

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y SU ALTERACIÓN CAUSADA
POR EL VIRUS DENGUE**

MARÍA ANGÉLICA CALDERÓN PELÁEZ

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ, COLOMBIA
2013**

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y SU ALTERACIÓN CAUSADA
POR EL VIRUS DENGUE**

MARÍA ANGÉLICA CALDERÓN PELÁEZ

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS:

DIRECTORA

MYRIAM LUCÍA VELANDIA ROMERO. MSc. PhD.

CODIRECTOR

JAIME E. CASTELLANOS PARRA. MSc. PhD.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

VIROLOGÍA, UNIVERSIDAD EL BOSQUE

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

FACULTAD DE CIENCIAS

BOGOTÁ, COLOMBIA

2013

AGRADECIMIENTOS

Muchas veces a lo largo de un mismo día, me doy cuenta que mi propia vida y sus logros se han construido gracias al trabajo de las personas que me rodean. También comprendo, con cuanta seriedad debo esforzarme para darles, en correspondencia, tanto como he recibido.

-Albert Einstein.-

En primer lugar quiero agradecer a Dios por todas sus bendiciones y permitirme terminar una etapa más de mi vida académica y a mis padres por ser el apoyo incondicional en todos y cada uno de mis propósitos, sin su apoyo y confianza habría sido imposible lograr cualquier cosa en mi vida, por eso todos mis triunfos son tan míos, como suyos.

A mi sensei, la Dra. Myriam Velandia, por aceptar ser mi guía, por su eterna confianza, por su paciencia y su dedicación a este trabajo, sin la cual nada habría sido posible. Igualmente debo agradecer al Dr. Jaime Castellanos por su colaboración, asesoría y sus sabios consejos en mi proceso de formación.

Quiero agradecer de forma especial a la Dra. Jacqueline Chaparro, porque sin importar la hora o que tantas ocupaciones tuviera, siempre se tomó el tiempo de enseñarme, asesorarme y escucharme. ¡Mil gracias por su apoyo y dedicación!

A la Dra. Eliana Calvo por su asesoría en las técnicas moleculares utilizadas en este proyecto y a todos mis compañeros del laboratorio de Virología, Nadia, Giovanni, Leidy, Sigrid, Viviana, Lilia, Rosalia y Carolina, por sus palabras de aliento y su oportuna colaboración en los momentos necesarios.

A Colciencias y el programa jóvenes investigadores, por ser parte esencial en el desarrollo de este proyecto.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer el infinito apoyo de mis grandes amigas Liliana, Zayda, Claudia y Lineth, porque la amistad duplica las alegrías y divide las tristezas, gracias por no juzgar, gracias por escuchar sin opinar, gracias por sus palabras de ánimo, gracias por los jalones de orejas cuando fueron necesarios, gracias por estar ahí sin importar si era de día o de noche y mil gracias por existir en mi vida.

A todos ellos y a quienes hicieron parte de este proceso y que en algún momento aportaron en mi formación académica, o personal, gracias totales.

RESUMEN

El sistema nervioso (SN), está protegido por una barrera de difusión celular conocida como Barrera Hematoencefálica (BHE), compuesta por diferentes tipos de células que limitan el paso de moléculas desde los capilares hacia el parénquima cerebral, lo cual garantiza la homeostasis del tejido. A pesar de esto, algunas moléculas y agentes infecciosos logran atravesar la BHE e ingresar al tejido nervioso para inducir graves daños en la fisiología de este. Dentro de los patógenos que logran alterar la BHE e infectar el tejido nervioso, se encuentran algunos miembros de la familia *flaviviridae* típicamente neurotrópicos, sin embargo el virus del dengue (DENV), un virus considerado no neurotrópico, puede infectar y alterar la fisiología del tejido nervioso ocasionando signos como encefalitis, parálisis y alteraciones motoras y cognitivas que pueden ser permanentes.

Para comprender los cambios de tropismo y los factores neurológicos e inmunológicos asociados a la neuroinfección por DENV, en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo de neuroinfección en ratones lactantes utilizando una cepa de virus neuroadaptado (D4MB-6), que infecta neuronas y otras células del tejido nervioso e induce la alteración de la BHE en ratones lactantes. Por lo tanto, el presente proyecto buscó evaluar en un modelo de BHE *in vitro*, si la alteración de la permeabilidad de la barrera endotelial cerebrovascular asociada a la infección con el DENV-4 neuroadaptado o no, favorece el paso de virus libre o asociado a células del sistema inmune lo cual, permitiría la infección y dispersión viral en el tejido nervioso.

Para esto, se estableció un modelo de BHE *in vitro* en monocapa o co-cultivo utilizando cultivos primarios de endotelio cerebrovascular con o sin astrocitos obtenidos a partir de cerebros de ratones lactantes, siendo únicamente las células endoteliales susceptibles a la infección con el virus parental o D4MB-6. Los resultados obtenidos mostraron en ambos modelos de BHE que a las 10 horas post-infección (hpi) con cada virus, hubo una disminución en los valores de resistencia transendotelial (TEER), asociada a un aumento en la permeabilidad. Adicionalmente en este mismo tiempo post infección se detectaron partículas virales infecciosas en la cámara inferior de los insertos, lo que sugiere que la infección ocasionó una alteración en la integridad de las células endoteliales, lo que permitió el paso paracelular de las partículas virales.

Se encontró que la infección con el D4MB-6 indujo la relocalización -sin afectar la expresión-, de la proteína ZO-1 y un aumento en la expresión de los transcritos para las proteínas VCAM, PECAM, TNF α y MCP-1 comparado con lo observado durante la infección con el virus parental. Esto último está relacionado con un proceso de activación endotelial que al parecer favoreció el proceso de trans migración de monocitos/macrófagos J774 en ambos modelos de BHE estandarizados. Lo anterior convierte el proceso de alteración de la BHE en uno de los posibles mecanismos utilizados por el DENV para ingresar y dispersarse dentro del tejido nervioso.

Palabras clave: Alteración endotelial, BHE, infección, DENV, trans migración celular, transporte paracelular..

ABSTRACT

The nervous system (NS) is protected by a cellular diffusion barrier named Blood Brain Barrier (BBB). This barrier is formed by different cell types that limit the passage of molecules from the capillaries into the brain parenchyma, nevertheless some molecules and infectious agents are able to cross the BBB and infect the nervous tissue. Among the viruses that manage to alter the BBB and infect nervous tissue, there are some *flaviviridae* family members known as neurotropic flavivirus, however Dengue virus (DENV), a no-neurotropic flavivirus, can alter the physiology of the nervous tissue, causing clinical signs such as encephalitis, paralysis and motor and cognitive alterations that might be permanent.

To understand some of the changes in the virus tropism, and in the neurological and immunological factors associated with DENV infection in the NS, we developed a neuroinfection model in suckling mice using a strain of neuroadapted virus (D4MB-6) than infects neurons and some others cells of the nervous tissue and can alter the BBB permeability in suckling mice. Therefore, the present project evaluated the permeability alteration of the cerebrovascular endothelial barrier, associated with DENV-4 or D4MB-6 infection in an *in vitro* BBB model. We tried to answer if this alteration can promote the passage of virus into the nervous tissue allowing infection and viral spread.

We establish a BBB *in vitro* model using primary cultures (isolated from suckling mice) of endothelial cells (BBB model in monolayer) or endothelial cells and astrocytes (co-culture BBB model). The results showed that only the endothelial cells were susceptible to the infection with each evaluated virus; also in both BBB models at 10 hours post-infection, there was a decreased in the transendothelial resistance values (TEER), associated with an increase in the permeability of the model. Additionally at this time, we detected infectious viral particles in the supernatants of the lower chamber of the inserts, suggesting that infection results in an alteration in the integrity of the endothelial cells and permits the paracellular passage of viral particles. We also found that the infection with D4MB-6 induced the relocation of the ZO-1 protein, but it did not affect the expression pattern of this protein. Infection also induced the over expression of primary transcripts of VCAM, PECAM, TNF α y MCP-1 proteins, compared with the observations made when the cells were infected with DENV-4. This is related with an endothelial activation process that favored the transmigration of immune cells (J774) in both BBB models.

Our results suggest that the alteration process of the BBB is one of the possible mechanisms used by the DENV to enter and spread in to the nervous tissue.

Key Words: Endothelial alteration, BBB, infection, DENV, cellular transmigration, paracellular transport.

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo principal	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. JUSTIFICACIÓN	16
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
5.1 Consideraciones éticas.....	17
5.2 Establecimiento de los cultivos primarios de endotelio y astrocitos.....	17
5.2.1 Cultivo de endotelio cerebrovascular de ratón lactante:.....	17
5.2.2 Cultivo de astrocitos de cerebro de ratón lactante:	18
5.3 Caracterización de los cultivos primarios por inmunofluorescencias.....	18
5.4 Producción del virus dengue neuroadaptado D4MB-6	19
5.5 Plaqueo directo.....	19
5.6 Ensayos de infección.....	19
5.7 Modelo de BHE en monocapa	20
5.7.1 Siembra de las células endoteliales sobre los insertos transwell® y medición de TEER:.....	20
5.7.2 Ensayos de permeabilidad:	21
5.7.3 Cuantificación de transcritos:	21
5.8 Modelo de BHE en co-cultivo.....	21
5.8.1 Siembra en transwell®	21
5.8.2 Infección:	22
5.8.3 Inmunocitoquímica:	22
5.9 Susceptibilidad a la infección de las células J774 (macrófagos murinos)	22
5.10 Ensayos de trans migración de macrófagos en el modelo de BHE en monocapa y co-cultivo.	23
5.11 Análisis estadístico	23
6. RESULTADOS.....	24

6.1. Establecimiento de los cultivos primarios de células endoteliales y astrocitos a partir de cerebro de ratón lactante...	24
6.1.1 Obtención y purificación del cultivo de endotelio cerebrovascular de ratones lactantes:	24
6.1.2 Obtención y purificación del cultivo astrocitos cerebrales de ratones lactantes:	25
6.2 Susceptibilidad a la infección por DENV en los cultivos purificados de endotelio y astrocitos.	27
6.3 Modelo de BHE en monocapa	31
6.4 Modelo de BHE en co-cultivo.....	32
6.5 Evaluación de los daños asociados a la infección por DENV neuroadaptado o no.....	33
6.5.1 Modelo de BHE en monocapa.....	33
6.5.2 Modelo de BHE en Co-cultivo	37
6.6 Evaluación de la expresión de las moléculas de adhesión.....	43
6.7 Ensayo de trans migración de macrófagos.....	45
6.7.1 Modelo de BHE en monocapa.....	45
6.7.2 Modelo de BHE en Co-cultivo	50
7 Discusión.....	52
8 Conclusiones.....	63
9 Perspectivas.....	64
10 Bibliografía	65
ANEXO 1.....	72
LISTADO DE SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LOS CULTIVOS CELULARES	72
ANEXO 2.....	75
LISTADO DE ANTICUERPOS PRIMARIOS, SECUNDARIOS Y ESTREPTAVIDINAS.....	75
ANEXO 3.....	76
SECUENCIAS DE LOS PRIMERS	76
ANEXO 4.....	77
PROGRAMAS DE AMPLIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES TRANSCRITOS	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura de la unidad neurovascular.....	4
Figura 1: Las células endoteliales cerebrales forman uniones altamente estrechas entre célula-célula, disminuyendo la difusión paracelular entre éstas.....	5
Figura 2 Esquema de la interacción entre las células endoteliales y los astrocitos.....	8
Figura 3. Proceso de trans migración endotelial a través de la BHE.....	14
Figura 4. Esquema de un inserto transwell.....	21
Figura 5. Esquema del proceso de siembra de las células en el modelo de co-cultivo.....	23
Figura 6. Evolución del cultivo primario de células endoteliales de microvasculatura cerebral de ratón.....	25
Figura 7. Caracterización inmunocitoquímica de las células endoteliales cerebrovasculares.....	27
Figura 8. Evolución del cultivo de astrocitos luego del proceso de purificación.....	28
Figura 9. Caracterización inmunocitoquímica de astrocitos.....	29
Figura 10. Inmunodetección para antígeno viral en astrocitos, a las 48 hpi.....	30
Figura 11. Susceptibilidad de células endoteliales a la infección por DENV adaptado o no a 24 o 48 hpi.....	30
Figura 13. Inmunofluorescencia para ZO-1 y antígeno viral en células endoteliales infectadas.....	31
Figura 12. Dinámica de la TEER en el modelo de BHE en monocapa.....	32
Figura 13. Inmunodetección para GFAP en la cara luminal y abluminal de los insertos transwell.....	34
Figura 14. Modelo de BHE en monocapa. Porcentajes de TEER en células endoteliales infectadas con el virus dengue parental o neuroadaptado a diferentes tiempos p.i.	35
Figura 15. Modelo de BHE en monocapa. Porcentaje de azul dextrán presente en los sobrenadantes de la cámara inferior de los insertos en células endoteliales infectadas con el virus dengue parental o neuroadaptado a diferentes tiempos p.i.....	36
Figura 16. Modelo de BHE en monocapa. Inmunodetección de ZO-1 en células endoteliales infectadas con el virus dengue parental o neuroadaptado a diferentes tiempos p.i.	37
Figura 17 Modelo de BHE en co-cultivo. Porcentajes de TEER en co-cultivos infectados con el virus parental o neuroadaptado a diferentes tiempos p.i.	38
Figura 18. Modelo de BHE en co-cultivo. Porcentaje de Azul dextrán presente en los sobrenadantes de la cámara inferior de los insertos, en células infectadas y no infectadas a diferentes tiempos	39
Figura 19. Modelo de BHE en Co-cultivo. Inmunodetección para Claudina 1, en co-cultivos infectados con el virus parental o neuroadaptado a 48 hps y p.i.....	41
Figura 20. Modelo de BHE en Co-cultivo. Inmunodetección para ZO- y GFAP, en co-cultivos infectados con el virus parental o neuroadaptado a 48 hps y p.i.....	42
Figura 21. Expresión relativa de transcritos primarios para VCAM, PECAM y ZO-1 en los diferentes tiempos p.i evaluados en células infectadas con el virus D4MB-6.....	44
Figura 22. Expresión relativa de transcritos primarios para MCP-1 y TNF- α en los diferentes tiempos p.i evaluados en células infectadas con el virus D4MB-6.....	45
Figura 23. Expresión relativa de la proteína M del DENV adaptado o no, en células endoteliales infectados en diferentes tiempos p.i.....	46
Figura 26. Inmunofluorescencia para la molécula de adhesión VCAM-1 en células endoteliales infectadas con los virus parental y D4MB-6.....	47
Figura 24. Inmunofluorescencia para la detección de la molécula de adhesión E- sele en células endoteliales infectadas con DENV parental y D4MB-6.....	48

Figura 25. Inmunofluorescencia para la detección de la molécula de adhesión PECAM en células endoteliales infectadas con DENV parental y D4MB-6.....	49
Figura 26. Microfotografía en contraste de fases de células J774 (macrófagos de ratón J774).....	50
Figura 27. Inmunodetección para antígeno viral en células J774.....	50
Figura 28. Morfología de las células J774 transmigradas.....	52.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Títulos virales obtenidos a partir de los sobrenadantes de las cámaras inferior y superior, de células infectadas con el virus parental, en el modelo de BHE en co-cultivo.....	43
Tabla 2. Títulos virales obtenidos a partir de los sobrenadantes de las cámaras inferior y superior, de células infectadas con el virus D4MB-6, en el modelo de BHE en co-cultivo.....	43
Tabla 3. Promedio de células J774 transmigradas en el modelo de BHE en monocapa.....	51
Tabla 4 . Promedio de células J774 transmigradas en el modelo de BHE en co-cultivo.....	52

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso (SN), está protegido por una barrera de difusión celular conocida como Barrera Hematoencefálica (BHE), compuesta por diferentes tipos de células que limitan el paso de moléculas desde los capilares hacia el parénquima cerebral, garantizando de esta forma la homeostasis del tejido. Sin embargo, algunas moléculas y agentes infecciosos logran atravesar la BHE e ingresar al tejido nervioso para inducir graves daños en la fisiología de éste.

Dentro los microorganismos patógenos que alteran la BHE e infectan el tejido nervioso, se encuentran el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), el Virus Leukemia de Células T Humano (HTLV-1) y algunos miembros de la familia *flaviviridae* como el Virus West Nile (WNV) y el Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV), los cuales son típicamente neurotrópicos. Otros virus como el Virus del Dengue (DENV), aunque es considerado un virus vicerotrópico, puede alterar la fisiología del tejido nervioso ocasionando signos como encefalitis, parálisis, parálisis flácida y alteraciones motoras y cognitivas que pueden ser permanentes.

Para comprender los cambios de tropismo y los factores neurológicos e inmunológicos asociados a la infección por DENV, en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo de neuroinfección en ratones lactantes utilizando una cepa de virus neuroadaptado (D4MB-6), que infecta neuronas y otras células del tejido nervioso e induce la alteración de la BHE en ratones de 2 y 7 días post-natales (dpn), evidenciado por la extravasación de Azul de Evans hacia parénquima cerebral, sin embargo hasta el momento se desconocen los mecanismos que podría utilizar este virus para ingresar y dispersarse dentro del tejido nervioso. Por lo tanto, el presente proyecto buscó evaluar en un modelo de BHE *in vitro*, si la alteración de la permeabilidad de la barrera endotelial cerebrovascular asociada a la infección con el DENV-4 neuroadaptado o no, favorece el paso de virus libre o asociado a células del sistema inmune, lo cual permitiría la infección y dispersión viral en el tejido nervioso.

Para esto, se estableció un modelo de BHE *in vitro* en monocapa o co-cultivo utilizando cultivos primarios de endotelio cerebrovascular con o sin astrocitos obtenidos a partir de cerebros de ratones Balb/C de 7 dpn, en los cuales se evaluaron algunos cambios estructurales (alteración de la integridad de la barrera) y moleculares (expresión de transcritos primarios de algunas moléculas de adhesión, proteínas de unión estrecha y citoquinas) inducidos por la infección; adicionalmente se evaluó si estas alteraciones favorecen la infiltración de partículas virales libres y la trans migración de macrófagos.

En primera instancia, se obtuvieron los cultivos primarios de células endoteliales y astrocitos, con una pureza del 99% y 95% respectivamente, determinadas por la expresión de las proteínas Factor Von Willebrand (vWF) y por las proteínas de unión estrecha (TJPs) ZO-1 y Claudina 1 para endotelio y GFAP para astrocitos. Posteriormente se evaluó la susceptibilidad a la infección en ambos tipos de células encontrando que únicamente las células endoteliales fueron susceptibles a la

infección con el virus parental y D4MB-6, siendo mayor el porcentaje de células infectadas con el D4MB-6 (49%) comparado con las células infectadas con el virus parental (12%).

Luego de obtenidos y caracterizados los cultivos primarios, se estandarizaron los modelos de BHE en monocapa o Co-cultivo sobre membranas porosas. Los resultados obtenidos mostraron en ambos modelos de BHE que a las 10 horas post-infección (hpi) con los diferentes virus, hubo una disminución en los valores de resistencia transendotelial (TEER), asociada a un aumento en la permeabilidad, evaluada por la difusión de moléculas de gran tamaño y en este mismo tiempo post-infección se detectaron partículas virales infecciosas en la cámara inferior de los insertos. Esto sugiere que la infección ocasiona una alteración en la integridad de las células endoteliales, lo que permite el paso paracelular de las partículas virales.

Adicionalmente se encontró que la infección con el D4MB-6 indujo la relocalización -sin afectar la expresión-, de la proteína TJP ZO-1 y un aumento en la expresión de los transcritos para las proteínas VCAM, PECAM, TNF α y MCP-1 comparado con lo observado durante la infección con el virus parental. Esto último está relacionado con un proceso de activación endotelial que al parecer favoreció el proceso de trans migración de monocitos/macrófagos J774 en ambos modelos de BHE estandarizados, sin embargo en el modelo de co-cultivo, se evidenció que la infección de las células endoteliales favoreció la trans migración de macrófagos (infectados o no) hacia el pozo inferior de los insertos de manera significativa.

Los resultados obtenidos con ambos modelos de BHE, permiten sugerir que el DENV, tiene la capacidad de alterar o modular las características fenotípicas y estructurales de la BHE, siendo mayor el daño cuando la infección es ocasionada por subpoblaciones virales neurotrópicas y neurovirulentas como las que componen el virus D4MB-6, favoreciéndose así la infección y activación del tejido endotelial, aumentando a su vez la permeabilidad paracelular endotelial. Esto último promueve el paso de partículas virales libres y la trans migración de células inmunes que infectadas o no, pueden afectar la fisiología del tejido nervioso.

Lo anterior convierte el proceso de alteración de la BHE en uno de los posibles mecanismos utilizados por el DENV para ingresar y dispersarse dentro del tejido nervioso.

2. MARCO TEÓRICO

El sistema nervioso central (SNC) cuenta con tres diferentes barreras protectoras que limitan y regulan el intercambio de moléculas entre la sangre y el tejido neural, la primera es la barrera hematoencefálica (BHE), formada principalmente por células endoteliales del parénquima cerebrovascular alineadas entre la sangre y el fluido intersticial cerebral (ISF), la segunda barrera es el epitelio del plexo coroideo, alineado en los ventrículos cerebrales, que limita la sangre y el fluido cerebro espinal ventricular y la tercera es el epitelio aracnoideo, la capa media de las meninges que forma la cobertura más externa del SNC (Abbott et al, 2006; Abbott, 2013). Sin embargo, es la BHE quien por sus características fenotípicas y morfológicas ejerce el mayor control sobre el microambiente cerebral (Abbott et al, 2006).

La Barrera Hematoencefálica (BHE)

En el proceso evolutivo, tanto vertebrados como invertebrados adquirieron sistemas nerviosos (SN), con algunas diferencias estructurales y de complejidad, por ejemplo algunos vertebrados como los elasmobranquios (tiburones y mata-rayas), e invertebrados como insectos, crustáceos y moluscos cefalópodos, tienen una BHE que está conformada por prolongaciones de la glia perivascular ya que carecen de células endoteliales (Abbott, 2005); a pesar de estas diferencias, se puede afirmar que todos los organismos con SN, tienen una BHE (Abbott et al, 2010).

La BHE, es una barrera física altamente selectiva que controla el paso de moléculas desde el torrente sanguíneo hacia el parénquima cerebral y viceversa, suministrando los nutrientes esenciales, controlando el flujo de desechos, restringiendo el movimiento de iones y fluidos entre la sangre y el tejido cerebral y protegiendo el cerebro de fluctuaciones en la composición iónica después de comer o hacer ejercicio (Abbott et al, 2002, 2006, 2010; Haseloff et al, 2005).

Esta barrera está conformada por células endoteliales y su lámina basal, además de astrocitos, pericitos, neuronas y células de la microglía, que constituyen la unidad neurovascular (UNV), siendo las complejas interacciones entre estas células, las que determinan la fisiología de la BHE, lo que garantiza el adecuado funcionamiento del tejido nervioso (Cardoso et al, 2010), (Figura 1).

Todos los componentes de la UNV cumplen diferentes e importantes funciones en el establecimiento y mantenimiento de la barrera. La lámina o membrana basal rodea las células endoteliales de la microvasculatura cerebral y envuelve a los pericitos, anclando las células en su lugar y ayudando en el establecimiento de conexiones entre las células endoteliales y las otras células de la UNV (Hawkins & Davis, 2005; Carvey et al, 2009; Cardoso et al, 2010).

