa entre las dos técnicas usadas para su cálculo (Figura 7 a, c, paneles derechos). En contraste, se puede observar que utilizando la línea celular BHK-21 si se obtuvo dicha correlación ( $r = 0,8$  y  $p < 0,05$ ).

Al comparar los títulos virales obtenidos por las diferentes técnicas, se observó que en ningún caso hubo una diferencia estadísticamente significativa; sin embargo, se evidencia una tendencia a obtener valores mas altos utilizando la línea celular VERO (Figura 7 a, panel derecho) y valores mas bajos utilizando la línea celular BKH-21 (figura 7 b, panel derecho) con la técnica de citometría de flujo. Con respecto a la línea celular U937-DC-SIGN, la tendencia es a que los valores sean muy similares entre ambas técnicas, exceptuando DENV1 (Figura 7 c, panel derecho).

## 12. Discusión

El cálculo del título viral de una suspensión de virus es usado actualmente para una amplia gama de estudios en la investigación básica en virología, siendo el método Gold Estándar la técnica de plaqueo. Sin embargo, con las nuevas tecnologías que día a día van surgiendo, la citometría de flujo ha tomado más fuerza para la realización de dichas investigaciones por ser una técnica práctica que requiere menos tiempo y experticia por parte del investigador. El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis entre los valores de carga viral cuantificado por el método de plaqueo y de citometría de flujo para determinar si existe una correlación estadística que nos permita proponer a la citometría de flujo como un método alternativo confiable.

Los resultados obtenidos muestran, en primer lugar, que la línea celular U937-DC-SIGN, por ser no adherente, tiene mayores facilidades para su manipulación durante el protocolo establecido para la técnica de citometría de flujo en comparación con las otras dos líneas celulares (VERO y BHK-

21). Esta característica ofrece ventajas en términos de ahorro de tiempo y costos ya que no se requieren reactivos adicionales para desprenderlas del fondo de la botella del cultivo.

En segundo lugar, observamos que existieron importantes diferencias en las curvas de infectividad entre las líneas celulares empleadas. Como se describió previamente en los resultados, las curvas de infectividad obtenidas con la línea celular VERO muestran un patrón similar a lo descrito en la literatura con los porcentajes de infectividad más altos (39).

En contraste, basándonos en la teoría, se esperaban mayores valores de porcentajes de infección en la línea celular U937-DC-SIGN debido a que la expresión de la molécula DC-SIGN que ha sido reconocida como un receptor importante para la entrada de los flavivirus a la célula blanco facilitando la infección viral (40). Esto podría deberse a que, al ser una célula transformada para la expresión temporal de este receptor, existe una tendencia a su pérdida en la medida que las células proliferan o son subcultivadas en el laboratorio. Para verificar esto, sería necesario cuantificar la expresión de DC-SIGN en el cultivo de células utilizadas.

Por otro lado, cuando se infectó la línea celular BHK-21 se observaron los porcentajes de infección más bajos en comparación con las otras líneas celulares (Figura 4). Esto se puede deber a que este tipo de células requiere mayor tiempo de exposición al inóculo viral para obtener porcentajes infección más altos (41). Usualmente, cuando se usan para los ensayos de plaqueo, los virus y las células están en contacto por mínimo 5 días facilitando la replicación viral y un posterior aumento en el número de células infectadas (42); sin embargo, al realizarse una incubación de solamente 24 horas según lo establecido por el protocolo empleado para la cuantificación viral por citometría de flujo (42), se podría considerar que este tiempo fue insuficiente para que los virus pudieran replicarse de una manera efectiva en estas células.

Respecto al cálculo del título viral empleando la fórmula descrita en la metodología (Figura 2), elegimos considerar la información del último punto de la línea recta donde aún se mantiene la proporción directa entre el porcentaje de infección y la dilución de virus debido a que en la técnica de plaqueo se aplica un criterio muy similar. Este consiste en utilizar el dato de “número de placas” observadas en la dilución más alta en la que se observa un conteo entre 30-35 cuando se utilizan platos de 6 pozo (42). Adicionalmente, el valor obtenido bajo este criterio fue muy similar al promedio de los títulos virales obtenidos que se encontraban en la porción recta de la curva de infectividad; por lo que, para efectos prácticos, se propuso el empleo de una sola dilución viral para determinar el título viral con la ecuación descrita en la Figura 2.