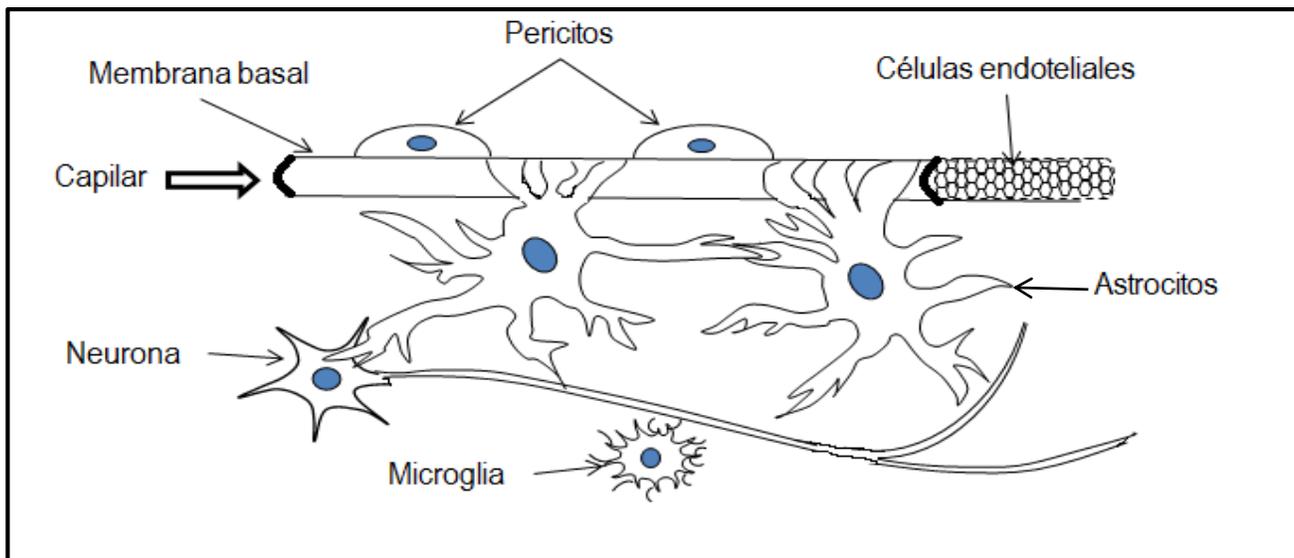


Figura 1. Esquema de la estructura de la unidad neurovascular.

Se muestran las diferentes células que conforman la BHE y la relación topológica existente entre ellas.

Tanto los pericitos como los astrocitos ayudan a mantener la lámina basal que está constituida por proteínas estructurales como colágeno y elastina, proteínas especializadas como fibronectina y laminina además de proteoglicanos (Hawkins & Davis, 2005; Weiss et al, 2009; Cardoso et al, 2010). Las neuronas regulan la función de los vasos sanguíneos en respuesta a requerimientos metabólicos como la vasodilatación o vasoconstricción, liberando neurotransmisores como norepinefrina (neuronas noradrenérgicas), serotonina (neuronas serotoninérgicas), acetilcolina (neuronas colinérgicas) y ácido γ -amino butírico (GABA) y glutamato (neuronas GABA-érgicas) (Persidsky et al, 2006), induciendo a su vez la expresión de enzimas como la γ -glutamyl transpeptidasa (GGTP) -encargada del transporte de aminoácidos a través de la BHE-. Estos procesos a su vez, ayudan al mantenimiento del microambiente cerebral que permite la función neuronal adecuada (Cardoso et al, 2010) favoreciendo la señalización precisa, confiable y reproducible entre neuronas (Abbott, 2013).

Por su parte la microglía desempeña un papel muy importante en la respuesta inmune del SNC, reconociendo cambios microambientales locales y cambiando el fenotipo en respuesta a disturbios homeostáticos del tejido nervioso, activándose y asumiendo una función fagocítica típica de células inmunes (Cardoso et al, 2010), reforzando así la función protectora propia de la BHE. De forma particular, la microglia mantiene la integridad endotelial de la BHE soportando los vasos sanguíneos dañados y facilitando la reparación de los mismos en condiciones patológicas, sin embargo el mecanismo molecular de este proceso aún no se conoce (Keller, 2013).

Los pericitos tienen una relación estrecha con el endotelio ya que sintetizan la mayoría de elementos de la lámina basal incluyendo varios proteoglicanos, promueven la unión estructural entre las células endoteliales (Cardoso et al, 2010) y ayudan a mantener la restricción en la permeabilidad de la BHE (Weiss et al, 2009), además de suministrar el soporte estructural y capacidad vasodinámica a la microvasculatura (Ballabh et al, 2004). Por su parte, los astrocitos extienden una serie de prolongaciones citoplasmáticas hacia la lámina y superficie basal del endotelio conocidas como pies astrocíticos

que permiten la comunicación directa entre los astrocitos y el endotelio (Abbott, 2002; Cardoso et al, 2010). Estas células además desempeñan un papel importante en la inducción de la síntesis de proteoglicanos por parte de los pericitos, que repercute en un aumento en la selectividad de las células endoteliales y por consiguiente en la inducción de las funciones de la BHE; siendo a su vez importantes para la función neuronal apropiada (Cardoso et al, 2010).

A pesar de la complejidad de la BHE, actualmente se considera que las células endoteliales son la unidad funcional y estructural de la misma, gracias al papel preponderante de éstas en la regulación del microambiente cerebral (Abbott et al, 2006). Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral difieren del endotelio extraneural, principalmente por la ausencia de fenestraciones (pequeños agujeros en las membranas celulares que permiten el intercambio de moléculas entre las células y el torrente sanguíneo) (Ballabh et al, 2004). La ausencia de estas, junto con el establecimiento de uniones altamente estrechas entre ellas, mediadas por proteínas integrales y periféricas de membrana, denominadas proteínas de unión estrecha (Tight Junction Proteins, TJP) y proteínas de unión adherente (Junctional Adhesion Molecules, JAM) (Figura 2) (Abbott et al, 2005, 2006; Hawkins & Davis, 2005; Brown et al, 2007; Wilhelm et al, 2011), le permiten al endotelio cerebrovascular tener un bajo nivel de transcitosis (paso de moléculas a través de las células, mediante la formación de vesículas) y de difusión paracelular (paso de moléculas a través del espacio intercelular de 2 células) de algunos compuestos hidrofílicos (Weiss et al, 2009).

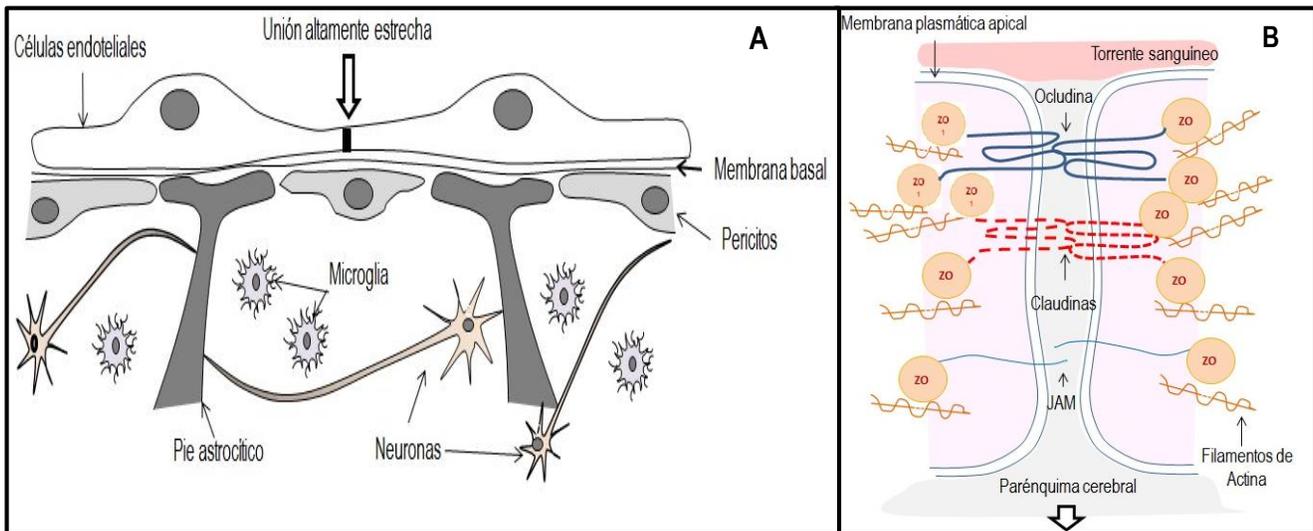


Figura 2: Las células endoteliales cerebrales forman uniones altamente estrechas entre célula-célula, disminuyendo la difusión paracelular entre éstas.

A) Esquema de las uniones estrechas entre las células endoteliales y la interacción con las poblaciones celulares de la UNV. B) Esquema de la distribución de las TJP y JAM en el espacio intercelular de las células endoteliales. Adaptado de Hawkins et al, 2005 & Abbot et al, 2006.

Las TJP, son el elemento fenotípico más importante del tejido endotelial, ya que estas separan los dominios apicales y basolaterales de la membrana, ayudando a la polarización de las células (función de cerca o valla), restringen la ruta paracelular (función de compuerta) (Furuse et al, 1998; Wilhelm et al, 2011) y la distribución asimétrica de los componentes

de membrana (Cardoso et al, 2010), obligando al tráfico molecular a tomar una ruta transcelular (a través de las células), para atravesar la BHE (Wilhelm et al, 2011).

Dentro de las TJPs identificadas como esenciales para la generación del fenotipo de barrera se encuentran la Ocludina y las Claudinas. **Ocludina**, es una proteína intramembranal de 60-65 kDa, que contiene 4 dominios transmembranales (Furuse et al, 1998, Hu et al, 2013) con sus extremos carboxilo y amino terminal orientados hacia el citoplasma y dos *loops* extracelulares que atraviesan el espacio intercelular (Figura 2B) (González-Mariscal et al, 2003; Hawkins & Davis, 2005; Hu et al, 2013). La función más importante de ocludina es regular las TJP (Abbott et al, 2006), principalmente mediante la fosforilación de serinas y treoninas, que favorecen la correcta localización de la proteína en las células, la adecuada formación de complejos entre las ocludinas de células vecinas, y potencian la interacción de forma directa a través de los últimos 150 aminoácidos del extremo carboxi-terminal de ocludina con los filamentos de actina o a través de ZO-1. De este modo las ocludinas altamente fosforiladas se encuentran selectivamente ubicadas en las uniones estrechas, mientras que las no fosforiladas o con bajos niveles de fosforilación se localizan en el citoplasma celular (González-Mariscal et al, 2003).

Las **Claudinas**, son proteínas intramembranales de 20-27 kDa, que tienen una topografía membranal (con 4 dominios transmembranales y 2 *loops* extracelulares) similar a ocludina (Furuse et al, 1998; Hawkins & Davis, 2005; Cardoso et al, 2010). Se conocen al menos 24 tipos de claudinas en mamíferos (González-Mariscal et al, 2003; Hawkins & Davis, 2005; Cardoso et al, 2010), con una distribución tejido-específica, indicando que estas proteínas son las directas responsables de la alta selectividad en el paso de iones que caracteriza al tejido endotelial (González-Mariscal et al, 2003). A pesar de lo anterior, solo las claudinas 3, 5, 12 (Weiss et al, 2009), 1, 18, 2 y 11 se expresan en el endotelio cerebrovascular, siendo claudina 1 y 5 las responsables de contribuir activamente con la integridad de la BHE (Cardoso et al, 2010). Este proceso es posible gracias a los diferentes procesos de fosforilación (mediadas por las protein-quinasas A -PKA- y PKC), que promueven la correcta inserción de las claudinas en la membrana celular, así como las interacciones entre estas proteínas en una misma célula (interacciones en *cis*) y en membranas de células adyacentes (interacciones en *trans*) (Günzel & Yu, 2013).

Actualmente se sugiere que las claudinas forman el primer “sello” de las uniones estrechas, siendo entonces las responsables de la baja permeabilidad paracelular (Cardoso et al, 2010), mientras que ocludina actúa como soporte estructural adicional (Hawkins & Davis, 2005; Cardoso et al, 2010). Los extremos citoplasmáticos C-terminales de ocludina y las claudinas se asocian con los filamentos de actina a través de las proteínas accesorias como **Zonula Ocludens (ZO)** 1 y 2 de las TJPs (Harhaj & Antonetti, 2004; Hawkins & Davis, 2005). Existen tres proteínas ZO identificadas, ZO-1 (fosfoproteína de 220 kDa), ZO-2 (fosfoproteína de 160 kDa) y ZO-3 (proteína de 130 kDa), todas con alta homología entre sí y con una participación esencial en la generación de uniones entre células (Haseloff et al, 2005; Cardoso et al, 2010). Estas proteínas actúan como proteínas de reconocimiento de las TJPs intramembranales (Ocludina y Claudina) actuando como el organizador central del complejo de unión, gracias a que su C-terminal se une a los filamentos de actina, anclando las TJP (Ballabh et al, 2004; Abbott et al, 2006; Cardoso et al, 2010), lo que las hace esenciales en el funcionamiento

adecuado de la barrera endotelial, puesto que la pérdida o la baja expresión de ZO en el complejo de unión, induce un aumento en la permeabilidad de la barrera (Cardoso et al, 2010).

Por otra parte las **JAM**, ubicadas normalmente en la parte lateral de las células endoteliales polarizadas (Laia et al, 2005) son proteínas intramembranales glicosiladas (González-Mariscal et al, 2003) de un solo paso, con un peso aproximado de 36 a 41 kDa (Harhaj & Antonetti, 2004). Estas proteínas tienen un único dominio transmembranal y un motivo de unión clásico tipo PDZ II, a través del cual JAM interactúa con los dominios PDZ de ZO-1 y otras TJP periféricas de membrana (González-Mariscal et al, 2003). La función principal de las JAM es mediar la adhesión de células endoteliales vecinas (Wilhelm et al, 2011) y estabilizar las uniones generadas por claudinas y ocludina en la zona apical de las células (Abbott et al, 2006). Sin embargo de las tres proteínas JAM conocidas hasta la fecha, solo JAM-1 es predominantemente expresada a nivel de endotelio cerebrovascular; mientras que las JAM-2 y 3 se expresan en células endoteliales de órganos linfáticos y en la mayoría de contactos que varían desde la vasculatura cerebral hasta el endotelio de grandes vénulas, respectivamente (Ballabh et al, 2004; Cardoso et al, 2010).

Relación astrocitos-endotelio

Aunque el endotelio presente en los diferentes órganos tiene la misma función de barrera, el endotelio de la microvasculatura del SNC es un poco diferente, debido a la íntima relación que tiene con las diferentes células de la UNV, especialmente con los astrocitos (Figura 3) (Abbott et al, 2006), lo que sugiere que estas últimas células pueden regular en el endotelio algunas características fenotípicas y genotípicas específicas (Abbott et al, 2002, 2006; Ballabh et al, 2004).

Los astrocitos exhiben diferentes morfologías dependiendo de su localización y asociación con otros tipos celulares (Abbott et al, 2006). De los 11 fenotipos conocidos, 8 involucran interacciones específicas con los vasos sanguíneos y la evidencia *in vitro* indica que los astrocitos pueden sobre-regular algunas características de la BHE como la formación de TJPs y la expresión polarizada de transportadores en la membrana apical y baso-lateral de las células endoteliales (Rubin et al, 1991; Abbott et al, 2002, 2010). Por ejemplo en experimentos *in vitro*, se observó que al sembrar astrocitos sobre vasos sanguíneos, estas células indujeron una disminución en la permeabilidad de los mismos, gracias a que se favoreció el establecimiento de uniones estrechas a nivel endotelial (Abbott, 2002). Este fenómeno al parecer, se debe a la interacción existente entre los pies astrocíticos perivasculares y las paredes de los microvasos, que favorecen la aparición de algunas características especializadas, como la expresión de agrina, (un proteoglicano de heparán sulfato) en la lámina basal, que se acumula en los microvasos en el momento de generar las uniones de la BHE y promueve el mantenimiento de la integridad de la misma (Abbott et al, 2006).

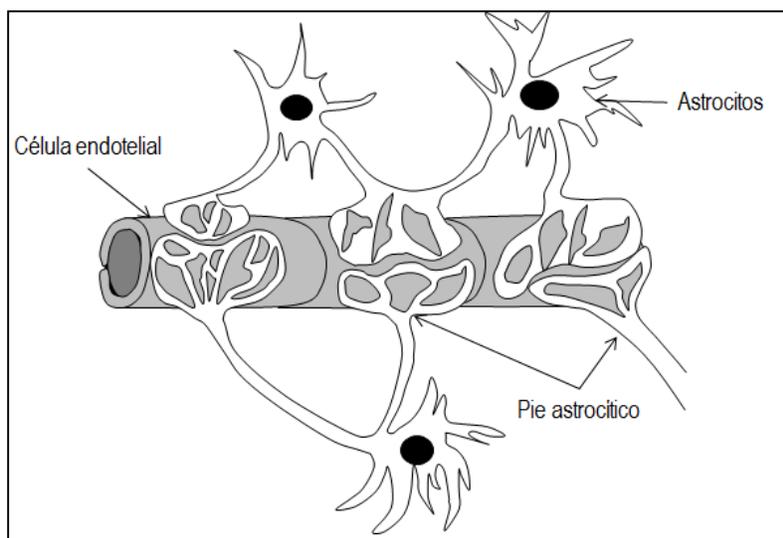


Figura 3. Esquema de la interacción entre las células endoteliales y los astrocitos.

Los pies astrocíticos perivasculares forman una estructura tipo roseta sobre la superficie capilar cerebral, estableciendo un contacto directo con las células endoteliales favoreciendo de este modo la comunicación entre estas células y la inducción o activación mutua.

Adicionalmente los astrocitos secretan una serie de agentes tróficos, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el Factor Neurotrófico Derivado Glial (GDNF), el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (bFGF) y la Angiopoyetina 1 (ANG 1), que favorecen la generación de uniones estrechas en las células endoteliales. De igual forma, algunos factores secretados por el endotelio, como el Factor Inhibitorio de Leukaemia (LIF), inducen la diferenciación astrocítica, la cual debe ser constante y permanente en los individuos, propiciando el funcionamiento normal de la BHE (Abbott et al, 2006).

La formación de uniones estrechas entre las células endoteliales cerebrales en cultivo, puede ser favorecida al mantener estas células en medio condicionado de astrocitos (sobrenadante de los cultivos de astrocitos), lo que evidencia la acción de los factores inductores solubles anteriormente mencionados (Abbott et al, 2002, 2010; Haseloff et al, 2005). No obstante, esta inducción es generalmente más efectiva *in vitro*, cuando las células gliales entran en contacto con las células endoteliales, para lo cual se utilizan filtros, conocidos como insertos transwell® (Deli et al, 2005), que constan de una membrana porosa, que favorece los contactos celulares entre los astrocitos sembrados del lado abluminal o inferior de la membrana y el endotelio sembrado del lado luminal o superior de la misma, generando así un modelo de BHE en co-cultivo (Abbott, 2002). Esto sugiere que el proceso de inducción entre astrocitos y endotelio depende de la correcta polaridad apical/basal entre endotelio y glía, y del contacto directo entre las células y/o la matriz extracelular (Abbott, 2002). Por lo anterior, el establecimiento de co-cultivos entre células endoteliales y astrocitos genera una serie de ventajas a la hora de estudiar diferentes aspectos de la BHE, como un mayor control del proceso de transcitosis y una disminución del paso paracelular de moléculas y iones (Brown et al, 2007), favoreciendo la generación de algunas características del tejido observadas *in vivo* (Abbott, 2013).

El método más preciso para medir la integridad (unión paracelular) de la barrera (*in vitro*) se conoce como resistencia transendotelial (TEER) (Deli et al, 2005; Cardoso et al, 2010), el cual permite evaluar la resistencia que oponen las células a la corriente eléctrica, de esta manera altos valores de TEER están relacionados con bajos niveles de permeabilidad en el modelo y viceversa (Cardoso et al, 2010). Además de medir la TEER, también se realizan ensayos de permeabilidad, evaluando el paso de moléculas de peso molecular conocido, desde la cámara superior, hacia la cámara inferior del inserto, por ejemplo es muy común el uso de FITC-dextrán como trazador (Wilhelm et al, 2011), el cual puede ser cuantificado con la ayuda de un fluorómetro.

Alteración de la función de barrera

La mayoría de las características fenotípicas de la BHE pueden ser susceptibles a cambios, lo que se conoce como la alteración de la BHE (Abbott et al, 2006). Esta alteración, normalmente está inducida por diferentes agentes inflamatorios, generados por diferentes tipos celulares como macrófagos, monocitos y células dendríticas, o los astrocitos, que mediante la liberación de agentes de forma local (paracrina) como glutamato, aspartato, taurina, endotelina-1, TNF- α e IL- β , entre otras, generan señales que actúan sobre el endotelio (Ballabh et al, 2004). Además las mismas células endoteliales pueden actuar de forma autocrina, liberando factores como el óxido nítrico (NO) y ATP que modulan su propia función, sin embargo y en comparación con el endotelio de otros órganos, el endotelio cerebrovascular es muy resistente a los efectos ocasionados por estos agentes (Abbott, 2005).

Algunos de los primeros ejemplos de alteración de la BHE fueron reportados en condiciones patológicas extremas, en donde los procesos inflamatorios desencadenados, ocasionaron la apertura de las TJPs del tejido endotelial (Abbott et al, 2006). Dentro de la larga lista de patologías que involucran alguna disfunción a nivel de BHE, se incluyen la esclerosis múltiple, hipoxia e isquemia, Parkinson y Alzheimer, epilepsia, tumores cerebrales y glaucoma (Ballabh et al, 2004; Abbott et al, 2010). Es importante tener en cuenta que la disfunción endotelial puede variar desde una leve y transitoria apertura de las TJP, a una disrupción crónica a nivel de la barrera, en donde también pueden suceder cambios en los sistemas de transporte (Abbott et al, 2010). Además de lo anterior, se sabe que algunos agentes infecciosos (como algunos virus), pueden entrar al SNC, produciendo cuadros clínicos de alta gravedad (Nakaoke & Banks, 2003), modificando la premisa de que la BHE es un complejo celular impermeable a todo tipo de patógenos, de hecho diferentes estudios indican que la interrupción de la BHE después del proceso inicial de infección en el tejido nervioso es un proceso que normalmente permite la entrada de virus, de células inmunes y de diferentes moléculas hacia el parénquima cerebral (Nakaoke & Banks, 2003; Spindler & Hsu, 2012).

Interrupción de la BHE ocasionada por algunos virus

La encefalitis es una de las secuelas potencialmente mortales que pueden suceder tras una infección viral, de hecho, se conocen virus pertenecientes a 11 familias taxonómicas diferentes (que incluyen virus de DNA, RNA y retrovirus), que pueden causar encefalitis con un índice de morbilidad y mortalidad significativo. Sin embargo para poder causar encefalitis,

los virus deben ingresar al SN bien sea por vía la hematogena, el transporte axonal o atravesando la BHE (Spindler & Hsu, 2012). En este trabajo nos enfocaremos en la tercera opción.

Dentro de los virus que se sabe pueden alterar la BHE o las uniones endoteliales, se incluye el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus leukemia de células T humano (HTLV-1), el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus de inmunodeficiencia felina (SIV-1) y algunos miembros de la familia flaviviridae como el virus West Nile (WNV) y el virus de la encefalitis japonesa (JEV), los cuales son típicamente neurotrópicos y cuyos mecanismos para ingresar a SN han sido estudiados durante varios años (Spindler & Hsu, 2012).

De particular importancia para este trabajo es el virus dengue (DENV), otro flavivirus (al igual que WNV y JEV), que a pesar de su naturaleza vicerotrópica, al parecer logra causar alteraciones a nivel del SN. El DENV es un virus de RNA cuyo genoma codifica un único polipéptido que sufre diversos procesos de corte para generar las diferentes proteínas virales (Yábar, 2003; Velandia & Castellanos, 2011). Este virus pertenece a un serocomplejo, conformado por 4 serotipos (DENV-1, 2, 3 y 4) (Srikiatkachorn, 2009), los cuales circulan periódicamente en áreas endémicas e hiperendémicas (Velandia & Castellanos, 2011) produciendo entre 50 y 100 millones de infecciones anuales a nivel mundial (Nielsen, 2009; Martínez-Gutierrez & Castellanos, 2006). El DENV genera varios cuadros clínicos, siendo el dengue grave, el de mayor complicación, debido al compromiso severo de diferentes órganos (OMS & TRD, 2009), acompañado de un daño en la permeabilidad vascular e infiltración de células plasmáticas, que genera la pérdida de volumen intravascular y la insuficiencia circulatoria (Srikiatkachorn, 2009).

El mecanismo patogénico que conlleva al dengue grave aún está siendo estudiado, sin embargo se cree que las citoquinas liberadas tras la activación inmune, tienen un papel directo en la inmunopatogénesis del DENV, gracias a sus efectos proinflamatorios sobre las células endoteliales vasculares (Kyle & Harris, 2008), que producen un aumento en la permeabilidad vascular de diferentes órganos y cavidades, ocasionando una extravasación de plasma sanguíneo, con hemorragias asociadas (Basu & Chaturvedi, 2008), que también pueden comprometer el SNC. Como consecuencia de lo anterior se producen signos como alteración de la conciencia (OMS & TRD, 2009) y alteraciones motoras y cognitivas (transitorias o permanentes) además de encefalitis, encéfalo-mielitis, mielitis transversa, desórdenes comportamentales, parálisis flácida y síndrome de Guillén Barré (Misra et al, 2006; Velandia et al, 2012).