En tercer lugar, se esperaba encontrar una correlación estadísticamente significativa con los datos obtenidos en la línea celular VERO ya que el único protocolo publicado para la cuantificación de título viral por citometría de flujo emplea dichas células y la plantea como la línea celular de elección (42); además de ser la línea con mejores curvas de infectividad de todo el estudio (Figura 4 a). No obstante, encontramos que la línea celular BHK-21 fue la única que mostró una correlación estadísticamente significativa a pesar de que en ésta se observaron los porcentajes de infección más bajos (Figura 4 b; Figura 7 a, b, panel izquierdo).

Este hallazgo, resulta bastante importante si consideramos que no existe ningún estudio formalmente publicado que soporte el uso de otras líneas celulares distintas a VERO. Nuestro estudio podría ser el primero que se acerca a establecer esta correlación y podría soportar el uso de las células BHK para la cuantificación de títulos virales de flavivirus por citometría de flujo; sin embargo, para establecer y sustentar adecuadamente este planteamiento es necesario ampliar el número de cepas virales por cada serotipo de tal manera que nos permita tener tamaños de muestras más grandes y, por lo tanto, mayor confiabilidad

En este sentido, este aumento de cepas virales podría también ayudar a esclarecer si realmente existe o no una correlación estadísticamente significativa cuando se utiliza la línea celular U937-DC-SIGN. Esto debido a que al comparar los títulos virales obtenidos por la técnica de citometría de flujo con los obtenidos por plaqueo, los datos no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 7 c, panel derecho), sugiriendo la posibilidad de la existencia de una correlación.

Adicionalmente, es importante mencionar que, a diferencia del protocolo previamente publicado para cuantificar títulos virales de *flavivirus* por citometría de flujo, el protocolo que se siguió en este trabajo utilizó el anticuerpo 4G2 en lugar del 2H2 (bibliografía). Por esta razón, sería recomendable comparar los resultados obtenidos con cada anticuerpo para determinar y establecer la posible existencia de correlaciones estadísticas con todas las líneas celulares.

### **13. Conclusiones**

Al determinar los índices de correlación de los datos obtenidos para cada una de las líneas celulares infectadas con DENV1-4 y ZIKV por citometría de flujo en comparación a los registrados previamente por plaqueo, se pudo establecer la existencia de una correlación estadísticamente significativa cuando se utiliza la línea celular BHK-21.

Asimismo, se consiguió establecer un protocolo estandarizado de cuantificación viral por citometría de flujo en el laboratorio de Virología, utilizando tanto células en suspensión como células adherentes para los virus DENV1-4 y ZIKV.

### **14. Recomendaciones**

Se propone ampliar el número de cepas virales de cada serotipo para obtener un tamaño de muestra más grande y resultados más robustos. Esto con el fin de proponer a BHK como opción de

línea celular para la cuantificación de títulos virales de flavivirus y determinar la existencia o no de correlación estadística en U937-DC-SIGN y VERO.

Por otro lado, se considera extender el tiempo de infección fijado en el protocolo de cuantificación viral por citometría de flujo de 24 horas a 48-72 horas para ampliar el tiempo de replicación efectiva del virus en las diferentes líneas celulares y así mejorar los porcentajes de infectividad, especialmente en la línea celular BHK-21. Adicionalmente, se considera comparar los resultados obtenidos utilizando el anticuerpo 2H2 empleado en el protocolo publicado y determinar si permite una mejor detección de células infectadas cuando la muestra es analizada en el citómetro.