Lo anterior parece estar relacionado con un fenómeno de exacerbación inmune que se da tras la infección con DENV y otros flavivirus denominado "*tormenta o tsunami de citoquinas*" (Mathur et al, 1992, Basu & Chaturvedi, 2008) en el que se evidencia un marcado aumento de algunas citoquinas como interleucina 4 (IL-4), IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, además de TNF- α , TGF- β , IFN- γ y MCP-1, convirtiéndose en un proceso clave asociado al daño endotelial, puesto que el aumento en la permeabilidad vascular parece ser una consecuencia directa del "*tsunami*" de citoquinas (Chaturvedi et al, 2000; Martínez-Gutierrez & Castellanos 2006; Basu & Chaturvedi, 2008; Nielsen, 2009; Dalrymple & Mackow, 2012; Velandia et al,

2012). Adicionalmente, estas citoquinas están involucradas en el **proceso de activación endotelial**, la cual es reconocida como un signo de inflamación tanto en el SNC como en otros órganos (Abbott et al, 2010), en donde se da la sobre-expresión de algunas proteínas conocidas como las moléculas de adhesión.

Las moléculas de adhesión hacen parte del sistema de adhesión célula-célula, que normalmente bajo condiciones inflamatorias participan en la activación y migración de células inmunes a través de la BHE (Weksler et al, 2005; Verma et al, 2009), además están involucradas en varios aspectos del desarrollo neuronal, como migración, formación de la red dendrítica axonal y la formación del complejo de redes gliales que rodean los axones y la sinapsis (Togashi et al, 2009). A continuación se describen algunas de las moléculas de adhesión más importantes en el proceso de adhesión célula-célula expresadas en el endotelio cerebrovascular:

1) **E-selectina** (*E-sele*), expresada únicamente en células endoteliales e inicialmente descrita como un antígeno de 115 kDa, involucrada en la adhesión de neutrófilos y varias líneas celulares de leucocitos (Bevilaqua et al, 1987; Carlos & Harlan, 1994). Posteriormente se determinó que E-sele es una proteína de 64 kDa, con un dominio citoplasmático de 32 aminoácidos que contiene residuos de tirosina, los cuales son sugeridos como mediadores de la internalización de otras proteínas transmembranales que probablemente influyen en la vida media de E-sele en la superficie celular (Carlos & Harlan, 1994).

2) **ICAM-1** (*Intercellular adhesion molecule-1*, CD102), es una proteína de superficie celular de 76-114 kDa, que puede ser expresada por leucocitos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, cuyos sitios de N-glicosilaciones, mostraron ser importantes en el proceso de unión a leucocitos (Carlos & Harlan, 1994).

3) **VCAM-1** (*Vascular cell adhesion molecule-1*, CD106), es una proteína transmembranal de 102-110 kDa, altamente conservada entre especies, con un nivel de homología del 77% entre ratones, ratas y humanos, que al igual que ICAM hace parte de la superfamilia de proteínas *Ig-like* involucrada en el proceso de adhesión celular endotelial para leucocitos (Carlos & Harlan, 1994).

4) **PECAM-1** (*platelet-endothelial cell adhesion molecule*), es una glicoproteína de aproximadamente 130 kDa, que desempeña un papel en la adhesión de los leucocitos, particularmente en la transmigración de los mismos, además de traducir señales de activación en ellos (Carlos & Harlan, 1994; Fernandez-Borja et al, 2010). PECAM-1 tiene una estructura homóloga a ICAM-1 pero que a diferencia de esta, solo se localiza en las uniones intercelulares (Carlos & Harlan, 1994).

Por las funciones de las moléculas de adhesión anteriormente descritas, de forma general se puede afirmar que E-sele, está involucrada principalmente en: i) el proceso de adhesión inicial, que se manifiesta en el rodamiento o *rolling* de los leucocitos bajo las condiciones del flujo sanguíneo (Carlos & Harlan, 1994); ii) participa en la unión de las integrinas de los leucocitos a las proteínas tipo IgG endoteliales y iii) media la adhesión firme de las células inmunes al endotelio. Entre tanto la transmigración endotelial involucra la expresión de PECAM-1 acompañado de otras proteínas tipo IgG como VCAM-1 e ICAM-1 (Carlos & Harlan, 1994; Weiss et al, 2009).

La evidencia indica que las moléculas de adhesión se ven afectadas tras la infección con DENV, por ejemplo se ha observado en muestras de sangre periférica de pacientes con dengue grave la presencia de ICAM-1 y VCAM-1 solubles, además de células endoteliales circulantes (CECs), lo que sugiere el daño vascular a nivel endotelial y la activación del mismo en estos pacientes (Cardier, y otros, 2006). La activación endotelial entonces, es uno de los procesos principales que permite la generación de diferentes señales y la posterior activación de rutas metabólicas, que conllevan a la alteración del endotelio y posiblemente a la entrada de virus al SN. A continuación mencionamos algunos de los mecanismos conocidos que hacen posible la entrada de virus a través de la BHE.

Mecanismos utilizados por algunos virus para atravesar la BHE.

1. Interrupción de las TJP y de la lámina basal por la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMPs): Las MMPs son endopeptidasas, secretadas por diferentes tipos de células como fibroblastos, leucocitos, keratinocitos o células endoteliales, que tienen un papel principal en la generación de procesos neuroinflamatorios de tipo destructivo que incluyen, la disfunción en la BHE (Feng et al, 2011; Roe et al, 2012; Spindler & Hsu, 2012; Yang et al, 2012). Estas enzimas tienen una actividad proteolítica que actúa sobre la matriz extracelular (Yang et al, 2007, 2012), como lo es la lámina basal de la UNV (Spindler & Hsu, 2012; Roe et al, 2012) y pueden escindir TJPs como ocludina y claudina 5 como se ha observado durante la neuroinfección con los virus WNV y JEV (Yang et al, 2007; Feng et al, 2011; Yang et al, 2012; Roe et al, 2012,).

2. Interrupción de las TJP por alteraciones en el citoesqueleto de actina y de los complejos periféricos de membrana de las TJP: Se sabe que como consecuencia de procesos de infección que afectan las células endoteliales se activan algunas vías metabólicas asociadas a PI3 quinasa y a la proteína quinasa B (PKB/Akt), lo que induce la reacomodación en el citoesqueleto de actina y por consiguiente modifican la localización de las proteínas ocludina y claudina 5, alterando la integridad de la BHE. También se conoce que durante la infección con WNV o JEV se presentan cambios en la fosforilación de las TJP ocludina, ZO-1, ZO-2 y claudina 5, modificando la localización y/o las interacciones de estas proteínas, afectando la permeabilidad de la BHE (Stamatovic et al, 2003; Schreiber et al, 2007; Spindler & Hsu, 2012).

3. Infección y replicación del DENV en células endoteliales de diferentes órganos: El primer reporte de infección en células endoteliales por DENV fue descrito inicialmente en células endoteliales de conejos y en células de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), sugiriendo que la infección y algunos factores humorales y celulares inducen la pérdida de la integridad vascular y un posible daño endotelial (Andrewset al, 1978). Hasta el momento se han evaluado los efectos de la infección con DENV sobre células endoteliales de la microvasculatura cerebral en muestras de necropsias de tejido nervioso, sugiriendo que al menos una fracción de estas células se infecta con el virus. Es posible, que la infección en estas células contribuya directamente a la patogénesis de la enfermedad, aumentando la viremia, induciendo la secreción de citoquinas, modulando la señalización de las rutas de complemento o transformando el endotelio en un blanco inmunológico de respuestas inmunes celulares y humorales (Dalrymple & Mackow, 2011, 2012).

Aunque aún se desconocen los efectos de la infección sobre la BHE, se cree que las células endoteliales infectadas con DENV, contribuyen directamente a la patogénesis, aumentando la viremia, secretando citoquinas, modulando rutas de complemento o transformando el endotelio en un blanco inmunológico de respuestas inmunes celulares y humorales (Dalrymple & Mackow, 2011, 2012).

4. Mecanismo de caballo de troya: Este mecanismo involucra el proceso de trans migración de células del sistema inmune infectadas a través de la BHE. Durante este proceso, células como macrófagos o linfocitos (previamente infectadas), cruzan la barrera de forma paracelular o transcelular aprovechando la diapédesis y transportan el virus hacia el parénquima cerebral (Buckner et al, 2006; Verma et al, 2009). Luego de ingresar al tejido, liberan moléculas tóxicas, que incluyen proteínas virales, citoquinas y quimioquinas que atraen y activan a las células de la microglía y los astrocitos hacia las áreas afectadas, de esta forma se favorece la infección de las células residentes del SN y la diseminación del virus dentro y fuera del tejido nervioso (Buckner et al, 2006), como ha sido reportado para VIH, SIV-1, y los flavivirus WNV (Spindler & Hsu, 2012), y JEV (Mishra et al, 2009). Este proceso de trans migración también se puede dar en la BHE no alterada, en donde las células mononucleares atraviesan la barrera, realizando una diapédesis transcelular sin involucrar la re-acomodación de los complejos de TJP (Abbott et al, 2010).

La entrada de leucocitos al parénquima cerebral, inicialmente requiere de la expresión de las moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales y de la expresión de las moléculas de adhesión propias de leucocitos como L-selectina (Weiss et al, 2009; Banks & Erickson, 2010). Una vez se expresan las moléculas de adhesión, se desencadena un proceso que incluye el acercamiento de las células inmunes al endotelio, seguido del proceso de rodamiento o “rolling” por parte de las células inmune, la adhesión firme de éstas sobre el endotelio cerebral y su posterior diapédesis (Carman et al, 2007; Banks & Erickson, 2010). Adicionalmente, estudios recientes muestran la formación de unas estructuras -conocidas como copas transmigratorias-, que expresan de manera localizada las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 y promueven la migración transendotelial de los leucocitos y la trans migración paracelular y transcelular de macrófagos, monocitos o leucocitos (Weiss et al, 2009) (Figura 4).

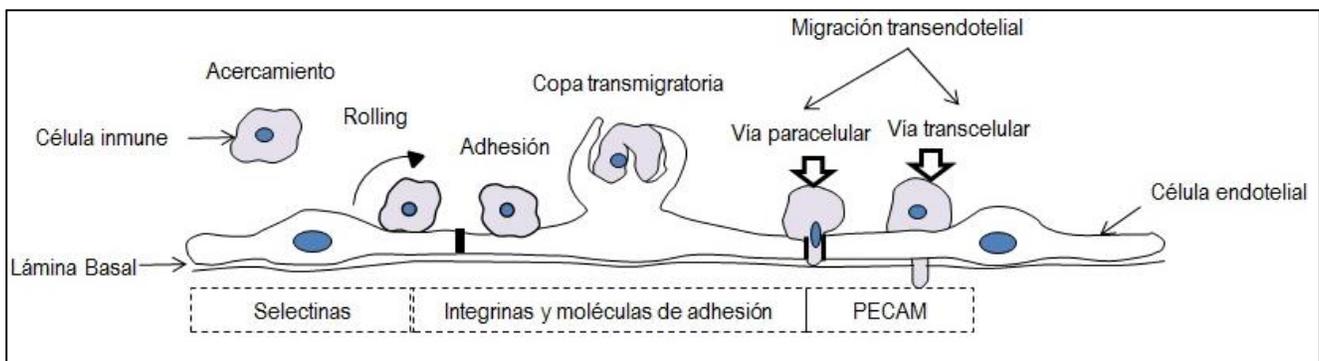


Figura 4. Proceso de trans migración endotelial a través de la BHE.

La trans migración transendotelial de las células del sistema inmune, es un proceso de varios pasos, regulados por las moléculas de adhesión y sus respectivos receptores. Después del proceso de acercamiento, rolling, y la adhesión firme, la trans migración está mediada por la formación de unas salientes en la membrana apical de las células endoteliales denominadas copas transmigratorias, que soportan el paso paracelular y/o el paso transcelular de las células inmunes a través de la BHE.

Daño endotelial asociado a la infección con DENV

Como se explicó anteriormente, el daño endotelial asociado a la infección con cualquier virus, puede ser debido a la infección *per se* de las células y a la activación y establecimiento de la respuesta inmune que afecta la permeabilidad vascular y posiblemente el funcionamiento de la BHE (Basu & Chaturvedi, 2008; Dalrymple & Mackow, 2012; Velandia, et al, 2012). Este proceso facilita la extravasación de plasma, las hemorragias y el paso de células (infectadas o no) hacia el tejido nervioso, lo cual contribuye, a la infección y diseminación de las partículas virales infecciosas dentro del tejido.

Aunque el DENV es un virus típicamente vicerotrópico, algunos reportes sugieren la infección y el daño del tejido tras la infección con el virus. Al respecto, Chaturvedi y colaboradores en 1991, observaron que la inoculación intracerebral del DENV-2 en ratones Swiss albino (inmunocompetentes) adultos, alteró la permeabilidad de la BHE y favoreció la infiltración de células y proteínas plasmáticas hacia el parénquima cerebral (Chaturvedi et al, 1991). En este mismo sentido, nuestro grupo generó un modelo de neuroinfección en ratones lactantes, en donde utilizando una cepa neuroadaptada de DENV-4 inoculada intraperitonealmente en ratones de 2 y 7 días postnatales dpn, infectó diferentes tipos celulares incluyendo células endoteliales e indujo cambios en la permeabilidad vascular y de la BHE (Velandia, 2012; Velandia et al, 2012).

Adicionalmente, otros estudios realizados sobre células endoteliales proveniente de órganos extraneurales, han permitido dilucidar algunos aspectos relacionados con el daño vascular asociado a la infección. Por ejemplo, en muestras de pacientes con dengue grave tomadas ante o post-mortem, se observó que el DENV no solo puede infectar sino que también puede replicarse en células endoteliales de diferentes órganos como hígado, pleura, pericardio, pulmones, tracto urinario, intestinos y cerebro. Por otra parte, en las erupciones de piel de pacientes con dengue clásico, se ha observado por histopatología y análisis ultraestructurales diapédesis de neutrófilos, extravasación de eritrocitos, infiltración de células perivasculares y daño endotelial y de neutrófilos (Basu & Chaturvedi, 2008).

Por lo tanto, de acuerdo a lo reportado previamente para otros flavivirus (WNV y JEV) y a las alteraciones (cognitivas y motoras) del SNC asociadas a la infección por DENV, se puede pensar que diferentes mecanismos incluyendo la alteración de la permeabilidad vascular, pueden favorecer el ingreso del DENV al tejido nervioso y el paso de partículas virales libres o asociadas a células inmunes. De acuerdo a esto, el objetivo del presente trabajo consistió en establecer y evaluar en un modelo *in vitro* de BHE si el DENV adaptado o no a tejido nervioso, altera la integridad y la funcionalidad de la barrera endotelial, lo que podría favorecer el ingreso y posterior dispersión del virus dentro del tejido nervioso y a su vez la aparición de patologías asociadas a SN, que aunque aún son consideradas como atípicas, son reportadas cada vez con mayor frecuencia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Evaluar en un modelo *in vitro* de BHE, la alteración del endotelio cerebrovascular inducido por el virus dengue neuroadaptado.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer un modelo de barrera hematoencefalica (BHE) utilizando células endoteliales y astrocitos de cerebro de ratón neonato.
- Determinar los daños en la integridad de la barrera inducidos por el virus dengue neuroadaptado.
- Evaluar en el modelo de barrera la trans migración de monocitos/macrófagos inducida por el virus dengue neuroadaptado.

4. JUSTIFICACIÓN

El virus dengue (DENV) es un flavivirus típicamente vicerotrópico, sin embargo algunos pacientes, presentan alteraciones neurológicas como cambios en el estado de conciencia, pérdida en la capacidad motora, sensorial o cognitiva (transitorias o permanentes), encefalitis, encéfalo-mielitis, mielitis transversa, parálisis flácida y síndrome de Guillén Barré asociados a la infección, lo que sugiere cambios en el tropismo del virus y en el perfil clínico de la enfermedad.

Recientemente nuestro grupo, desarrolló un modelo de neuroinfección *in vivo* en ratones Balb/C utilizando un virus neuroadaptado de dengue, que inoculado intraperitonealmente, infectó neuronas e indujo encefalitis, daños en la permeabilidad vascular y hemorragias, sin embargo, hasta el momento no se conocen los mecanismos utilizados por el virus para ingresar y dispersarse dentro del tejido nervioso.

Es probable que el aumento en la permeabilidad vascular observada en el modelo *in vivo*, favorezca el ingreso del virus hacia el tejido nervioso. Por lo tanto, se propuso evaluar en un modelo *in vitro* de BHE, si la infección induce alteraciones funcionales y estructurales en este tejido -aprovechando el carácter neurotrópico, neuroinvasivo y neurovirulento de la cepa de virus dengue neuroadaptado (D4MB-6)-, las cuales podrían favorecer el ingreso y posterior dispersión del virus dentro del tejido nervioso.

Los resultados obtenidos aportarán información básica sobre si la infección de algunas células de la Unidad Neurovascular (UNV) y la subsecuente alteración de la BHE es un proceso que favorece el ingreso del DENV al SNC, adicionalmente estos resultados permitirán entender un poco más acerca del proceso de alteración de la BHE como consecuencia de la infección con dengue, una patología aún considerada como atípica, pero que parece tener un gran impacto en la salud de los habitantes de países endémicos como Colombia

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos realizados en el presente proyecto fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad El Bosque, acta No 106 del 18 de abril de 2009. Los animales de experimentación fueron obtenidos y mantenidos en el Bioterio Central de la Universidad Nacional de Colombia y su manejo se llevó a cabo teniendo en cuenta lo enmarcado en la declaración universal de los derechos de los animales de Ginebra, Suiza (Ley 84 de 1989), la guía NCR USA, 2000, por los principios éticos de la experimentación animal ICLAS y la resolución No 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la Republica de Colombia (Biomédica 1997).

5.2 Establecimiento de los cultivos primarios de endotelio y astrocitos

5.2.1 Cultivo de endotelio cerebrovascular de ratón lactante:

Para establecer el cultivo de endotelio se modificó el protocolo estandarizado por Weinderfeller et al. (2005). Se utilizaron ratones de 7 dpn de la cepa Balb/C (5 ratones por cultivo), los cuales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia utilizando una combinación de ketamina (90 mg/Kg) y xilazina (15 mg/Kg). Posteriormente se extrajo el cerebro (sin cerebelo) y con ayuda de un escalpelo se disectó la corteza cerebral y se obtuvieron trozos de aproximadamente 1 mm³, que fueron disociados mecánicamente (20-25 veces up/down) en la solución de digestión 1 y puestos en agitación constante por 1 hora (1h) y 15 minutos (15 min) a 37°C. Luego, se detuvo la digestión enzimática con la solución de parada y se centrifugó a 1.000 rpm por 8 min, a continuación y con el fin de eliminar el debris celular y la mielina, el pellet fue resuspendido (3 veces) en una solución de albúmina sérica bovina (BSA), la cual fue centrifugada a 1.000 rpm por 5 min, luego el pellet recolectado, se incubó (en agitación constante) a 37°C por 50 min con la solución de digestión 2 y durante este tiempo se generó un gradiente de percoll al 33%, centrifugado a 14.000 rpm durante 1h a 4°C.

A continuación, el pellet recolectado se resuspendió en la solución de parada y se sembró sobre el gradiente de percoll, el cual fue centrifugado a 1.000 rpm por 10 min a 4°C, de esta forma se separaron los microvasos, los cuales fueron sembrados en placas de 12 pozos pretratados con matriz extracelular endotelial y mantenidos durante tres días en medio de cultivo Pre-Definido (MP-D) que contenía puomicina (Perrière, et al., 2005), como agente seleccionador de las células endoteliales. Al cuarto día de cultivo, se retiró la puomicina y las células fueron mantenidas por 20 o 30 días en medio definido (MD) y medio condicionado de astrocitos (MCA) en una relación 1:1, con cambios de medio cada 24 h. Una vez se alcanzó una confluencia del 90% las células fueron disociadas utilizando la solución de disociación 1, centrifugadas, resuspendidas en medio MD y re-sembradas en frascos de cultivo de 75 cm², sobre laminillas de vidrio o membranas de policarbonato de los insertos transwell® pretratados con matriz extracelular endotelial. Adicionalmente una parte de las células fue congelada en una solución de criopreservación (SC) y almacenadas a -80°C o en nitrógeno líquido.

5.2.2 Cultivo de astrocitos de cerebro de ratón lactante:

Para establecer el cultivo de astrocitos se modificó el protocolo estandarizado por Skaper et al, 2012. Después de haber obtenido las cortezas cerebrales, se recolectaron los fragmentos de cerebro y se centrifugaron a 200 rpm durante 30 seg, se descartó el sobrenadante y el pellet fue incubado por 1h a 37°C en la solución de digestión 3, con disociación mecánica cada 15 min. Al terminar el tiempo y sin centrifugar, se retiró el sobrenadante y se reemplazó con 1,5 ml de la solución ovomucoide, en la cual se homogenizó el tejido y se incubó por 2 min a 37°C. Luego, la suspensión celular fue centrifugada por 3 min a 250 rpm, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se adicionó de nuevo 1,5 ml de la solución ovomucoide en la cual se disoció mecánicamente el pellet hasta no detectar agregados; sobre esto se agregó 4 ml de medio de cultivo (MC) y se centrifugó por 5 min a 200 rpm. Finalmente, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio MC y se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm², en donde fueron mantenidas por 14 días a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar confluencia. Luego de esto, se inició el proceso de purificación del cultivo por agitación constante a 200 rpm por 2h a 37°C, luego se retiró el medio el sobrenadante y se agregó nuevo medio MC para continuar con el proceso de purificación a 200 rpm toda la noche a 37°C. Finalmente, el medio fue retirado, los cultivos fueron lavados con PBS y se agregó medio MC fresco para mantener las células por 8 días más, permitiendo el enriquecimiento del cultivo con astrocitos maduros.

Una vez alcanzada la confluencia, el medio de cultivo fue recolectado y congelado para ser utilizado como MCA, mientras que las células fueron disociadas utilizando la solución de disociación 2 por 10 min a 37°C. Luego la suspensión celular fue recuperada y centrifugada a 1.500 rpm por 5 min y las células fueron sembradas sobre laminillas o sobre la cara abuminal de las membranas de los transwells® (Figura 5) previamente tratadas con matriz extracelular para astrocitos.

Todas las soluciones utilizadas durante el establecimiento y mantenimiento de los cultivos primarios de astrocitos y endotelio descritas anteriormente, están enlistadas en el Anexo 1.

5.3 Caracterización de los cultivos primarios por inmunofluorescencias

Se sembraron 12.000 células endoteliales u 8.000 astrocitos sobre laminillas pretratadas. Luego de 24 horas post-siembra (hps) las células fueron fijadas por 30 min con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, lavadas con buffer, permeabilizadas con Tritón-X 100 al 0.3% e incubados con suero de cabra (SC) al 10%. Por otro lado para la detección de las proteínas Claudina 1 y Ocludina, las células endoteliales fueron fijadas con metanol durante 20 min, permeabilizadas con Tritón-X-100 al 0,3% por 5 min y bloqueadas con BSA al 1% en PBS por 30 min y los lavados se realizaron con PBS con Calcio (0,5mM) y Magnesio (1mM) (Xu et al, 2012). A continuación (e independientemente del proceso de fijación) las células endoteliales y los astrocitos fueron incubadas por 1h a 37°C con los diferentes anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés (Anexo 2), diluidos en SC al 5%, con excepción del control interno de especificidad de la inmunofluorescencia que no contenía anticuerpo primario. A continuación las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios respectivos, lavadas con PBS e incubadas con estreptavidina acoplada a diferentes fluorocromos. Finalmente se montaron las laminillas

sobre láminas porta-objeto utilizando Vectashield (Vector) y se analizaron bajo microscopio (Zeiss Axioimager A2) utilizando un sistema de fluorescencia X-Cite serie 120Q y el software Axio Vision.

Las concentraciones de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios al igual que las estreptavidinas, se enlistan en el Anexo 2.

5.4 Producción del virus dengue neuroadaptado D4MB-6

La obtención y producción del virus D4MB-6 se estandarizó previamente y se describe brevemente: se tomaron células C6/36HT las cuales fueron infectadas con una cepa de virus DENV-4. Al 3 día post-infección (dpi), se recolectó el sobrenadante (denominado Parental) el cual fue inoculado en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC) y pasajeado 2 veces más. El tercer pasaje de neuro-adaptación en células, fue inoculado intracerebralmente (i.c.) en ratones lactantes de la cepa Balb/C, los cuales se mantuvieron por 6 días. Pasado este tiempo los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia y se extrajeron y homogenizaron los cerebros completos, posteriormente se confirmó la infección y el título viral de este primer pasaje por medio de la técnica de plaqueo directo y se realizaron 5 pasajes más de adaptación *in vivo* obteniendo un virus neuroadaptado con seis pasajes de adaptación *in vivo*, denominado D4MB-6 (Dengue virus 4 mouse brain-6 pasaje) (Velandia et al, 2012).