## 15. Bibliografía

1. [Internet]. Minsalud.gov.co. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/lineamientos-atencion-clinica-integral-paciente-zika-colombia.pdf>
2. [Internet]. Minsalud.gov.co. 2018 [cited 22 May 2018]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Gu%C3%ADa%20para%20la%20atenci%C3%B3n%20cl%C3%ADnica%20integral%20del%20paciente%20con%20dengue.pdf>
3. Articles M. Journal of Infection and Public Health [Internet]. Journals.elsevier.com. 2018 [cited 22 May 2018]. Available from: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-infection-and-public-health/most-cited-articles/>
4. Tavernise S, Jr. D. Zika Virus a Global Health Emergency, W.H.O. Says [Internet]. Nytimes.com. 2018 [cited 22 May 2018]. Available from: <https://www.nytimes.com/2016/02/02/health/zika-virus-world-health-organization.html>
5. [Internet]. Scielo.sld.cu. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v10n1/vac03101.pdf>
6. Virus Counter 3100 - ViroCyt [Internet]. ViroCyt. 2018 [cited 24 May 2018]. Available from: <http://virocyt.com/virus-counter/>
7. Lambeth C, White L, Johnston R, de Silva A. Flow Cytometry-Based Assay for Titrating Dengue Virus. 2018.
8. Pankaj K. Methods for Rapid Virus Identification and Quantification [Internet]. Labome.com. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <https://www.labome.com/method/Methods-for-Rapid-Virus-Identification-and-Quantification.html>
9. Ministerio de salud y protección social y Federación Médica Colombiana. Dengue memorias [Internet]. Bogotá D.C: Iladiba; 2012-2013 [revisado 2007-2008; citado 2018 marzo 25]. Disponible: [https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/Memorias\\_dengue.pdf](https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/Memorias_dengue.pdf)

10. Velandia M, Castellanos Parra J. Virus del dengue. Medellín: Asociación Colombiana de Infectología; 2011.
11. Biblioteca Juan R3oa Vásquez - Universidad El Bosque [Internet]. Www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: [https://www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co/contents/dengue-virus-infection-clinical-manifestations-and-diagnosis?search=dengue&source=search\\_result&selectedTitle=1~88&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co/contents/dengue-virus-infection-clinical-manifestations-and-diagnosis?search=dengue&source=search_result&selectedTitle=1~88&usage_type=default&display_rank=1) (marco teorico)
12. Biblioteca Juan Roa Vásquez - Universidad El Bosque [Internet]. Www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: [https://www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co/contents/zika-virus-infection-an-overview?search=ZIKA&source=search\\_result&selectedTitle=1~90&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co/contents/zika-virus-infection-an-overview?search=ZIKA&source=search_result&selectedTitle=1~90&usage_type=default&display_rank=1)
13. [Internet]. Bing.com. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: [http://www.bing.com/cr?IG=3CFC4D19982F4220811CD1D9BD043894&CID=0FDDA7000E0F6D471D02ACFA0FB86C54&rd=1&h=2Rs\\_Ke6YbF0hdRkR6\\_Pbz9Yxhm44Pd-G007N2O\\_Fg7g&v=1&r=http%3a%2f%2frevistas.unicordoba.edu.co%2findex.php%2frevistamvz%2farticle%2fdownload%2f1069%2fpdf&p=DevEx.LB.1,5314.1](http://www.bing.com/cr?IG=3CFC4D19982F4220811CD1D9BD043894&CID=0FDDA7000E0F6D471D02ACFA0FB86C54&rd=1&h=2Rs_Ke6YbF0hdRkR6_Pbz9Yxhm44Pd-G007N2O_Fg7g&v=1&r=http%3a%2f%2frevistas.unicordoba.edu.co%2findex.php%2frevistamvz%2farticle%2fdownload%2f1069%2fpdf&p=DevEx.LB.1,5314.1)
14. Biblioteca Juan Roa Vásquez - Universidad El Bosque [Internet]. Www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: [https://www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co/contents/dengue-virus-infection-epidemiology?search=dengue%20history&source=search\\_result&selectedTitle=3~150&usage\\_type=default&display\\_rank=3](https://www-uptodate-com.ezproxy.unbosque.edu.co/contents/dengue-virus-infection-epidemiology?search=dengue%20history&source=search_result&selectedTitle=3~150&usage_type=default&display_rank=3)
15. Articles M. Journal of Infection and Public Health [Internet]. Journals.elsevier.com. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-infection-and-public-health/most-cited-articles/>