5.5 Plaqueo directo.

Se sembraron 95.000 células BHK en cajas de 24 pozos, luego las células fueron infectadas con diluciones seriadas en base 10 de cada uno de los homogenizados de cerebro o sobrenadantes recolectados. Luego de 2 h de incubación a 37°C, se adicionó medio overlay (pH 7,4-7,6) que contenía 53,3% de DMEM 2X, 6,6% de Bicarbonato de sodio, 6% de SFB, 1% de penicilina/estreptomina, 0,05% de anfotericina y 30,6% de carboximetilcelulosa. Finalmente al 6to dpi, las monocapas fueron fijadas con PFA al 4%, lavadas y contrastadas con cristal violeta, luego las placas de lisis fueron contadas y los títulos virales fueron dados en Unidades Formadoras de Placas por ml (UFP/ml).

5.6 Ensayos de infección.

Se sembraron 10.000 células endoteliales u 8.000 astrocitos en laminillas pre-tratadas con colágeno y fibronectina (10µg/ml) para el endotelio y con Poly-L-Lisina (10µg/ml) para los astrocitos. 24 hps, las células fueron infectadas por 1h a 37°C con el virus parental (no adaptado) o con el virus D4MB-6 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. Luego, el inóculo viral fue retirado y las células fueron mantenidas a 37°C por 24 o 48 horas postinfección (hpi) en medio suplementado con SFB 2% (para los astrocitos) o SFB 5% (para el endotelio). Al finalizar el tiempo p.i. las células fueron fijadas y procesadas por inmunofluorescencia para detectar el antígeno viral y las proteínas ZO-1 (endotelio) o GFAP (astrocitos) para así determinar la localización subcelular de estas proteínas durante la infección. Finalmente las células se observaron bajo microscopio de

epifluorescencia (Zeiss Axioimager A2) utilizando el software Axio Vision para la captura de imágenes. Para el análisis se evaluaron 8 campos de 3 láminas diferentes, de 2 cultivos independientes, posteriormente se contaron las células totales y las infectadas utilizando la herramienta *Analyze Cell Counter* del software *Image J* (National Institute of Health, USA) las cuales fueron promediadas para calcular los porcentajes de infección. y realizar los cálculos estadísticos.

5.7 Modelo de BHE en monocapa.

5.7.1 Siembra de las células endoteliales sobre los insertos transwell® y medición de TEER:

Para el modelo de BHE en monocapa se sembraron 15.000 células endoteliales sobre la cara luminal (Figura 5) de la membrana de policarbonato (0.33cm² de área con poros de 0.4 µm) de los insertos transwell® (Corning), recubiertas previamente con colágeno y fibronectina (10µg/ml). Las células sembradas fueron mantenidas en medio MD durante 14 días y se determinó el valor diario de resistencia transendotelial (TEER) con ayuda del voltímetro Millicell ERS (Millipore).

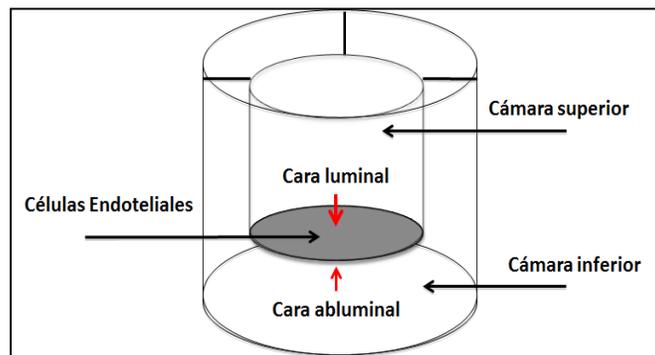


Figura 5. Esquema de un inserto transwell®.

Los insertos transwell®, dividen el pozo en 2 compartimientos denominados cámara superior e inferior, separados por una membrana (área sombreada) cuyo lado superior es denominado cara luminal, y su lado inferior es llamado cara abluminal.

Una vez establecidos los parámetros de número de células, tiempo post-siembra y TEER (mayor o igual a 1KΩ), la monocapa de células endoteliales fue inoculada con el MOCK (Homogenizado de cerebro no infectado) o infectadas con el virus DENV-4 parental o D4MB-6 a una MOI 1 como se describió anteriormente y se midió la TEER cada 2 h durante las primeras 12 hpi y a las 24 y 48 hpi. Al finalizar los tiempos p.i, las células fueron fijadas y procesadas por inmunocitoquímica utilizando los anticuerpos dirigidos contra las proteínas ZO-1 y Claudina I. Adicionalmente se evaluó por plaqueo directo el paso de virus de la cámara superior a la inferior de los transwells® en los diferentes tiempos p.i evaluados, tomando los sobrenadantes de ambas cámaras. Estos experimentos se realizaron en 52 transwells totales (26 para el modelo en monocapa y 26 para el modelo en co-cultivo), de los cuales 8 fueron tomados como controles sin virus (CSV), 8 fueron tratados con Mock, 12 fueron infectados con virus Parental y 24 con virus D4MB-6.

5.7.2 Ensayos de permeabilidad:

Para evaluar el daño en la permeabilidad se tomaron cultivos confluentes de células endoteliales sembradas sobre insertos transwell®. Las células fueron infectadas de la forma descrita anteriormente y luego se adicionó medio de cultivo suplementado con SFB al 10% y Azul Dextrán 2000 (2,4 mg/ml, Fine Chemicals) (Nazli et al, 2010). Luego, durante los tiempos p.i mencionados anteriormente (cada 2h durante las primeras 12 hpi y a las 24 y 48 hpi) se midió la TEER y se recolectó el sobrenadante de la cámara inferior de los transwell®. Los sobrenadantes fueron evaluados por espectrofotometría a 630nm y los resultados fueron comparados contra una curva estándar de Azul Dextrán.

5.7.3 Cuantificación de transcritos:

Se sembraron 200.000 células endoteliales sobre insertos transwell® de 1,2cm² de área y poro de 0,4µm. Al cuarto dps las células fueron infectadas con el virus parental o D4MB-6 a una MOI 1 (como se describió previamente) y se extrajo el RNA total en cada uno de los tiempos p.i definidos previamente, utilizando el método de Trizol® (Invitrogen). Posteriormente, se tomó 250 ng de RNA total que se retro-transcribió, amplificó y cuantificó para los transcritos de interés (Anexo 3), utilizando la enzima SuperScript III Platinum® One Step para RT-PCR en combinación con SYBR Green y los datos fueron normalizados contra el gen de referencia β-actina. Los programas de amplificación utilizados para cada transcrito, se describen en el Anexo 4.

5.8 Modelo de BHE en co-cultivo.

5.8.1 Siembra en transwell®

Para el montaje del modelo de BHE en co-cultivo, se procedió de la siguiente manera: en cabina, se recubrió la cara abluminal de los insertos transwell® (0,33cm² de área y 3,0µm de poro) con Poly-L-lisina (100µg/ml) por 1h y 30 min a temperatura ambiente (TA) (Figura 6A), luego se retiró el exceso de matriz con agua grado I estéril y se dejaron secar las membranas. Posteriormente, sobre el mismo lado (abluminal) de la membrana se sembraron 30.000 astrocitos; para permitir la adhesión de las células y los insertos fueron mantenidos en esta posición por 3 h en un recipiente plástico estéril en cabina y a TA. Luego, se adicionó cuidadosamente medio MC hasta cubrir por completo los insertos y estos se mantuvieron invertidos por 3 días a 37°C y 5% de CO₂ (Figura 6B), (Zhang, 2010). Al 4 dps, los insertos fueron ubicados de manera convencional en placas de 24 pozos (Figura 6C) e inmediatamente se sembraron 30.000 células endoteliales sobre la cara luminal y se evaluó la confluencia y la formación de barrera midiendo la TEER (igual o mayor a 1KΩ) y la permeabilidad del sistema con azul dextrán, como se describió anteriormente.

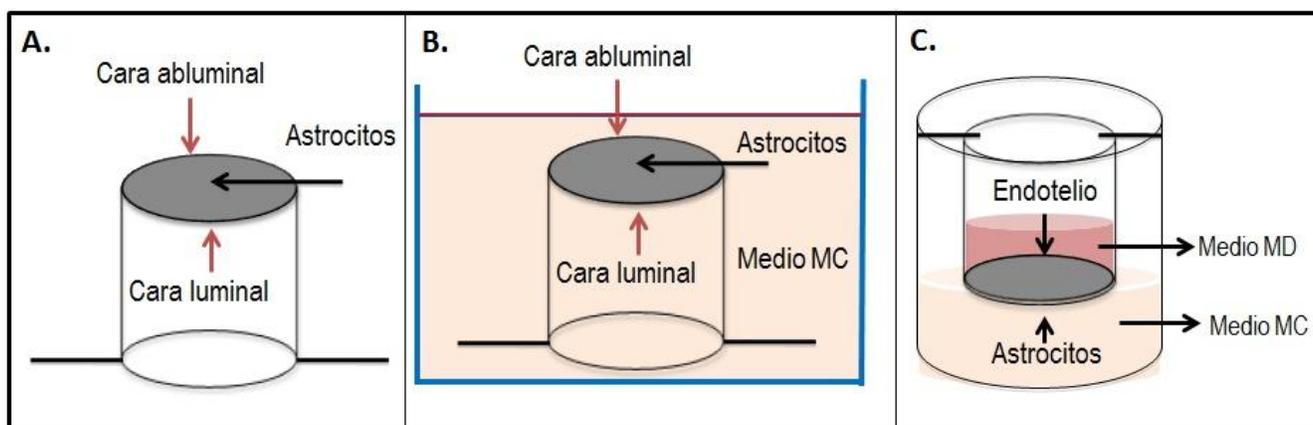


Figura 6. Esquema del proceso de siembra de las células en el modelo de co-cultivo.

A) Sobre la cara abluminal de los insertos previamente tratada se sembraron 30.000 astrocitos. B) 3 horas después de permitir la adhesión de las células (3h a TA), se adicionó medio MC hasta cubrir completamente los insertos que fueron mantenidos en esta posición por 3 días más. C) Al 4 día post-siembra, los insertos fueron ubicados en los pozos y sobre la cara luminal de la membrana, se sembraron 30.000 células endoteliales.

5.8.2 Infección:

Las células endoteliales sembradas en co-cultivo, fueron infectadas con el virus parental o D4MB-6 a una MOI de 1 (como se describió anteriormente) y se determinaron los cambios en la TEER y en la permeabilidad de la barrera en los tiempos p.i establecidos previamente, adicionalmente se recolectaron los sobrenadantes de las cámaras inferior y superior, para evaluar la presencia de virus por medio de la técnica de plaqueo directo.

5.8.3 Inmunocitoquímica:

Las células (endotelio o astrocitos) sembradas sobre los insertos, fueron fijadas con PFA al 4% o metanol y fueron procesadas por inmunocitoquímica detectando las proteínas: GFAP (astrocitos), ZO-1, Claudina 1, VCAM, PECAM y E-selectina (Anexo 2) para endotelio, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

5.9 Susceptibilidad a la infección de las células J774 (macrófagos murinos)

Se sembraron 25.000 células J774 (macrófagos murinos, ATCC) sobre laminillas tratadas con Poly-L-lisina (10µg/ml) y se mantuvieron en medio RPMI suplementado con SFB 10% y antibiótico. 24 hps, las células fueron infectadas con el virus parental o D4MB-6 (MOI 1) como se describió anteriormente. A las 24 hpi, las células fueron fijadas con PFA 4% y procesadas para detectar antígeno viral por inmunoperoxidasa. Para esto, el protocolo de procesamiento fue similar al de las inmunofluorescencias, con las siguientes excepciones: 1) Luego de la permeabilización las células fueron tratadas con 0,05% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y metanol al 50% por 30 min. 2) Después de la incubación con el anticuerpo secundario, las células fueron tratadas con una solución de 3,3-diaminobenzidina (DAB) al 0,1% y H₂O₂ al 0,02% en Tris-HCl 0,1M y contrastadas con Hemalum-Meyer. 3) Finalmente, las células fueron deshidratadas en gradientes de etanol (70% al 100%) y xilol por 10 min cada uno y montadas sobre láminas portaobjetos utilizando Entellán®. Al finalizar el

procedimiento las células fueron analizadas bajo microscopio Zeiss Axioimager A2, evaluando 8 campos de 3 láminas diferentes, de 2 cultivos independientes, posteriormente se contaron las células totales y las infectadas utilizando la herramienta *Analyze Cell Counter* del software *Image J* (National Institute of Health, USA) para calcular el porcentaje de infección.

5.10 Ensayos de transmigración de macrófagos en el modelo de BHE en monocapa y co-cultivo.

Para evaluar el proceso de transmigración en los modelos de BHE (monocapa o co-cultivo), se sembraron las células endoteliales en la cara luminal de los transwell® hasta alcanzar una TEER de mínimo 1K Ω . Luego, se evaluaron las siguientes condiciones:

- 1- Células endoteliales infectadas (Parental o D4MB-6 - MOI 1), e inmediatamente después de retirado el inóculo viral, sobre ellas se sembraron 15.000 macrófagos J774 no infectados.
- 2- Células endoteliales no infectadas y sobre ellas se sembraron 15.000 macrófagos J774 infectados (Parental o D4MB-6 - MOI 1)
- 3- Células endoteliales infectadas y sobre ellas se sembraron 15.000 células J774 infectadas con cada uno de los virus.

Para poder evaluar las condiciones 2 y 3 se procedió de la siguiente manera: Las células J774 crecidas en monocapa fueron infectadas como se describió previamente, 24 hpi las células fueron desprendidas con *scraper* y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min, luego sobre las células en suspensión se adicionó un buffer de glicina acida pH 3.0 por 1 min (Hung et al, 1999) (Anexo 1) para inactivar las partículas virales extracelulares. Luego se retiró el *buffer* y las células fueron resuspendidas en medio RPMI suplementado con SFB 5% y sembradas en placas de 6 pozos (Corning). A las 24 hps y hpi, las células fueron de nuevo desprendidas y re-sembradas sobre la monocapa endotelial presente en los insertos transwell®. A las 24 hps se fijaron las células presentes tanto en la membrana como en el pozo inferior de las placas de cultivo con PFA4%. Estas últimas fueron contrastadas con cristal violeta (Anexo 1) y contadas utilizando un microscopio invertido Zeiss AxioVert 40CFL.

5.11 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico del presente estudio se emplearon 3 pruebas diferentes: análisis de t-student, la prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico) y su análisis post-hoc se realizó con la prueba de Bonferroni. Se realizó una transformación angular para normalizar los datos antes de realizar al análisis de t-student, lo que permitió comparar el número de células totales infectadas y no infectadas, con ambos virus analizados a las 24 y 48hpi, usando un $p < 0.05$. Con el análisis de Kruskal-Wallis y de Bonferroni ($p < 0.05$), se buscaron diferencias significativas entre los valores de TEER, y de paso de azul dextrán (ensayos de permeabilidad) en los distintos tratamientos (mock, infectados con virus parental e infectados con D4MB-6), durante los diferentes tiempos evaluados y también se buscaron diferencias significativas entre las condiciones de transmigración planteadas, tanto en el modelo de BHE en monocapa como en el de co-cultivo.

6. RESULTADOS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Velandia et al (2012), quienes reportaron la alteración en la permeabilidad de la BHE en animales lactantes, durante la infección con el DENV neuroadaptado, se evaluó si este daño es un posible mecanismo de ingreso utilizado por el virus para infectar al tejido nervioso. Para esto, fue necesario se estandarizar un modelo de BHE *in vitro* en monocapa (utilizando células endoteliales) y en co-cultivo (utilizando células endoteliales y astrocitos) obtenidas a partir de ratones neonatos.

6.1 Establecimiento de los cultivos primarios de células endoteliales y astrocitos a partir de cerebro de ratón lactante.

6.1.1 Obtención y purificación del cultivo de endotelio cerebrovascular de ratones lactantes:

Se obtuvieron cultivos de células endoteliales mediante el aislamiento de los microvasos cerebrales de ratones Balb/C de 7dpm (5 cerebros por cultivo), los cuales bajo las condiciones adecuadas, permitieron la migración de células endoteliales, pericitos y otros tipos celulares (Figura 7A). Por la contaminación de los cultivos, fue necesario implementar un proceso de selección utilizando 3 pulsos de puromicina (3 μ g/ml) en el medio MP-D (Perrière et al, 2005), lo que permitió obtener cultivos purificados de células endoteliales, que entre el día 10 o 15 post-siembra (dps), presentaron un crecimiento regular de una única población de células, con morfología ahusada y prolongaciones citoplasmáticas cortas (Figura 7B). Pasado un mes de cultivo, se obtuvo una monocapa continua, no sobrelapante, de células elongadas, fusiformes de distribución adoquinada, que formaron una empalizada, característica de los cultivos de endotelio (Figura 7C) reportados para ratones, ratas y cerdos adultos.

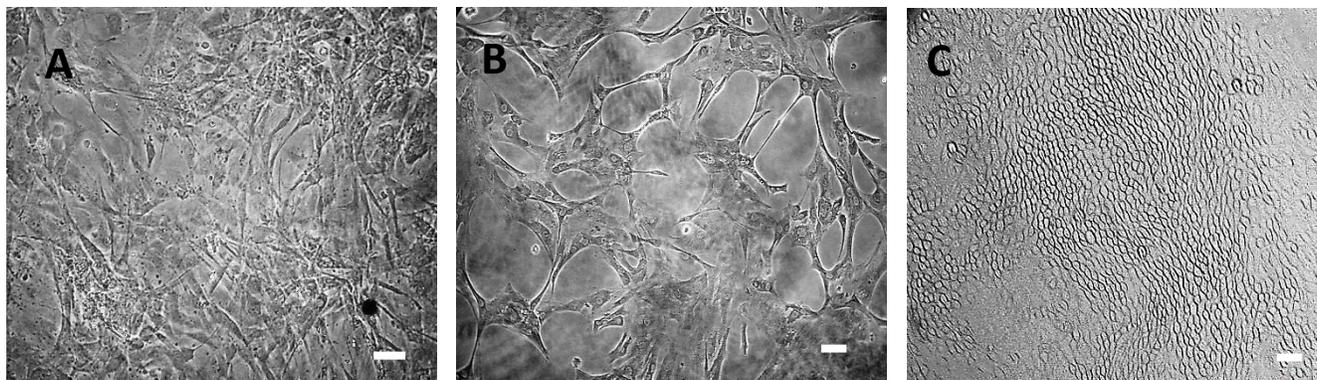


Figura 7. Evolución del cultivo primario de células endoteliales de microvasculatura cerebral de ratón.

Fotomicrografías en contraste de fase, donde se muestra el crecimiento y evolución del cultivo. En el día 0 de cultivo se aislaron los microvasos, los cuales favorecieron el proceso de migración de células endoteliales, pericitos y otras células contaminantes (A). Al terminar el proceso de purificación, se evidenció el crecimiento de una única población de células con morfología ahusada y prolongaciones citoplasmáticas cortas (B). Pasado un mes de cultivo, se observó el crecimiento de una monocapa celular continua con células no sobrelapantes (C). Barra 20 μ m.

Sobre estos cultivos, se procedió a caracterizar la población o poblaciones presentes, evaluando la expresión de los marcadores Factor Von Willebrand (vWF) también conocido como Factor VIII y las TJPs ZO-1, Ocludina y Claudina 1 (Anexo 2). De este modo se observó que los cultivos obtenidos presentaron un 99% de pureza, evidenciado principalmente por la expresión de la proteína vWF a nivel citoplasmático (Figura 8A y B). Adicionalmente se observó la expresión de ZO-1 (Figura 8C y D), Claudina-1 (Figura 8E-F) y Ocludina (Figura 8G-H), las cuales presentaron un marcaje subcelular continuo que definió los límites de cada célula, además, debido a la alta concentración de suero (20%) utilizado en nuestros cultivos, se observó un marcaje citoplasmático difuso para Ocludina y ZO-1. La expresión y ubicación de las TJPs evaluadas, sugiere que las células endoteliales cultivadas formaron monocapas celulares íntegras y que tras el proceso de aislamiento y purificación se mantuvieron las características fenotípicas y morfológicas que permiten el correcto funcionamiento de barrera de estas células.

Los resultados anteriores, sugieren que el protocolo estandarizado para el aislamiento y obtención de células endoteliales cerebrovasculares a partir de ratones neonatos, permitió obtener cultivos con un alto porcentaje de pureza, que estableció uniones altamente estrechas entre las células (mediadas por las diferentes TJPs evaluadas), las cuales han sido reportadas previamente en cultivos provenientes de animales adultos (Wilhem et al, 2011).

6.1.2 Obtención y purificación del cultivo astrocitos cerebrales de ratones lactantes:

Para la obtención de astrocitos, se tomaron cerebros de ratones Balb/C de 7dpc (mínimo 3 cerebros), los cuales fueron procesados como se describió previamente en la metodología. Desde el inicio del cultivo hasta los 14 dps, se observó el crecimiento de subpoblaciones celulares con morfologías diferentes, lo que sugirió la presencia de células contaminantes como microglia y oligodendrocitos. Por lo anterior, fue necesario someter los cultivos a un proceso de purificación mecánica por agitación constante, que permitió eliminar gradualmente las células no astrocíticas. Al finalizar el proceso de purificación se observó el crecimiento de una población celular relativamente pequeña, con prolongaciones citoplasmáticas cortas (Figura 9A). La caracterización del cultivo de astrocitos se realizó evaluando la expresión del marcador GFAP (*Glial acidic fibrillary protein*), típicamente expresado en astrocitos maduros y reactivos, adicionalmente, debido a la naturaleza de nuestras muestras (cerebros de ratones neonatos), fue necesario implementar un marcador para astrocitos inmaduros, no reactivos, como el marcador del transportador de glutamato GLT-1.

Al evaluar la madurez de estas células, se encontró un porcentaje mayor de células inmaduras GLT-1+, por lo tanto, se decidió mantener las células en cultivo durante 8 días más de lo especificado en el protocolo de Skaper et al, 2012, lo que permitió obtener un mayor número de astrocitos GFAP+, con una morfología estrellada (típica de este tipo de células) y con un mayor número de prolongaciones citoplasmáticas de mayor longitud (Figura 9B y 9C).