16. [Internet]. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: [https://www.bing.com/cr?IG=39D8D18CCA8549B5AECC2DC77DC4571B&CID=219DCC55F1666F413CDEC7AFF09B6E0B&rd=1&h=h8XA\\_P951C2\\_SfRCY9wwr1KnC8MMbkhZF39jrYxyyT\\_o&v=1&r=https%3a%2f%2fwww.researchgate.net%2fprofile%2fAlfonso\\_Rodriguez-Morales&p=DevEx.LB.1,5076.1](https://www.bing.com/cr?IG=39D8D18CCA8549B5AECC2DC77DC4571B&CID=219DCC55F1666F413CDEC7AFF09B6E0B&rd=1&h=h8XA_P951C2_SfRCY9wwr1KnC8MMbkhZF39jrYxyyT_o&v=1&r=https%3a%2f%2fwww.researchgate.net%2fprofile%2fAlfonso_Rodriguez-Morales&p=DevEx.LB.1,5076.1)
17. Castrillón J, Castaño J, Urcuqui S. Dengue en Colombia: diez años de evolución. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2015 Abr [citado 2018 Abr 13]; 32 (2): 142-149. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182015000300002&lng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182015000300002&lng=es)
18. [Internet]. Scp.com.co. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <https://scp.com.co/wp-content/uploads/2016/04/6.-Infecci%C3%B3n-Zika.pdf>
19. [Internet]. Scielo.sld.cu. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/gin/v42n3/gin15316.pdf>
20. [Internet]. Scielo.org.co. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v37s1/0120-4157-bio-37-s1-00121.pdf>
21. Baer A, Kehn-Hall K. Journal of Visualized Experiments [Internet]. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4255882/pdf/jove-93-52065.pdf>
22. [Internet]. Scielo.org.co. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v26n2/v26n2a05.pdf>
23. [Internet]. Medigraphic.com. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
24. [Internet]. Uaz.edu.mx. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://www.uaz.edu.mx/histo/Biologia/Wiki/WesternBlot.pdf>
25. [Internet]. Revistareduca.es. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://revistareduca.es/index.php/reduca/article/viewFile/721/883>

26. [Internet]. Wiener-lab.com.ar. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: [http://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/hbsag\\_elisa\\_sp.pdf](http://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/hbsag_elisa_sp.pdf)
27. [Internet]. Medigraphic.com. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gms043p.pdf>
28. [Internet]. Scielo.sld.cu. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v31n3/hih03315.pdf>
29. Lourdes María Barrera Ramírez, Ma. Elisa Drago Serrano, Julia Pérez Ramos, Ana Cecilia Zamora, Fabiola Gómez Arroyo, Teresita Del Rosario Sainz Espuñes, Felipe Mendoza Pérez. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica [Internet]. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2004/in041g.pdf>
30. Resino S. Citometría de Flujo | EMEI [Internet]. EMEI. 2018 [cited 25 May 2018]. Available from: <http://epidemiologiamolecular.com/citometria-flujo/>
31. Digital.bl.fcen.uba.ar. 2018 [cited 19 September 2018]. Available from: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3252\\_Gorostiaga.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n3252_Gorostiaga.pdf)
32. Osada N, Kohara A, Yamaji T, Hirayama N, Kasai F, Sekizuka T et al. The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. 2018.
33. Vero ATCC ® CCL-81™ Cercopithecus aethiops kidney normal [Internet]. Atcc.org. 2018 [cited 19 September 2018]. Available from: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx>
34. BHK-21 [C-13] ATCC ® CCL-10™ Mesocricetus auratus kidney nor [Internet]. Atcc.org. 2018 [cited 19 September 2018]. Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-10.aspx#generalinformation>
35. Scielo.sld.cu. 2018 [cited 19 September 2018]. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v9n2/vac052000.pdf>