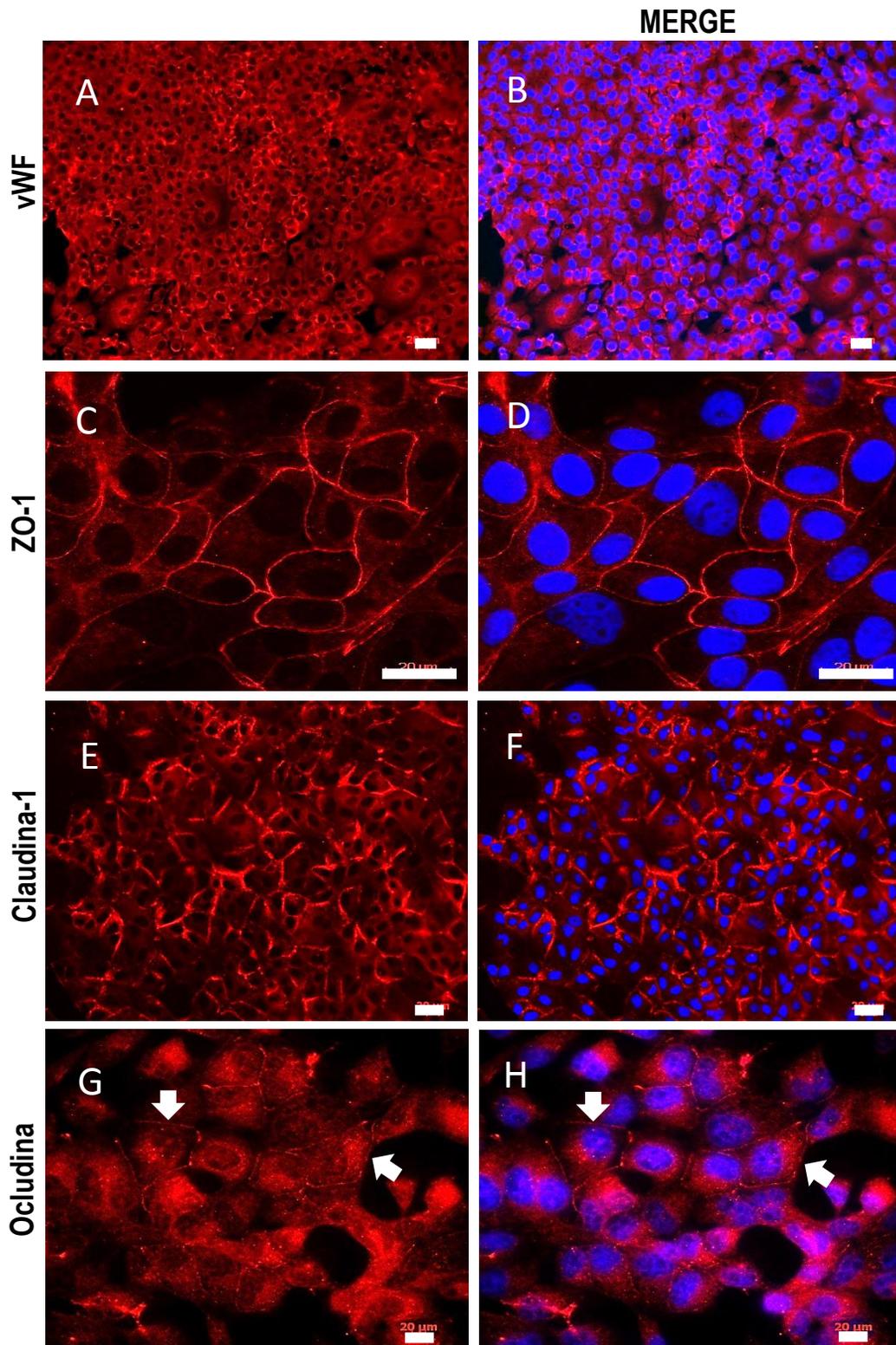


Figura 8. Caracterización inmunocitoquímica de las células endoteliales cerebrovasculares.

Se muestra la localización citoplasmática de la proteína vWF (A-B) y de membrana (flechas) de ZO-1 (C-D), Claudina 1 (E-F) y Occludina (G-H) (rojo), núcleos en azul. Barra 20 μm.

De esta manera se observó en el tiempo 0 del cultivo (células recién aisladas, no purificadas), una gran cantidad de astrocitos GFAP negativos (GFAP-) pero GLT-1 positivos (GLT-1+) (Figura 10 A-C). Sin embargo, a los 8 días post-purificación del cultivo, fue evidente el aumento en el número de células GFAP+ (Figura 10 D-F), lo cual indicó que la modificación hecha al protocolo base, favoreció el proceso de maduración celular de los astrocitos cultivados (Figura 10 H-J).

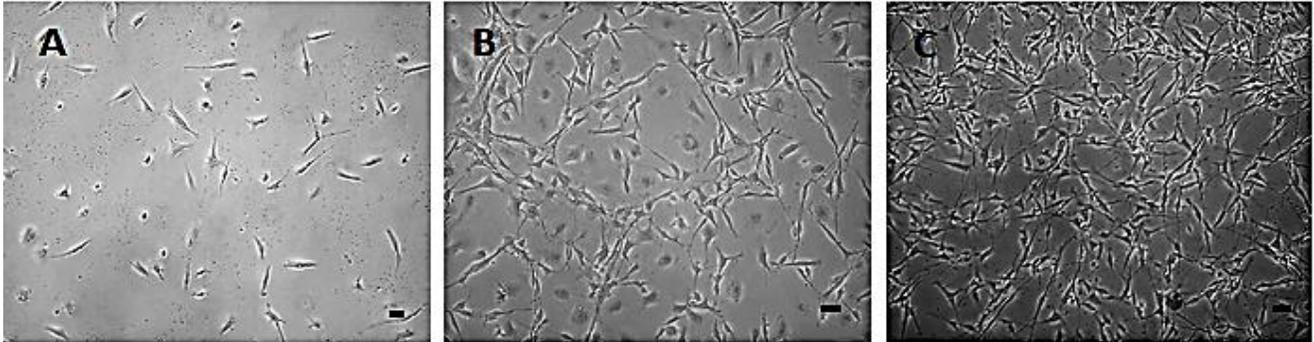


Figura 929. Evolución del cultivo de astrocitos luego del proceso de purificación.

Micrografías en contraste de fase donde se muestra el crecimiento del cultivo a los 2 (A), 5 (B) y 8 días post-purificación (C). Se observa que durante el transcurso del cultivo purificado, las células adquirieron un fenotipo estrellado, con prolongaciones citoplasmáticas largas, típicas de astrocitos maduros. Barra 20 μ m.

Al cuantificar la población de células GFAP+, se observó un 95% de pureza en nuestros cultivos, conformados por astrocitos maduros con una morfología poligonal o estrellada, con largas y numerosas prolongaciones citoplasmáticas y núcleos pequeños y centrales. La distribución subcelular de GFAP se asoció a paquetes de fibras (filamentos intermedios) presentes a lo largo de las prolongaciones citoplasmáticas y en el citoplasma, siendo diferente a la localización subcelular observada para GLT-1 (Figura 10 H-J).

Estos resultados permiten sugerir entonces, que el protocolo estandarizado permitió obtener cultivos de astrocitos con un alto grado de pureza, los cuales durante el transcurso del cultivo iniciaron un proceso de maduración evidenciado por la expresión de GFAP. Estas características han sido descritas en ensayos *in vivo* en animales adultos e *in vitro* en cultivos primarios provenientes de animales adultos o en líneas celulares tras un proceso de activación astrocítica (astrogliosis), lo que permite pensar que los astrocitos cultivados podrían ser capaces de cumplir con las funciones de inducción y mantenimiento de las características de las células endoteliales en un modelo de BHE *in vitro* (Wilhem et al. 2011).

6.2 Susceptibilidad a la infección por DENV en los cultivos purificados de endotelio y astrocitos.

Después de caracterizar los cultivos, se evaluó la susceptibilidad de los mismos a la infección con el virus DENV-4 parental o neuroadaptado (D4MB-6). Para ello se infectaron entre 8.000 y 10.000 células con una MOI 1, por 24 o 48 h. De esta forma se encontró que los astrocitos fueron refractarios a la infección con ambos virus y tiempos p.i., evaluados (Figura 11). Por el contrario, al evaluar la susceptibilidad a la infección en las células endoteliales de la microvasculatura cerebral de ratón neonato, se observó que éstas células, fueron susceptibles a la infección con ambos virus, en los tiempos post infección (p.i) evaluados. Sin embargo hubo algunas diferencias: en un promedio de 7599 células totales, se evidenció que

las células endoteliales presentaron a las 24 hpi un 7% de infección (aproximadamente) con el virus parental, con un incremento del 11% de células infectadas a las 48 hpi. Por otro lado, al evaluar el porcentaje de infección con el D4MB-6, se encontró un 12% de células infectadas a las 24 hpi, con un aumento significativo en el número de células infectadas a las 48 hpi que correspondió al 49% ($p < 0.05$).

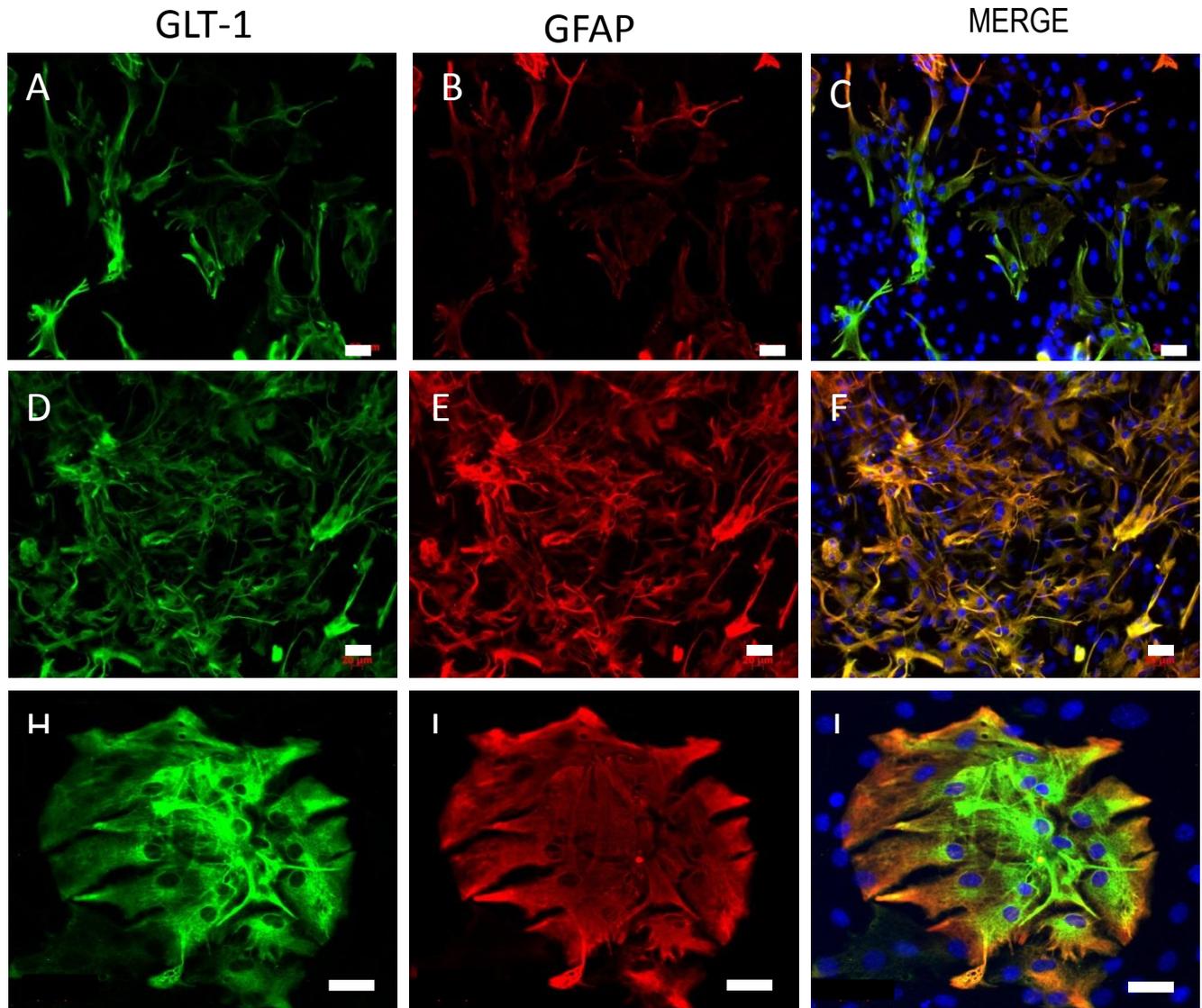


Figura 10. Caracterización inmunocitoquímica de astrocitos.

Co-localización en astrocitos de la proteína GFAP (rojo) y GLT-1 (verde), en diferentes momentos del cultivo. En el tiempo 0 de cultivo (células recién aisladas), se observó un mayor número de células GLT-1+ respecto a aquellas células GFAP+ (A-C). Al tercer día post-purificación, fue evidente el enriquecimiento y maduración del cultivo al observar un mayor número de astrocitos GFAP+ (D-F). A los 8 post-purificación, se observó claramente el enriquecimiento del cultivo y la distribución de los diferentes marcadores GFAP y GLT-1 en cada una de las células (H-J). Barra de 20 μ m.

Adicionalmente, al comparar los porcentajes de infección entre ambos virus, se observó únicamente a las 48 hpi, una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el porcentaje de células infectadas con el virus parental y el D4MB-6 (Figura 12).

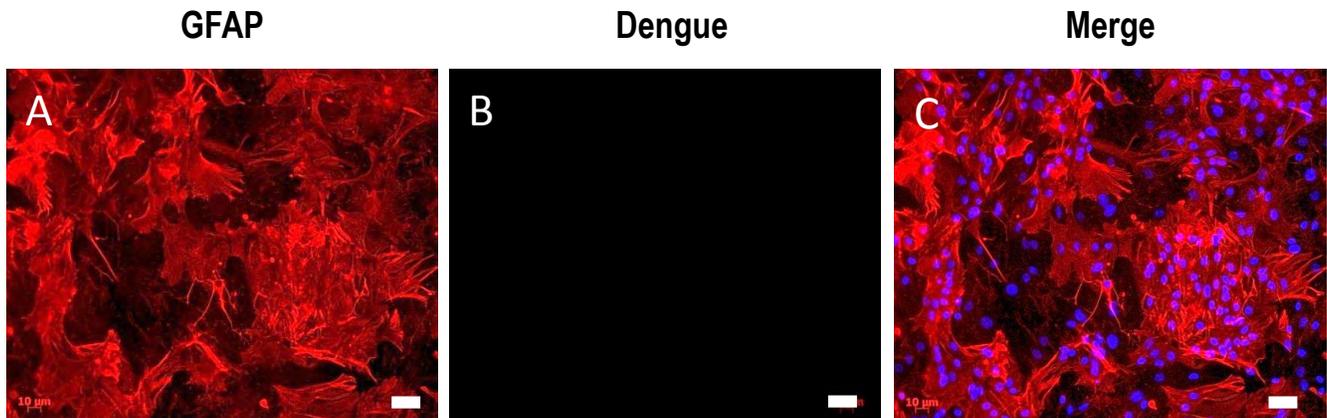


Figura 11. Inmunodetección para antígeno viral en astrocitos, a las 48 hpi.
 Fotomicrografía de astrocitos procesados para identificar la proteína con GFAP (rojo) y antígeno viral (Dengue). No se observaron células GFAP+ infectadas (B), lo que indica que estas células fueron refractarias a la infección. Barra de 20μm.

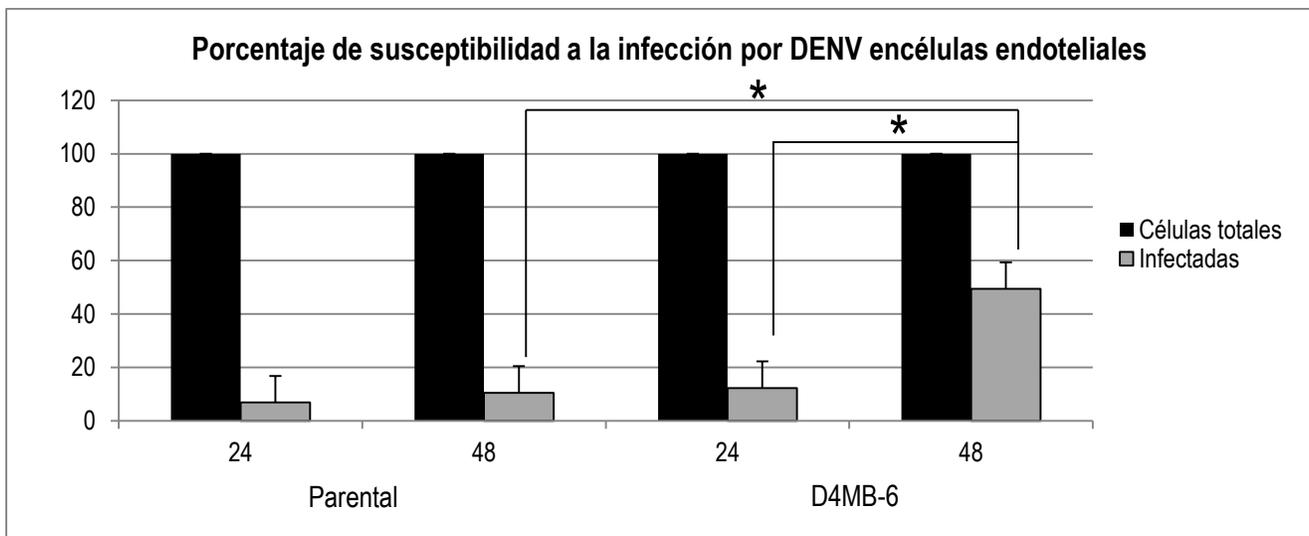


Figura 12. Susceptibilidad de células endoteliales a la infección por DENV adaptado o no a 24 o 48 hpi.
 Se contaron las células totales y las células endoteliales infectadas de 3 experimentos independientes, se observaron diferencias estadísticamente significativas (*) con un $p < 0.05$ de acuerdo a lo obtenido con la prueba *t-student* en las células infectadas con el D4MB-6 a las 24 y 48 hpi y entre el porcentaje de células infectadas con ambos virus a las 48 hpi

Sobre las células infectadas se evaluó la expresión y distribución de las TJP, comparadas con la expresión de las mismas proteínas en las células control, en estas últimas se encontró que tanto las células no infectadas (CSV), como en las células inoculadas con el Mock (homogenizado de cerebro no infectado), la distribución de la proteína ZO-1 fue continua y delimitó a cada una de las células del cultivo (Figura 13 A-C). Debido a que no hubo diferencias entre los cultivos no infectados o inoculados con el mock, en adelante se presentarán como controles únicamente células inoculadas con el Mock.

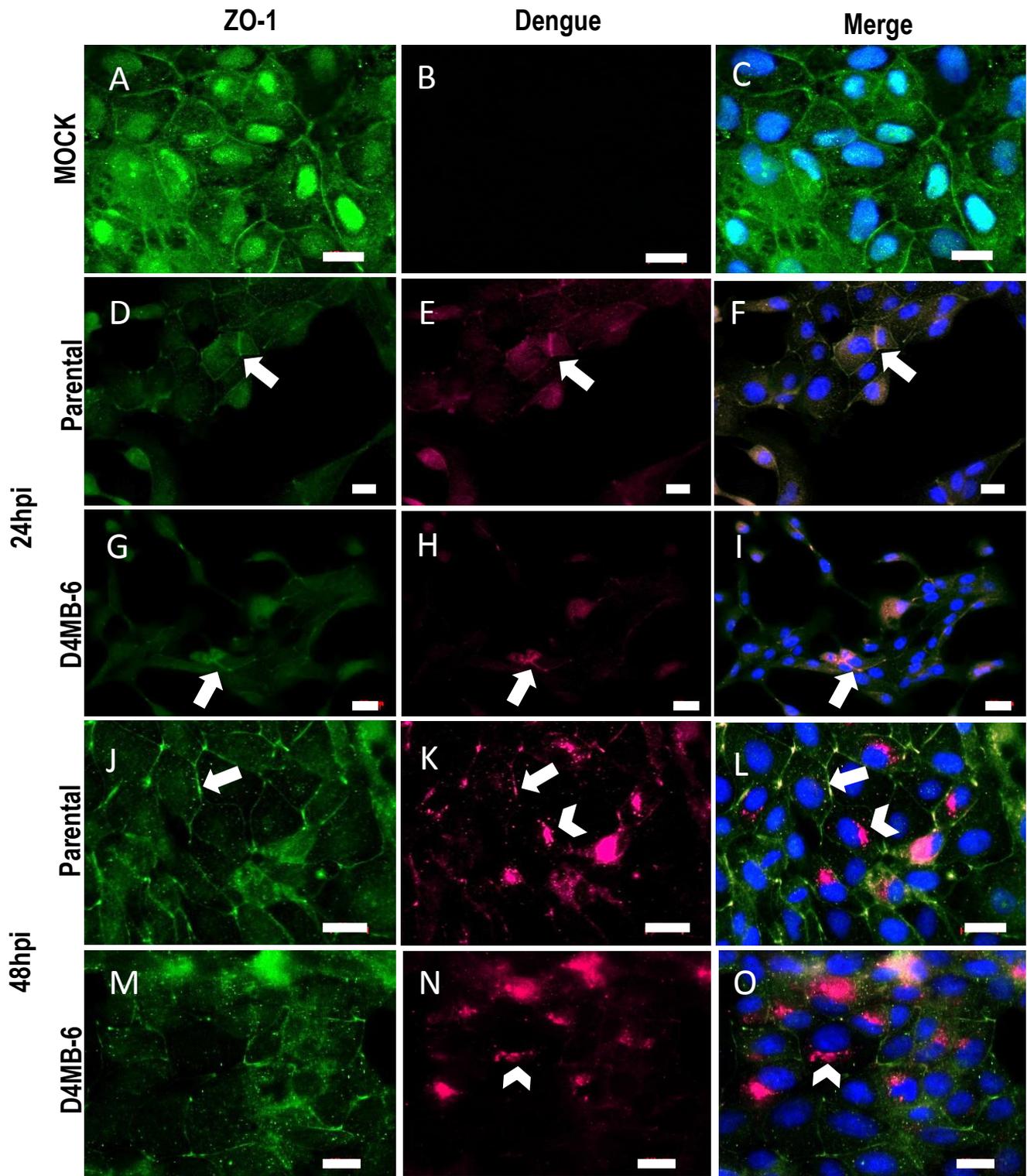


Figura 13. Inmunofluorescencia para ZO-1 y antígeno viral en células endoteliales infectadas.

Se muestra la localización subcelular de ZO-1 (verde) en células inoculadas con el Mock (A-C) e infectadas con cada uno de los virus a las 24 y 48hpi. Se identificó el antígeno viral (rosado), distribuido en el citoplasma de las células a las 24 hpi (D-F, G-I) y en la región perinuclear a las 48 hpi con ambos virus. Las flechas indican la co-localización entre el antígeno viral y la proteína ZO-1, las cabezas de flecha indican la localización perinuclear del virus, en azul se muestran los núcleos. Barra de 20µm.

Al evaluar la distribución subcelular de la proteína ZO-1, no se encontraron cambios en la distribución de esta proteína en las células endoteliales infectadas con el virus parental, comparadas con el Mock, sin embargo en éstas células se observó la co-localización entre ZO-1 y el antígeno viral en el citoplasma en ambos tiempos p.i, evaluados (Figura 13 D-I) y a las 24hpi con el D4MB-6 (Figura 13 J-L). Por otro lado a las 48hpi, se observaron agregados proteicos de ZO-1 a nivel citoplasmático en las células infectadas con D4MB-6 (estrellas, Figura 13 M-O); también hace evidente las diferencias en la distribución subcelular del antígeno viral, entre los tiempos p.i evaluados, observando una distribución citoplasmática a las 24 hpi (Figura 13 D-F, J-L), y perinuclear a las 48 hpi, en las células infectadas cada uno de los virus (Figura 13 G-I, M-O).

Una vez caracterizada y evaluada la susceptibilidad a la infección con los dos virus y en los dos cultivos celulares, se procedió a establecer el modelo de BHE en monocapa y co-cultivo.

6.3 Modelo de BHE en monocapa

Para determinar, si la infección con el virus parental o con el D4MB-6 alteró la integridad y funcionalidad de la barrera endotelial, se estableció inicialmente el modelo de BHE en monocapa. Para esto, se sembraron 15.000 células endoteliales en la cara luminal de la membrana de policarbonato de los insertos transwell® con poros de 0,4 μm , las cuales fueron mantenidas por 14 días en cultivo y diariamente se evaluó la TEER (Figura 14), con el fin de determinar la dinámica de ésta en nuestro modelo.

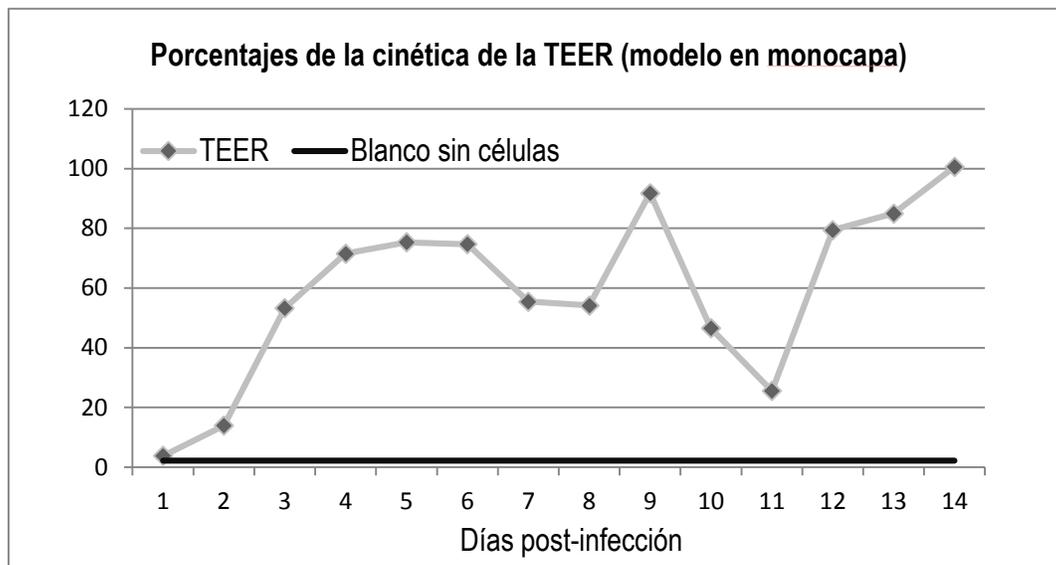


Figura 14. Dinámica de la TEER en el modelo de BHE en monocapa.

Se muestra la evolución de la TEER del cultivo de endotelio sobre los insertos transwell® medidos diariamente durante 14 días, comparados con la TEER de una membrana sin células. Los resultados son el promedio de 3 insertos diferentes de 2 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos sugieren que en los cuatro primeros días, la TEER aumentó progresivamente alcanzando un 75% de resistencia, que correspondió a 1K Ω . Esta TEER se mantuvo sin cambios aparentes entre el 4 y 6 dps, mientras que al 7

y 8 dps, se observó una disminución de TEER, debida posiblemente a un proceso de recambio celular. A partir de este tiempo, se observaron fluctuaciones en los valores de TEER, encontrando al 8vo y 9no día un aumento del 23% de TEER, mientras que en los días 10 y 11 hubo una disminución (32% TEER), para luego observar un aumento entre el día 11 hasta el día 14 (último día del experimento). Esto sugiere que las células endoteliales en los transwells, poseen una dinámica normal asociada al crecimiento y establecimiento de la monocapa, para posteriormente dar espacio a un proceso de senescencia y desprendimiento de las células en cultivo.

De acuerdo a estos resultados, se decidió sembrar y mantener las células endoteliales sobre los insertos durante 4 días, antes de iniciar los experimentos de infección, para así garantizar que los cambios en la TEER, fuesen debidos a la infección con los virus y no a otros factores. Por lo anterior, para todos los experimentos sobre transwell, se tomó la TEER alcanzada en el día 4 de cultivo como el 100% de la resistencia del modelo.

Adicionalmente en este mismo tiempo, se realizaron ensayos de permeabilidad con el colorante azul dextrán como se describió en la metodología. Los resultados mostraron que entre el 4to y 6to dps, la concentración de azul dextrán en los sobrenadantes de la cámara inferior de los insertos fue menor a $1\mu\text{g/ml}$, lo que concuerda con los altos valores de TEER observados en estos tiempos.

6.4 Modelo de BHE en co-cultivo

Después de establecer el modelo en monocapa y conocer la dinámica del cultivo medido por los cambios en la TEER, se procedió a establecer el modelo en co-cultivo. Teniendo en cuenta que en este modelo se debía promover el contacto entre las células endoteliales y los astrocitos, se utilizaron insertos transwell® con poros de $3,0\ \mu\text{m}$. Para este proceso, los insertos fueron invertidos para sembrar los astrocitos y mantenidos en esta posición durante 3 días para permitir la correcta adhesión y distribución homogénea de estas células sobre la membrana (Figura 6A) y así favorecer el acceso de los pies astrocíticos hacia la cara luminal del inserto (Figura 15). Al cabo del tiempo, los insertos fueron puestos en placas de 24 pozos (Figura 6C) e inmediatamente se sembraron sobre la cara luminal 30.000 células endoteliales, las cuales fueron mantenidas por cuatro días más tal como describió en la metodología. Durante el proceso de estandarización del modelo en co-cultivo, no se observaron diferencias en la cinética de la TEER, comparado con lo obtenido en el modelo en monocapa, por lo tanto, se mantuvieron las condiciones y los tiempos de cultivo definidos previamente.

Los resultados anteriores permiten concluir que los modelos de BHE en monocapa y co-cultivo estandarizados son funcionales (altos valores de TEER y baja permeabilidad) y reproducibles. Con estos modelos estandarizados, iniciamos el desarrollo del segundo objetivo específico, que consistió en determinar los daños en la integridad de la barrera inducidos por la infección con el virus dengue neuroadaptado o no.

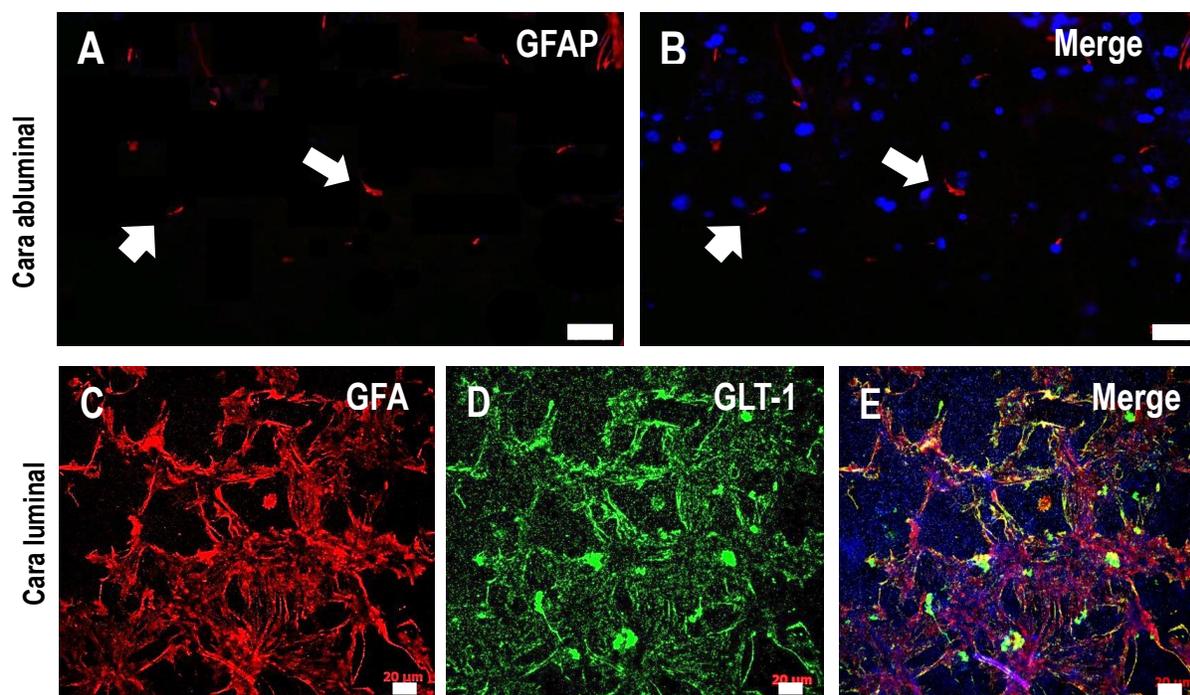


Figura 15. Inmunodetección para GFAP en la cara luminal y abluminal de los insertos transwell®.

Se observó la inclusión de las prolongaciones citoplasmáticas de los astrocitos (flechas) desde el lado abluminal hacia la cara luminal de la membrana de los insertos (A-B). Barra de 10μm. Por su parte, en la cara abluminal de la membrana se detectaron astrocitos positivos para GFAP (rojo) y GLT-1 (verde), de diferentes tamaños y formas que recubrieron el 90% de la membrana de los insertos. Núcleos en azul (C-E). Barra 20μm.

6.5 Evaluación de los daños asociados a la infección por DENV neuroadaptado o no

Durante la infección con el DENV, se ha reportado la alteración endotelial en varios órganos y cavidades, incluido el tejido nervioso, lo que desencadena un proceso de extravasación plasmática, sugiriendo que el virus puede inducir algunas alteraciones en la permeabilidad de la BHE, afectando el funcionamiento del tejido nervioso.

Para estudiar lo anterior, se tomaron los modelos de BHE estandarizados y al 4to dps, las células endoteliales fueron infectadas con cada uno de los virus a una MOI de 1, evaluando los cambios en la TEER y en la permeabilidad de los modelos (como un indicativo del deterioro en la integridad de los mismos), cada 2 h (en las primeras 12 hpi) y a las 24 y 48 hpi. Para esto, se evaluaron 2 experimentos independientes para ambos virus, con 3 réplicas para el control y 6 para la infección con cada virus. Adicionalmente se evaluó un control positivo de caída de TEER utilizando EDTA (10mM), en el que se evidenció la caída de TEER a partir de las 6 horas de tratamiento sin el restablecimiento de la misma en el transcurso del tiempo (Figuras 16 y 19).

6.5.1 Modelo de BHE en monocapa

Durante las primeras 8 hpi se observó un aumento en la TEER en todas las condiciones evaluadas, que correspondió 1.800Ω equivalente al 180% de la resistencia (Figura 16). A partir de las 10 hpi se observó una disminución en la TEER de

aproximadamente un 25% en las células infectadas con cada uno de los virus, que se mantuvo hasta las 48 hpi, que correspondió a 75% equivalentes a 800Ω (Figura 16), esta disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$ Kruskal-Wallis y Bonferroni) comparado con los valores obtenidos en las células inoculadas con el Mock donde se encontró que la TEER aumentó a un 200%.

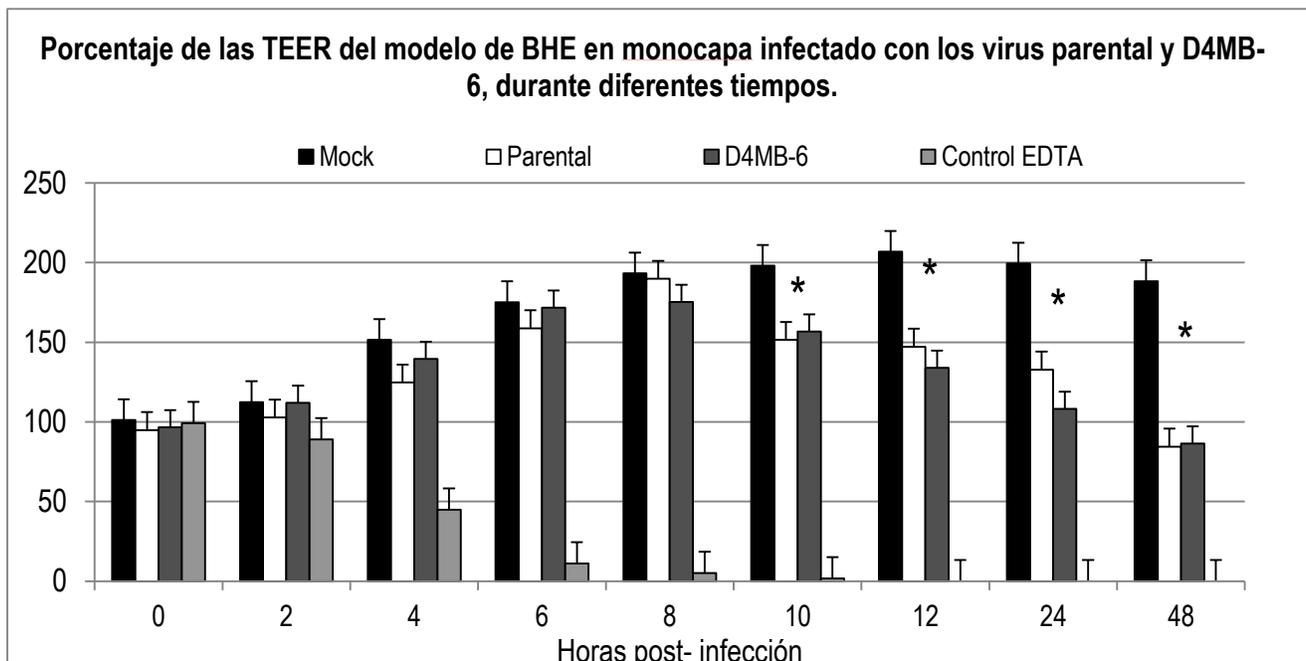


Figura 16. Modelo de BHE en monocapa. Porcentajes de TEER en células endoteliales infectadas con el virus dengue parental o neuroadaptado a diferentes tiempos p.i.

A los 4 días post-siembra se infectaron las células con los virus parental o D4MB-6 y se evaluó la TEER cada 2 h durante las primeras 12 hpi y a las 24 y 48 hpi. Se observó a partir de las 10 hpi, diferencias estadísticamente significativas (*) con un valor $p < 0.05$ (Bonferroni), entre los valores de TEER de las células infectadas respecto al Mock. Los datos son el porcentaje promedio de la TEER de 3 pozos para los controles y 6 para los infectados.

Como era de esperarse, la disminución en la TEER a las 10 hpi, ocasionó un cambio estadísticamente significativo en la permeabilidad de las monocapas infectadas con ambos virus ($p < 0.05$ Kruskal-Wallis y Bonferroni), asociado a un aumento en la concentración de Azul Dextrán en medio de cultivo presente en la cámara inferior de los insertos transwells. Este aumento, correspondió a un 20% (36.65µg/mL) para las células infectadas con el virus parental y del 18% (29.84µg/mL) para las células infectadas con el D4MB-6, el cual se mantuvo hasta las 48 hpi, encontrado para este tiempo un 55% más de Azul dextran (54.91µg/ml) en los sobrenadantes de las células infectadas con el virus parental y del 60% (110,97µg/ml) para las infectadas con el virus D4MB-6, sin detectar cambios significativos en las células inoculadas con el Mock (Figura 17). Estos resultados sugieren entonces, que tanto el virus neuroadaptado como el parental pueden alterar la fisiología de las células endoteliales y por ende la fisiología de la BHE.

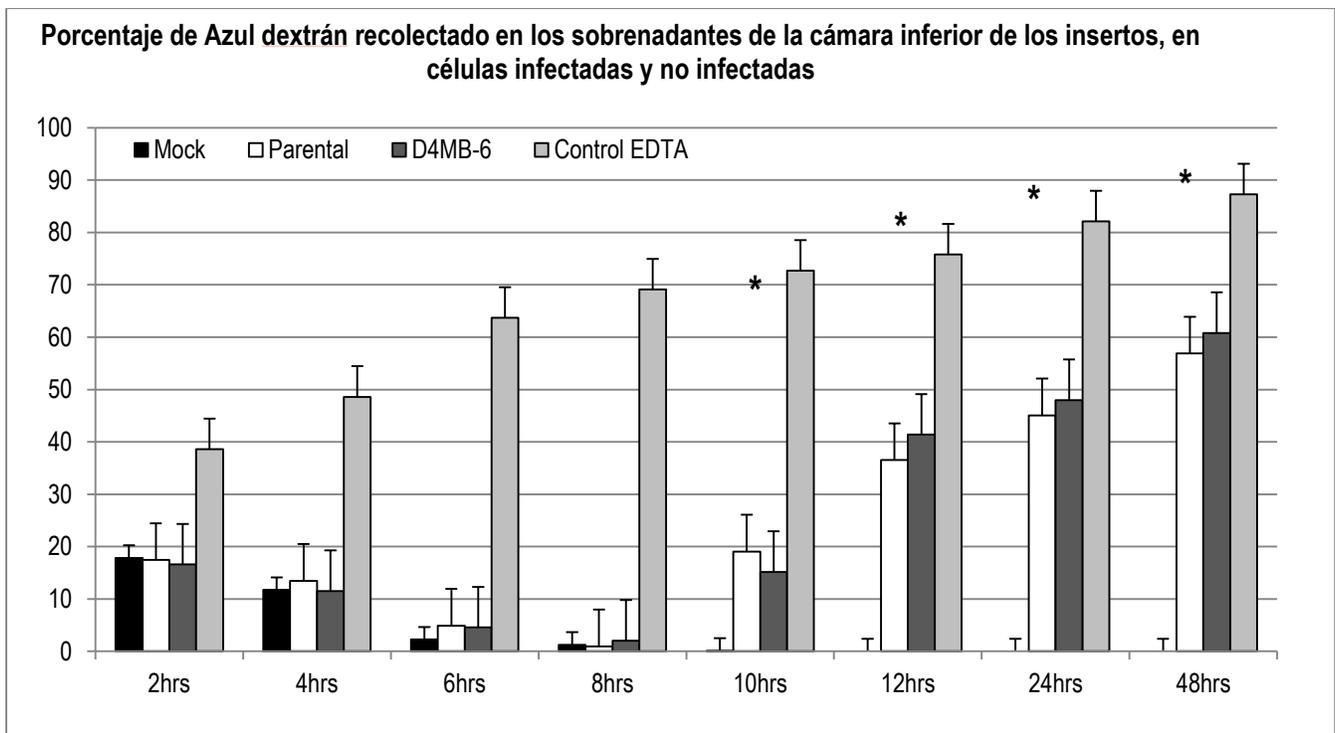


Figura 17. Modelo de BHE en monocapa. Porcentaje de azul dextrán presente en los sobrenadantes de la cámara inferior de los insertos en células endoteliales infectadas con el virus dengue parental o neuroadaptado a diferentes tiempos p.i.

Se evaluó la infiltración de azul dextrán en la cámara inferior de los insertos transwells®, tras la infección con cada uno de los virus. Se observó un aumento significativo (*) con un valor de $p < 0.05$ según la prueba de Bonferroni, en la concentración de azul dextrán a partir de las 10 hpi comparado con lo obtenido con el Mock. Los resultados son el promedio de 26 pozos.

Adicionalmente, para determinar los daños asociados a la infección sobre la monocapa, se evaluó la expresión y localización subcelular de la TJP ZO-1 por inmunofluorescencia (Figura 18). De esta forma se observó en los controles, la expresión intensa de ZO-1, delimitando (de forma continua) cada una de las células del cultivo (Figura 18 A-C). Desde las 24 hpi se evidenció la relocalización de esta proteína en las células infectadas con el virus parental y con el D4MB-6 (Figura 18 D-F, G-I). Así mismo, en este tiempo se evidenció la localización de ZO-1 en el citoplasma celular de la mayoría de las células infectadas con el virus parental (Figura 18 D-O), mientras que las células infectadas con el D4MB-6 presentaron un mayor número de células que expresaron ZO-1 en la membrana de modo similar al control (Figura 18 G-I). Entre tanto, a las 48 hpi se observaron agrupaciones celulares en las monocapas infectadas con el virus D4MB-6, evidenciándose espacios vacíos en la membrana, que pueden deberse al desprendimiento de las células o a un proceso de muerte celular que pudo ser consecuencia de la infección con el virus D4MB-6 (Figura 18 M-O).

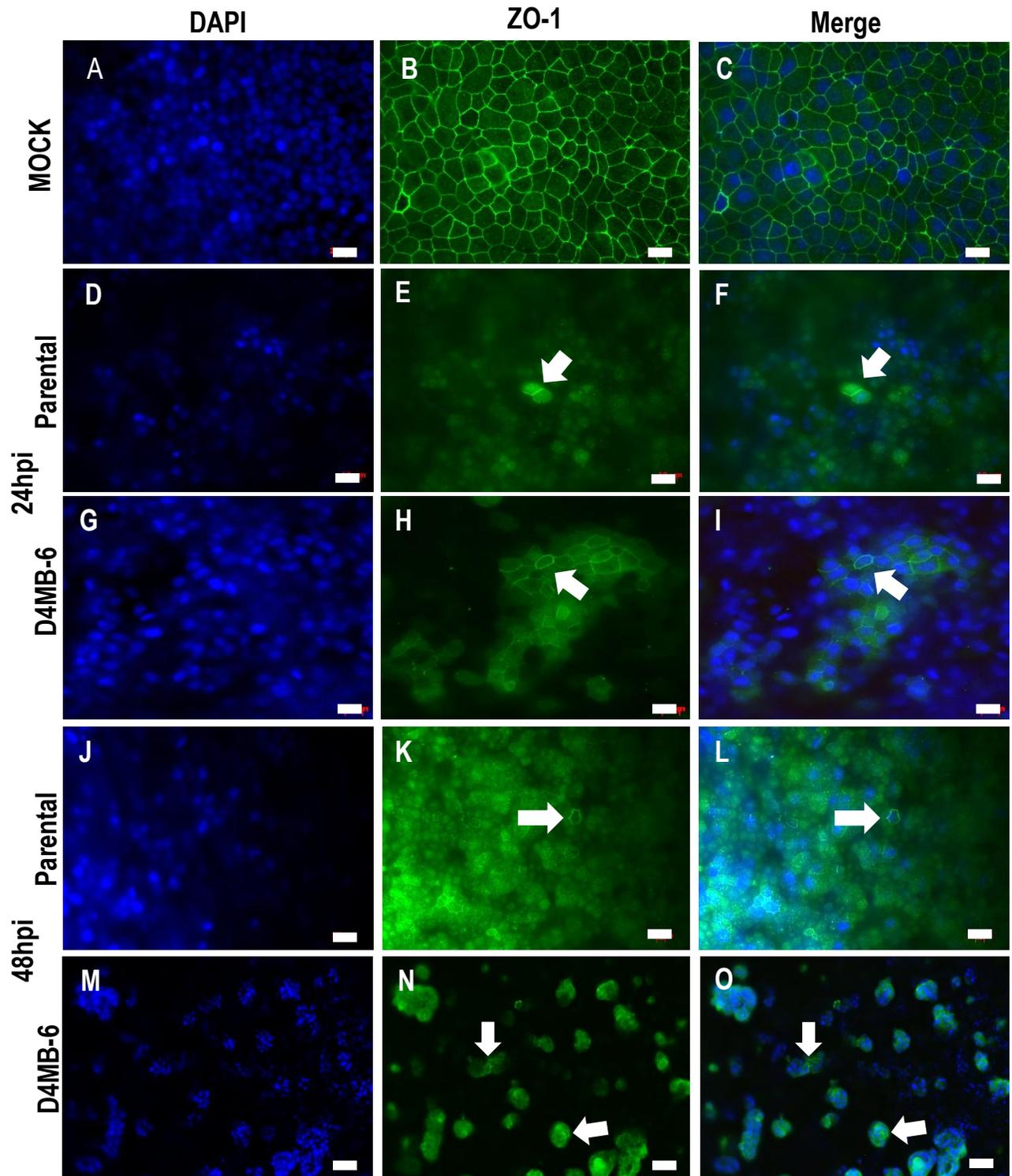


Figura 18. Modelo de BHE en monocapa. Inmunodetección de ZO-1 en células endoteliales infectadas con el virus dengue parental o neuroadaptado a diferentes tiempos p.i.

Se observó en las células inoculadas con el Mock, la distribución periférica de la TJP ZO-1 (verde) asociada a la membrana (A-C). Tras la infección, se observaron cambios en la localización de ZO-1 (flechas) en las células infectadas con ambos virus. Sin embargo, fue más evidente el daño en la integridad de la monocapa en las células infectadas con el D4MB-6 a las 48 hpi, observándose principalmente agrupaciones celulares y espacios vacíos sobre la membrana (M-O). Se muestran núcleos en azul. Barra de 20 μ m.

6.5.2 Modelo de BHE en Co-cultivo

En este modelo se encontró, durante las primeras 8 hpi un aumento en la TEER en todas las condiciones evaluadas, alcanzando una TEER superior al 200% (2,14 K Ω). De manera, de modo similar a lo observado en el modelo de monocapa, se encontró a las 10 hpi una disminución significativa en la TEER de los co-cultivos infectados con cada uno de los virus (Kruskall-Wallis, Bonferroni $p < 0.05$) comparados con el control (Mock) y de igual manera que en el modelo anterior, a partir de este momento y hasta las 48 hpi, la TEER disminuyó de forma gradual alcanzando un 25% menos de resistencia en las células infectadas (Figura 19).