36. U937-DC-SIGN ATCC ® CRL-3253™ Homo sapiens pleural effusion [Internet]. Atcc.org. 2018 [cited 19 September 2018]. Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-3253.aspx#culturemethod>
37. EJ S. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 19 September 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12653690>
38. Engering A e. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 19 September 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859097>

## 16. Anexos

### Anexo 1.

BD Cytotfix/Cytoperm™

## Technical Data Sheet

## Fixation and Permeabilization Solution

### Product Information

Material Number: 554722  
Size: 125 ml

### Description

BD Cytotfix/Cytoperm™ solution can be used for the simultaneous fixation and permeabilization of cells prior to intracellular cytokine staining.

### Preparation and Storage

Store undiluted at 4° C.  
Cytotfix/Cytoperm solution is supplied as a 1X solution.

### Application Notes

#### Recommended Assay Procedure:

**Stimulation of Cells:** Various in vitro methods have been reported for stimulating cells to produce cytokines. Polyclonal activators have been particularly useful for inducing cytokine-producing cells. These activators include the following: concanavalin A, lipopolysaccharide, phorbol esters plus calcium ionophore or ionomycin, phytohaemagglutinin, staphylococcus enterotoxin B, and monoclonal antibodies directed against subunits of the TCR/CD3 complex (with or without antibodies directed against costimulatory receptors, such as CD28).

**Procedure for Using Cytotfix/Cytoperm:** For specific methodology, please visit our web site, [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com), and go to the protocols section or the chapter on intracellular staining in the Immune Function Handbook.

#### 1. Fix and Permeabilize Cells

a. Thoroughly resuspend cells in 100 µl of BD Cytotfix/Cytoperm solution per well for microwell plates (or 250 µl for tubes) and incubate for 20 min. at 4°C.

**NOTE 1:** Cell aggregation can be avoided by vortexing prior to the addition of the BD Cytotfix/Cytoperm solution.

b. Wash cells two times in a buffer that contains a cell permeabilizing agent such as saponin (BD Perm/Wash™ buffer, Cat. 554723, which can be used as the wash buffer and as the antibody diluent).

#### 2. Stain for Intracellular Cytokines

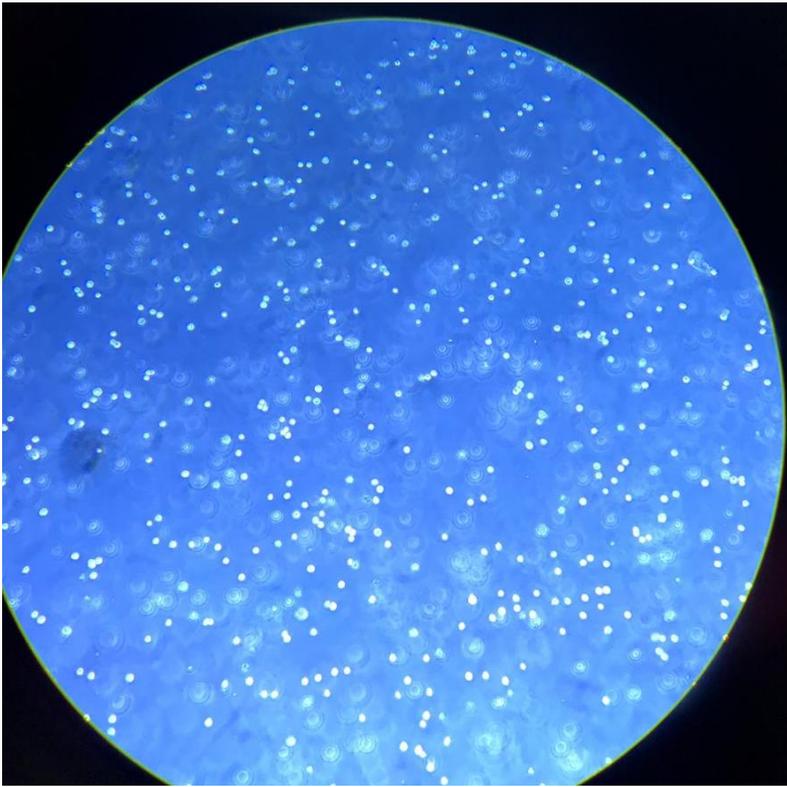
a. Thoroughly resuspend fixed/permeabilized cells in 50 µl of a saponin-containing buffer (e.g., BD Perm/Wash buffer) containing a pre-determined optimal concentration of a fluorochrome-conjugated anti-cytokine antibody or appropriate negative control. Incubate at 4°C for 30 minutes in the dark.