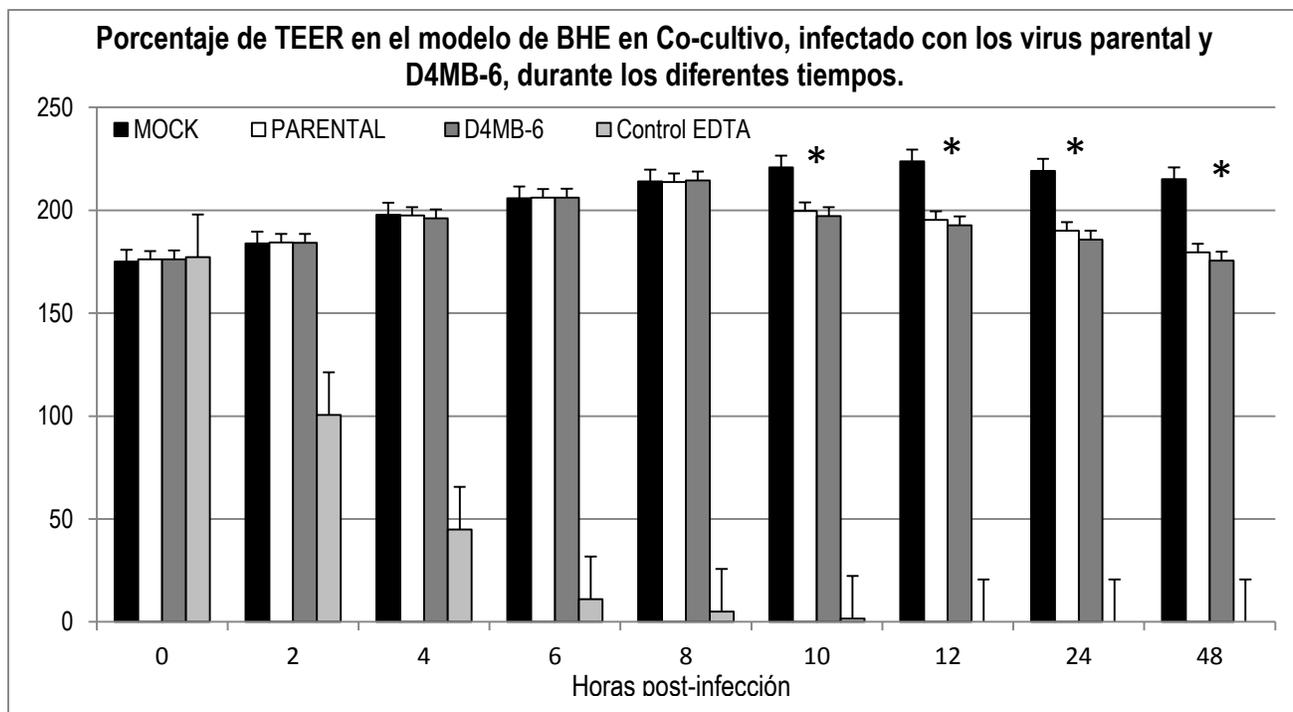


Figura 1930 Modelo de BHE en co-cultivo. Porcentajes de TEER en co-cultivos infectados con el virus parental o neuroadaptado a diferentes tiempos p.i.

A los 4 días post-siembr se infectaron las células con los diferentes virus y se evaluaron los cambios en los valores de TEER durante 48hpi, comparados con el Mock. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Bonferroni (*) en los valores de TEER de las células infectadas con ambos virus a partir de las 10 hpi. Los resultados son el promedio de 26 pozos.

Paralelo a estos ensayos, se evaluó los daños en la permeabilidad asociados a la infección en el modelo en co-cultivo. Para esto se midió –y de igual manera que en el modelo de monocapa–, la concentración de Azul Dextrán en la cámara inferior de los insertos. De este modo se encontró, que la concentración del colorante disminuyó en los primeras horas p.i., y fue indetectable a las 8 hpi (Figura 20). Por el contrario, a las 10 hpi se observó un aumento en la permeabilidad del 0,43% (0,83 μ g/mL) en los co-cultivos infectados con virus parental y de 0,58% (0,925 μ g/mL) con el D4MB-6. Este aumento fue gradual en el tiempo p.i., hasta alcanzar a las a 48 hpi un máximo de 0,78% (0,97 μ g/mL) en las células infectadas con el virus parental y del 0,88% (1.03 μ g/mL) con el D4MB-6, siendo estos últimos co-cultivos infectados, los que presentaron

mayores cambios en la permeabilidad (Figura 20), sin detectar diferencias estadísticamente significativas en los co-cultivos inoculados con el Mock.

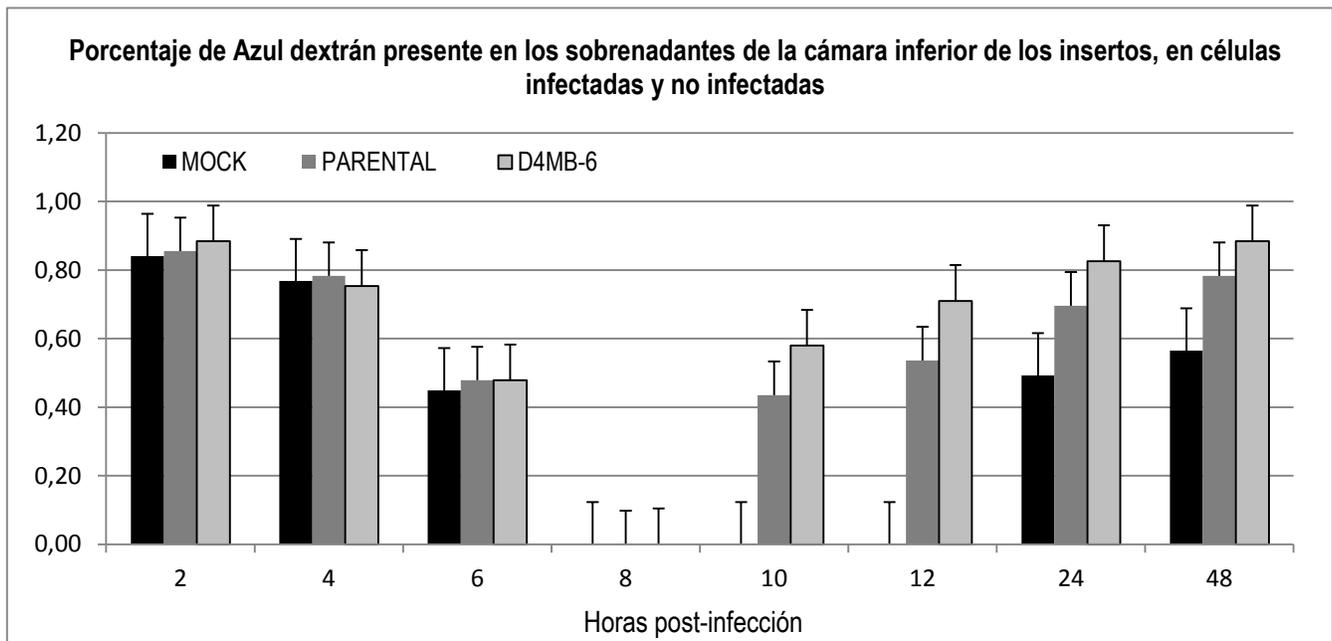


Figura 20. Modelo de BHE en co-cultivo. Porcentaje de Azul dextrán presente en los sobrenadantes de la cámara inferior de los insertos, en células infectadas y no infectadas a diferentes tiempos p.i.

Se evaluó la concentración de azul dextrán en la cámara inferior de los insertos transwells®, tras la infección con ambos virus, observándose únicamente en las células infectadas, un aumento en la concentración azul dextrán a partir de las 10 hpi hasta las 48 hpi. Los resultados son el promedio de 26 pozos.

Los resultados anteriores sugieren que la disminución de los valores de TEER observados en el modelo de co-cultivo tras la infección con cada virus, no parece ser suficiente para ocasionar un aumento significativo en los valores de azul dextrán en los pozos inferiores de los insertos, lo cual difiere de lo observado en el modelo de BHE en monocapa. Estos resultados, sugieren que la infección con el virus dengue parental o D4MB-6, inducen alteraciones significativas en la TEER del modelo de BHE en cocultivo, sin embargo esta alteración no fue suficiente para inducir cambios significativos en la permeabilidad del mismo.

Al evaluar a las 24 y 48 hpi la distribución de los astrocitos y los daños en la monocapa de células endoteliales, se observó en la cara abluminal una monocapa regular de astrocitos positivos para GFAP y GLT-1, con diferentes tamaños y formas que recubrieron aproximadamente el 90% del área total de la membrana, sin presentar agregados, lo que confirma la madurez de los astrocitos utilizados en nuestro modelo (Figura 15 C-E).

Por su parte, al evaluar a las 48 hps la localización subcelular de las proteínas Claudina 1 y ZO-1 en las células endoteliales del co-cultivo, se observó un marcaje intenso que bordeó de manera continua las membranas de las células adyacentes (Figura 21 C y D). Por el contrario, las células infectadas con el virus parental, presentaron algunos cambios en la distribución de Claudina 1, por ejemplo en algunas células fue evidente la presencia de agregados citoplasmáticos

intensamente marcados, mientras que en otras se observó un marcaje marginal similar al control, aunque con una menor intensidad de fluorescencia (Figura 21 E-F). Por su parte, la infección con el virus D4MB-6, indujo en la mayoría de las células, la formación de agregados citoplasmáticos y perinucleares de la proteína, intensamente marcados (Figura 21 G-H, cabezas de flecha) y un marcaje discontinuo sobre la membrana plasmática (Figura 21 G-H) de las células.

Para ZO-1, en las células tratadas con el Mock (Figura 22 C-D), se observó el marcaje peri-membranal característico en estas células, sin detectar marcaje en el citoplasma (Figura 22). En las células infectadas con el virus parental, se observó que la infección indujo cambios en la localización de ZO-1, observándose una localización citoplasmática asociada a agregados de la proteína intensamente marcados, además de la localización membranal de la proteína (Figura 22 E-F). Por su parte, la mayoría de las células infectadas con el virus D4MB-6 mostrarán el marcaje típico de ZO-1 (perimembranal), aunque algunas células, presentaron un marcaje citoplasmático de baja intensidad de fluorescencia (Figura 22 G-H). Adicionalmente se observaron en estos co-cultivos, espacios sin células que pueden ser debidos a la pérdida de las células asociado a la infección o a un proceso de desprendimiento celular que sucede normalmente en este tiempo post-infección. Estos resultados sugieren que la infección con ambos virus induce cambios en la distribución de las TJP Claudina 1 y ZO-1, los cuales podrían explicar la pérdida de TEER y el aumento en la permeabilidad del modelo de BHE en co-cultivo.

6.6 Detección de partículas virales en los sobrenadantes de las cámaras superior e inferior de los insertos en el modelo de Co-cultivo

Para detectar si la disminución en los valores de TEER y los cambios en la distribución de las TJPs evaluadas favorecía la transmigración de partículas virales en el modelo de co-cultivo, se plaquearon los sobrenadantes de cada cámara (superior e inferior) como se describió en la metodología. En los sobrenadantes de la cámara inferior se detectaron partículas virales desde las 10hpi (momento en que decae la TEER y aumenta la permeabilidad del modelo) hasta las 48hpi, con cada uno de los virus evaluados, adicionalmente se observó un leve aumento en el valor de los títulos virales para ambos virus a partir de las 24hpi (Tabla 1 y 2). Estos resultados sugieren que las partículas virales libres pueden cruzar el modelo de BHE sin estar asociadas a células (de forma paracelular) y este resultado puede estar asociado a la disminución de la TEER inducida por la reacomodación de las TJPs.

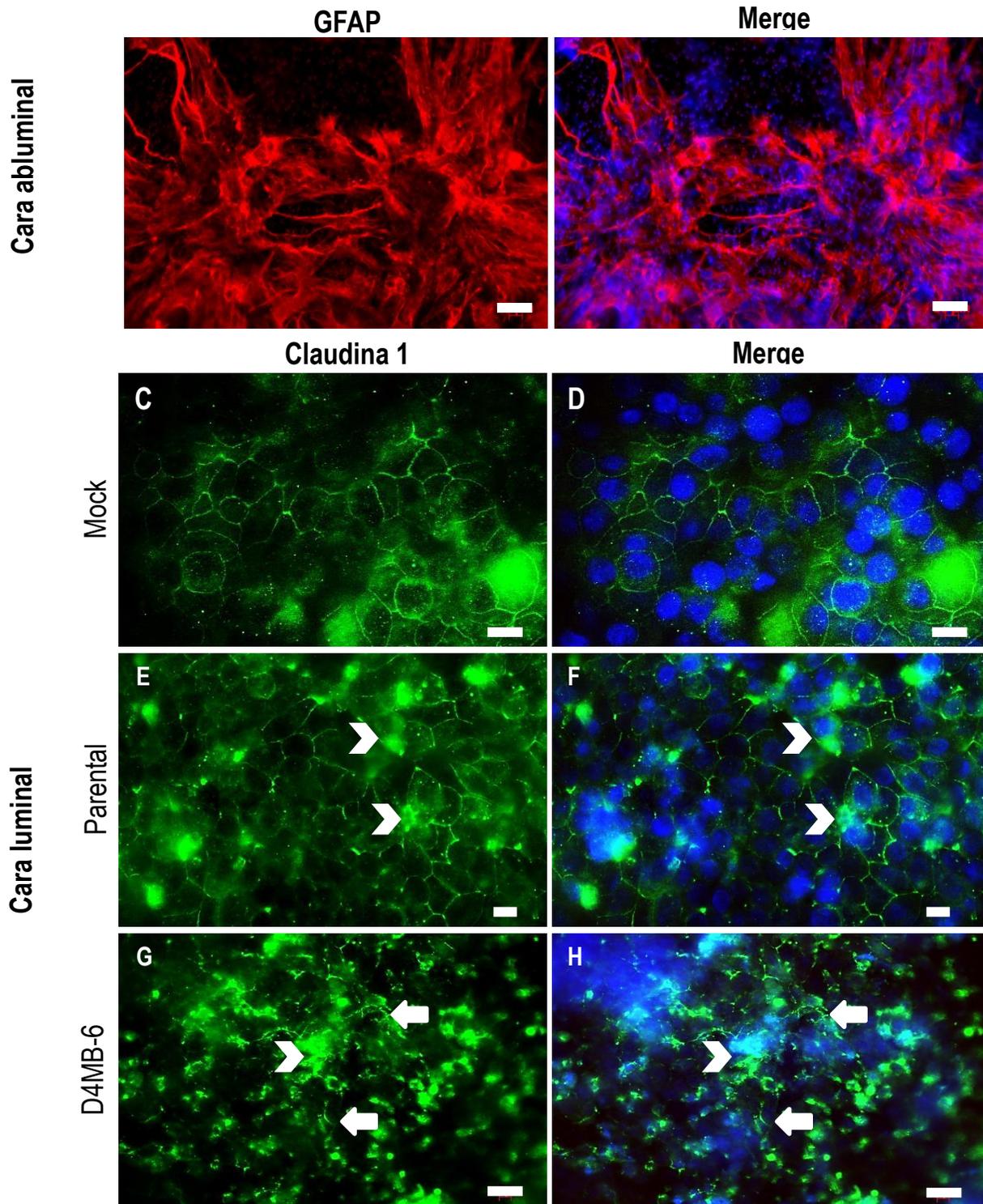


Figura 21. Modelo de BHE en Co-cultivo. Inmunodetección para Claudina 1, en co-cultivos infectados con el virus parental o neuroadaptado a 48 hps y p.i.

Se muestran los astrocitos sembrados en la cara abluminal de los insertos marcados con GFAP (A-B), Barra 10um. Por su parte en las células endoteliales no infectadas se observó el marcaje intramembranal típico de Claudina 1 (C-D). Por el contrario en las células infectadas con cada uno de los virus, se observó el marcaje asociado a agregados citoplasmáticos (cabezas de flecha). Adicionalmente, en las células infectadas con el virus D4MB-6, se observó un marcaje perimembranal discontinuo intenso (flechas). Se muestran núcleos en azul. Barra 20µm.

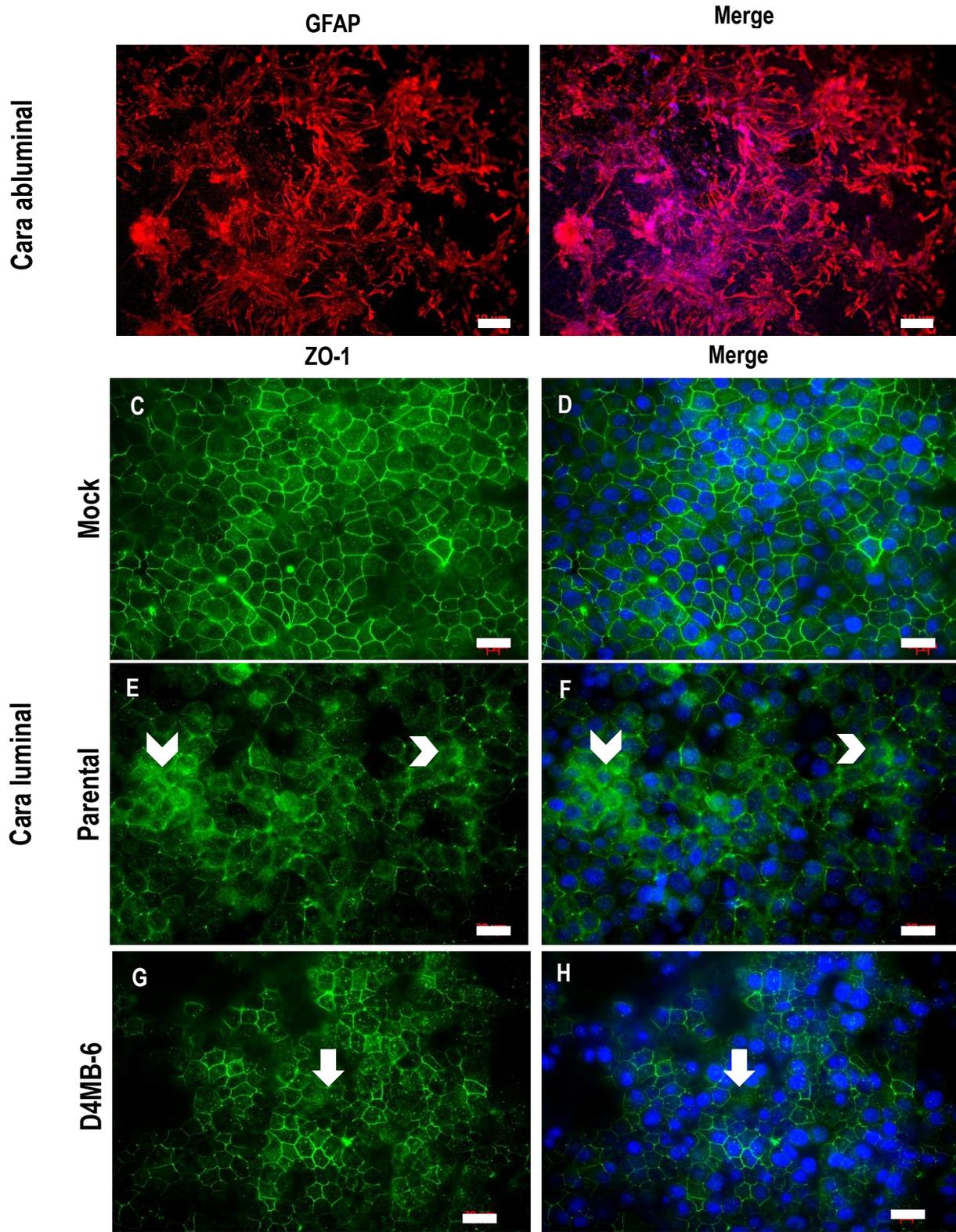


Figura 22. Modelo de BHE en Co-cultivo. Inmunodetección para ZO- y GFAP, en co-cultivos infectados con el virus parental o neuroadaptado a 48 hps y p.i.

Se muestran los astrocitos sembrados en la cara abluuminal de los insertos marcados con GFAP (A-B), Barra 10 μ m. Se muestra el marcaje típico de ZO-1 al margen de las células no infectadas (C-D). A las 48 hpi, las células infectadas únicamente con el virus parental presentaron agregados de la proteína en el citoplasma (cabezas de flecha). Adicionalmente algunas células infectadas con el virus D4MB-6, se observó una marcación citoplasmática de ZO-1 (flechas). Se observan núcleos en azul. Barra 20 μ m

Al evaluar los sobrenadantes de las cámaras superiores, se detectaron partículas virales infecciosas para cada uno de los virus evaluado a partir de las 2 hpi hasta las 48hpi, con una disminución de los títulos virales desde las 2 hasta las 12 hpi y un aumento del título en los sobrenadantes obtenidos a las 24 y 48 hpi para ambos virus (Tabla 1 y 2). Es probable que el virus detectado a las 2 hpi, sea virus residual del inóculo viral; por su parte, la disminución en los títulos virales observados a las 12 hpi, pueden sugerir que cada uno de los virus logró cruzar el modelo de BHE, lo que coincide con el aumento de virus en el pozo inferior, mientras que el aumentó obtenido a las 24 y 48 hpi sugiere un proceso de infección y replicación viral exitoso en estas células.

Virus	Hpi	Sobrenadante	Título (UFP/ml)
Parental	10	Cámara Inferior	4.1×10^2
	24		2.32×10^3
	48		$4,6 \times 10^3$
	2	Cámara superior	4×10^3
	10		1.6×10^3
	12		1×10^2
	24		1×10^4
	48		1.6×10^4

Tabla 1. Títulos virales obtenidos a partir de los sobrenadantes de las cámaras inferior y superior, de células infectadas con el virus parental, en el modelo de BHE en co-cultivo
Se detectaron partículas virales en los sobrenadantes de la cámara inferior únicamente a partir de las 10 hpi, mientras que en los sobrenadantes de las cámaras superiores se observan partículas virales desde las 2 hpi.

Virus	Hpi	Sobrenadante	Título (UFP/ml)
D4MB-6	10	Cámara Inferior	4×10^2
	24		3.6×10^3
	48		4.2×10^3
	2	Cámara superior	4×10^3
	10		3×10^3
	12		1×10^2
	24		1×10^4
	48		1.3×10^4

Tabla 2. Títulos virales obtenidos a partir de los sobrenadantes de las cámaras inferior y superior, de células infectadas con el virus D4MB-6, en el modelo de BHE en co-cultivo.
Se detectaron partículas virales en los sobrenadantes de la cámara inferior únicamente a partir de las 10 hpi, mientras que en los sobrenadantes de las cámaras superiores se observan partículas virales desde las 2 hpi

Finalmente, sobre los modelos de BHE caracterizados, se evaluó la trans migración de virus o de monocitos/macrófagos inducida por la infección con el virus dengue neuroadaptado o no.

6.6 Evaluación de la expresión de las moléculas de adhesión

Durante la infección en pacientes, se ha reportado la activación endotelial como uno de los factores asociados a severidad. Esto puede ser debido a la respuesta inmune exacerbada, que induce la sobreexpresión de algunas moléculas de adhesión y citoquinas en las células endoteliales. Por esta razón, en nuestro modelo de BHE (monocapa o co-cultivo) se evaluó la expresión relativa de algunas citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión por qPCR (únicamente en las células infectadas con el virus D4MB-6) e inmunofluorescencia (con cada virus), como se describió previamente en la metodología.

Los transcritos primarios de las diferentes proteínas cuantificados por qPCR, fueron comparados con la expresión relativa del CSV en cada uno de los tiempos evaluados (2, 10 y 24 hpi). Se evidenció que la expresión de ZO-1 y PECAM se incrementó en el tiempo p.i., obteniendo un valor relativo de expresión de 2 veces más a las 10 hpi y de 8 veces más a las 24hpi respectivamente (Figura 23). Por el contrario, la molécula VCAM tuvo una expresión relativa de 8 veces más desde las 2hpi hasta las 10hpi y decayó a las 24hpi, con una expresión de 4 veces menos (Figura 23).

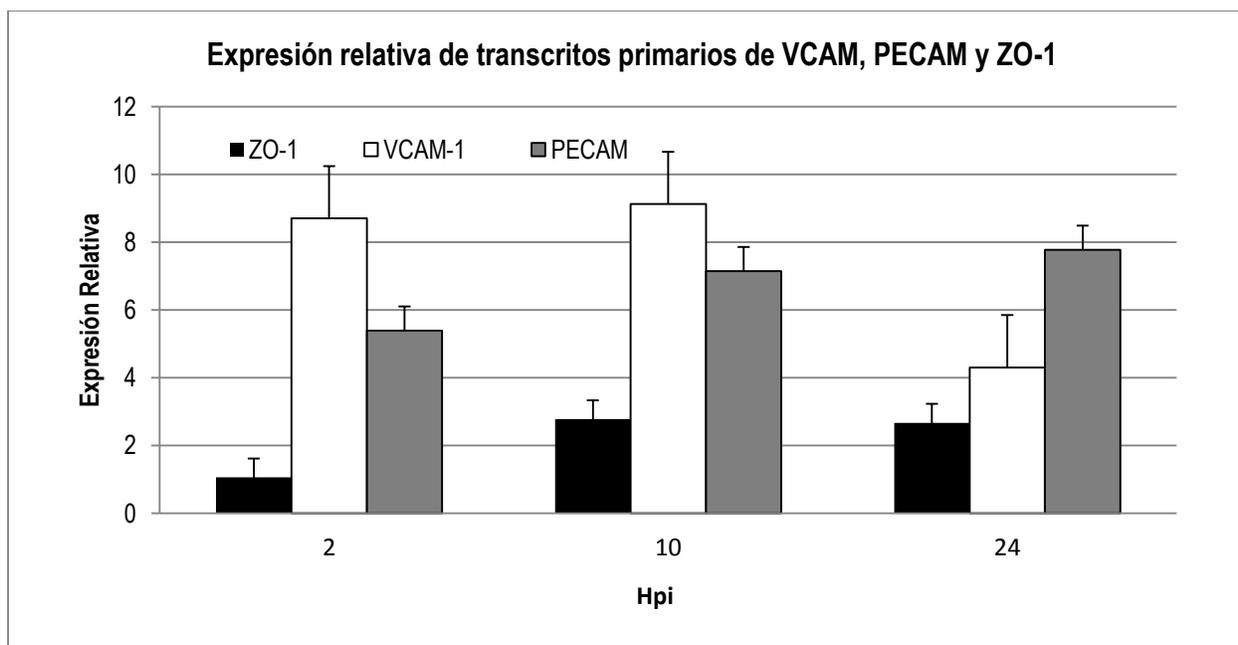


Figura 23. Expresión relativa de transcritos primarios para VCAM, PECAM y ZO-1 en los diferentes tiempos p.i evaluados en células infectadas con el virus D4MB-6.