**NOTE 2:** Because saponin-mediated cell permeabilization is a reversible process, it is important to keep the cells in the presence of saponin during intracellular cytokine staining.

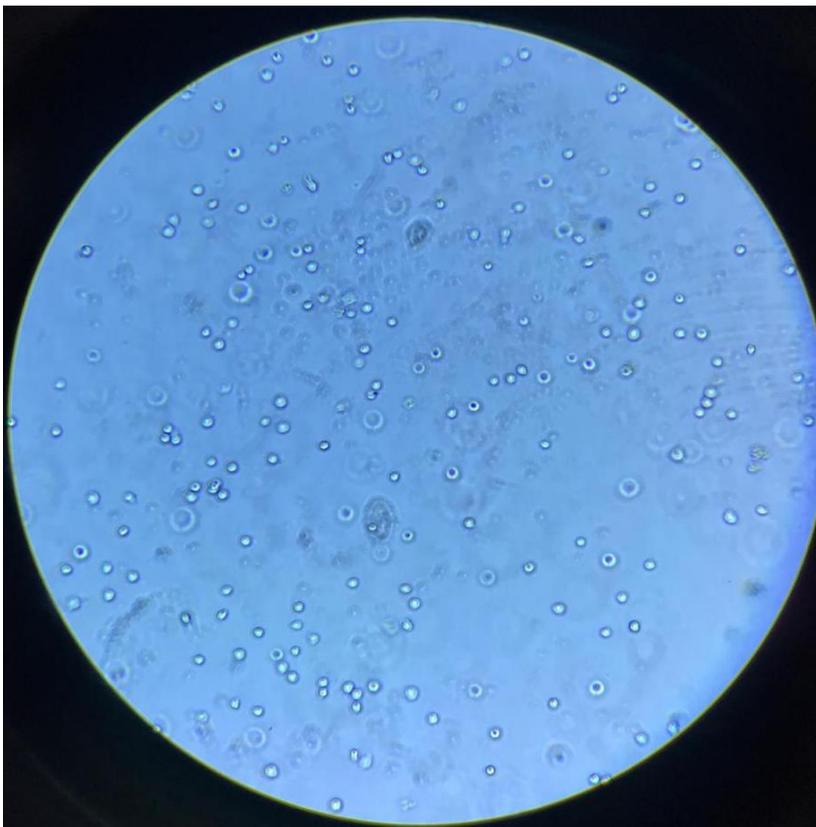
b. Wash cells 2 times with saponin-containing buffer (or BD Perm/Wash buffer) and resuspend in staining buffer prior to flow cytometric analysis.

**NOTE 3:** Both the BD Cytotfix/Cytoperm™ (Cat. No. 554722) and BD Perm/Wash buffer (Cat. No. 554723) are included in the Fixation/Permeabilization Solution Kit (Cat. No. 554714) as well as the Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiStop (containing monensin); Cat. No. 554715) and Fixation/Permeabilization Solution Kit with GolgiPlug (containing brefeldin A); Cat. No. 555028).

**Anexo 2.** *Visualizan en microscopio de Células adherentes (a) y en suspensión (b)*



(a)



(b)