Se observó el aumento en la expresión de PECAM y ZO-1 a lo largo del tiempo p.i, mientras que la expresión de VCAM decayó a las 24 hpi. Estos resultados son el promedio de 2 experimentos independientes.

De igual forma se observó que la expresión relativa para la quimioquina MCP-1 tuvo un elevado aumento a lo largo de los tiempos p.i evaluados, alcanzando un valor máximo a las 24 hpi equivalente a 38 veces más respecto al gen de referencia

(beta-actina) (Figura 24). mientras que la expresión relativa de TNF- α , fue de 2 veces más a las 24 hpi. Los resultados anteriores indican que la infección de las células endoteliales, indujo un proceso de activación endotelial asociada a la expresión de moléculas de adhesión y de citoquinas y quimoquinas.

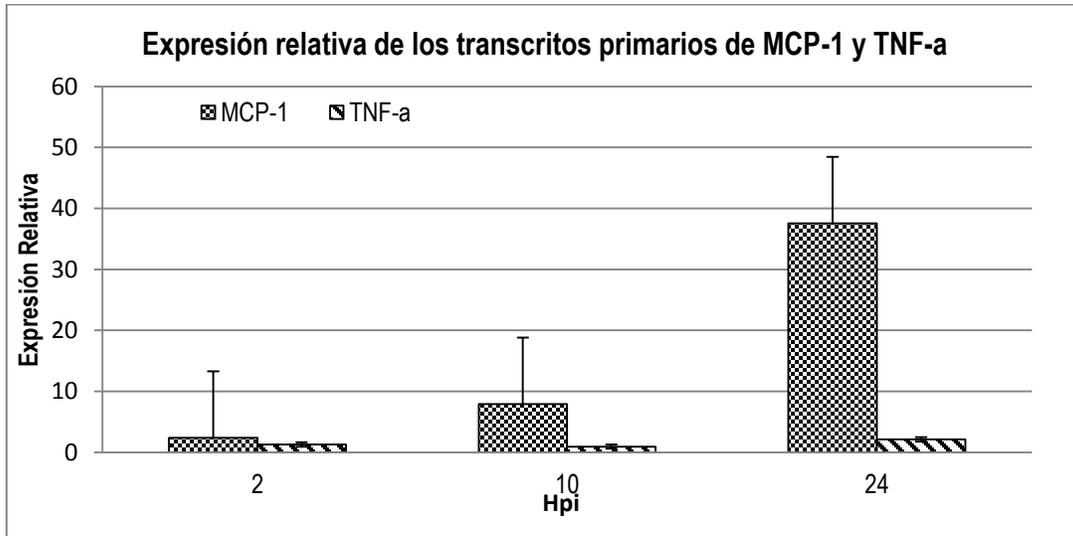


Figura 24. Expresión relativa de transcritos primarios para MCP-1 y TNF- α en los diferentes tiempos p.i evaluados en células infectadas con el virus D4MB-6.

Se observó el aumento en la expresión MCP-1 y TNF- α a lo largo del tiempo, alcanzando un valor máximo a las 24 hpi. Estos resultados son el promedio de 2 experimentos independientes.

Adicionalmente, se cuantificó el incremento en la producción de RNA viral de ambos virus (parental o D4MB-6) en las células endoteliales infectadas durante los diferentes tiempos evaluados. De esta forma se observó que el virus parental aumento su producción de transcritos hasta 3.5 veces a las 24 hpi, mientras que en este mismo tiempo el virus D4MB-6 tuvo un incremento menor a 1 (Figura 25). Estos resultados indican que ambos virus no solo infectan las células endoteliales, sino que también parecen soportar un proceso de replicación viral.

Además de los ensayos anteriores, se evaluó en las células infectadas con cada uno de los virus o inoculadas con el Mock, el proceso de activación endotelial detectando la expresión las moléculas de adhesión VCAM-1, E-sele y PECAM. De acuerdo a esto, se observó en las células inoculadas con el Mock un marcaje -para las tres proteínas, tenue y puntiforme en el citoplasma, que correspondió a la expresión basal de estas (Figuras 26, 27 y 28 A-C).

Por su parte, las células infectadas con los dos virus y tiempos p.i., evaluados, presentaron una sobreexpresión de las tres proteínas comparado con el control. El marcaje puntiforme se observó de forma intensa en las células infectadas a las 24 y 48hpi con el virus parental (Figura 26 y 27 D-F, J-L), mientras que a las 24 hpi, las células infectadas con el D4MB-6 presentaron un marcaje poco intenso y citoplasmático (Figura 26, 27 y 28 G-I). Por su parte a las 48 hpi, el marcaje para VCAM fue claramente puntiforme e intenso distribuido sobre la superficie celular (Figura 26 M-O), para E-Sele fue periférico (Figura 27 M-O) y para PECAM, fue citoplasmático en las células infectadas con el virus parental (Figura 28 J-L) y

perinuclear en las células infectadas con el virus D4MB-6 (Figura 28 M-O). Adicionalmente se observó que las células no infectadas expresaron en mayor medida las moléculas de adhesión, demostrando así el proceso de activación endotelial descrito tras la infección con DENV.

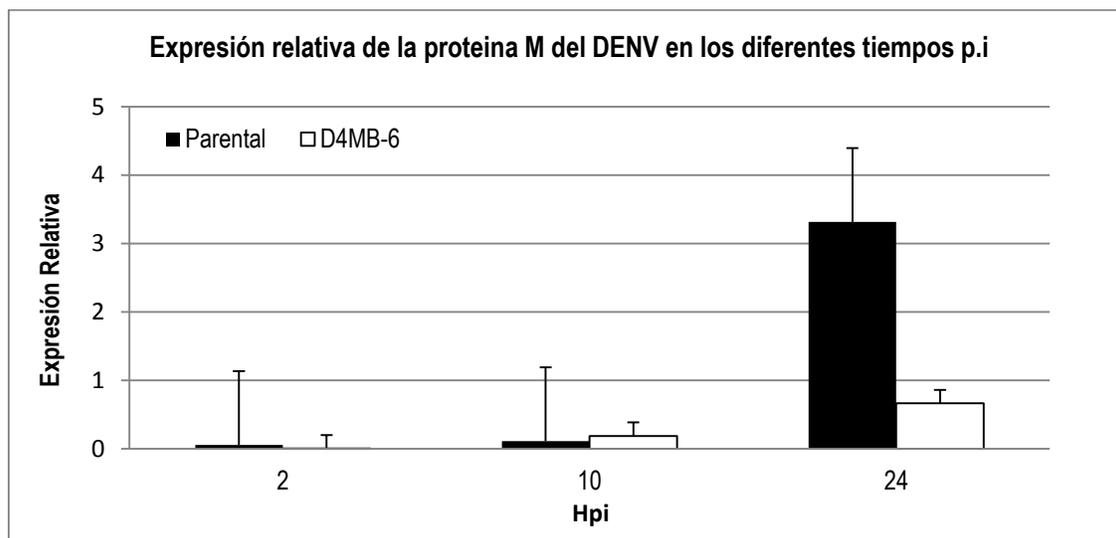


Figura 25. Expresión relativa de la proteína M del DENV adaptado o no, en células endoteliales infectados en diferentes tiempos p.i.

Se observó que el virus parental presentó un aumento en la expresión del transcrito para la proteína M comparado con lo observado con el virus D4MB-6. Estos resultados son el promedio de 2 experimentos independientes.

6.7 Ensayo de trans migración de macrófagos.

6.7.1 Modelo de BHE en monocapa.

Como se mencionó anteriormente, aún no se conoce el mecanismo por el cual el DENV logra ingresar y causar daños en el tejido nervioso. Una de las posibilidades, sugiere que el virus puede atravesar la BHE utilizando el mecanismo denominado caballo de troya. Para evaluar si este proceso se presentó en nuestro modelo, se evaluó la trans migración de las células J774 (monocitos / macrófagos) en el modelo de BHE en monocapa (Figura 29).

En primera instancia, se evaluó la susceptibilidad a la infección de las células J774 con el virus parental o D4MB-6. Para esto, se sembraron 10.000 macrófagos sobre laminillas y se infectaron con cada uno de los virus a una MOI: 1 y 24 h después, las células fueron fijadas y procesadas por inmunoperoxidasa para detectar el antígeno viral. De acuerdo a los conteos, se observó que aproximadamente el 30% de las células fueron susceptibles a la infección con el virus parental y el 32% con el D4MB-6 (Figura 30).

Luego, se estableció el modelo de trans migración de las J774 en el modelo de BHE en monocapa, sembrando 100.000 células endoteliales sobre la membrana de insertos transwell con poros de 5,0 μm y cultivadas a confluencia durante cuatro días. Al cumplirse el tiempo post-siembra, fueron infectadas y sobre ellas se re-sembraron las células J774 no infectadas o infectadas previamente con cada uno de los virus, y a las 10 o 24 hps se evaluó el número de células J774 que lograron atravesar la membrana y adherirse en el pozo inferior.

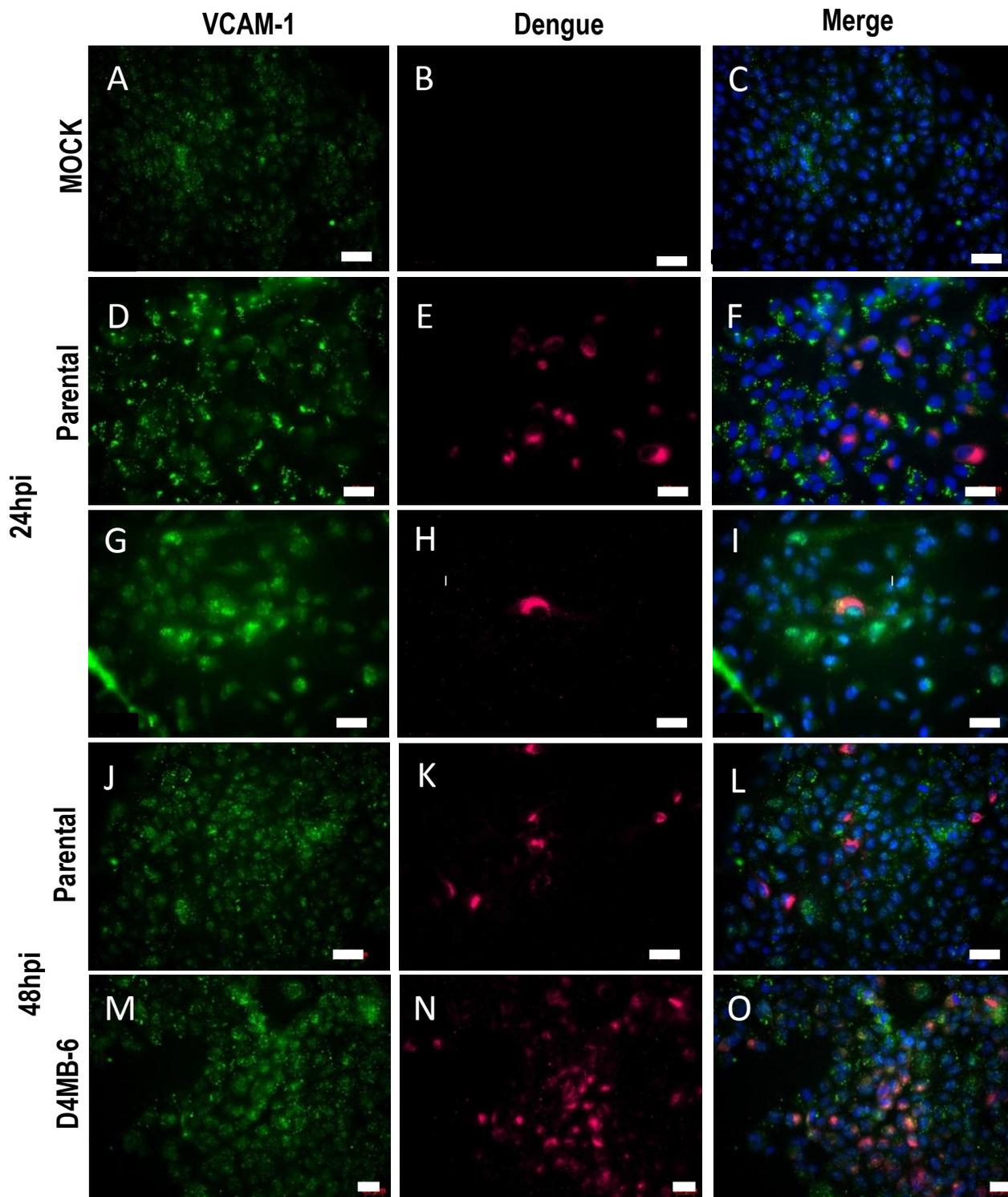


Figura 26. Inmunofluorescencia para la molécula de adhesión VCAM-1 en células endoteliales infectadas con los virus parental y D4MB-6.

Se observó una localización subcelular de VCAM (Verde) en el citoplasma de células no infectadas (A-C), o infectadas con cada uno de los virus parental a las 24 y 48hpi. Adicionalmente se detectó el antígeno viral (rosado) con una distribución perinuclear en cada una de las condiciones evaluadas. Núcleos en azul. Barra de 20 μ m

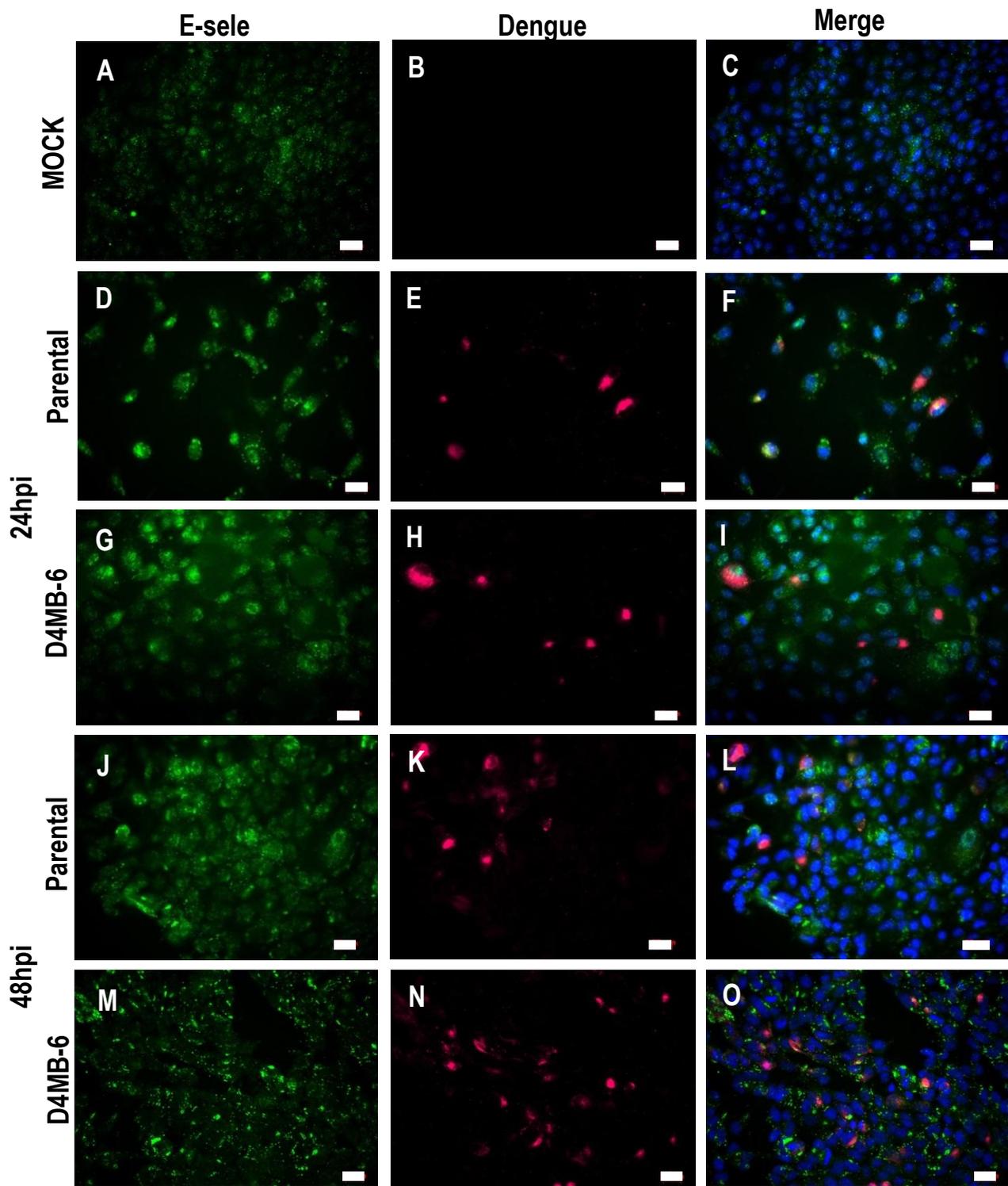


Figura 27. Inmunofluorescencia para la detección de la molécula de adhesión E- sele en células endoteliales infectadas con DENV parental y D4MB-6.

Se observó la localización subcelular citoplasmática de E-sele (Verde) en células no infectadas (A-C), o infectadas con cada uno de los virus parental a las 24 y 48hpi. Adicionalmente se detectó el antígeno viral (rosado) a nivel perinuclear en cada una de las condiciones evaluadas. Núcleos en azul. Barra de 20 μ m.

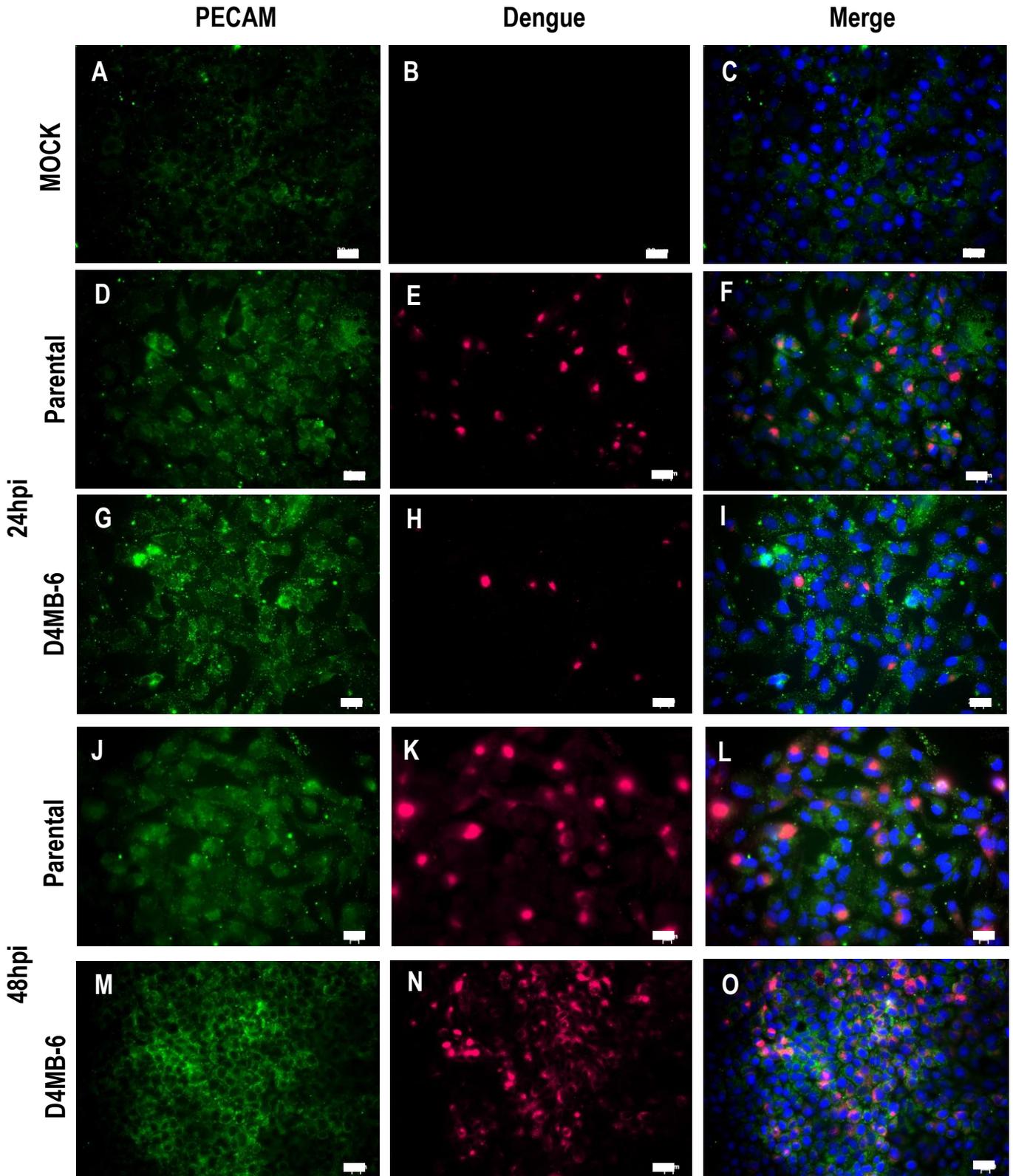


Figura 28. Inmunofluorescencia para la detección de la molécula de adhesión PECAM en células endoteliales infectadas con DENV parental y D4MB-6.

Se observó la localización subcelular citoplasmática de PECAM (Verde) en células no infectadas (A-C), o infectadas con cada uno de los virus parental a las 24 y 48hpi. Adicionalmente se detectó el antígeno viral (rosado) con una localización subcelular perinuclear en cada una de las condiciones evaluadas. Núcleos en azul. Barra de 20µm.

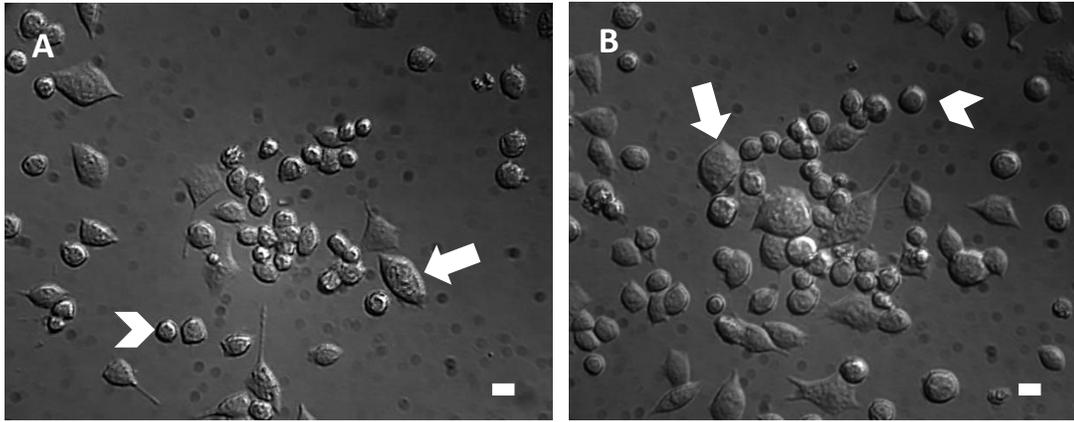


Figura 29. Microfotografía en contraste de fases de células J774 (macrófagos de ratón J774).

Se muestran las células cultivadas durante 4 (A) u 8 días (B), evidenciándose en ambos tiempos, monocitos (cabezas de flecha) con morfología pequeña y redondeada, además se observaron células que sugieren un proceso de diferenciación a macrófagos, caracterizada por ser células grandes con un citoplasma expandido (flechas). Barra de 20µm.

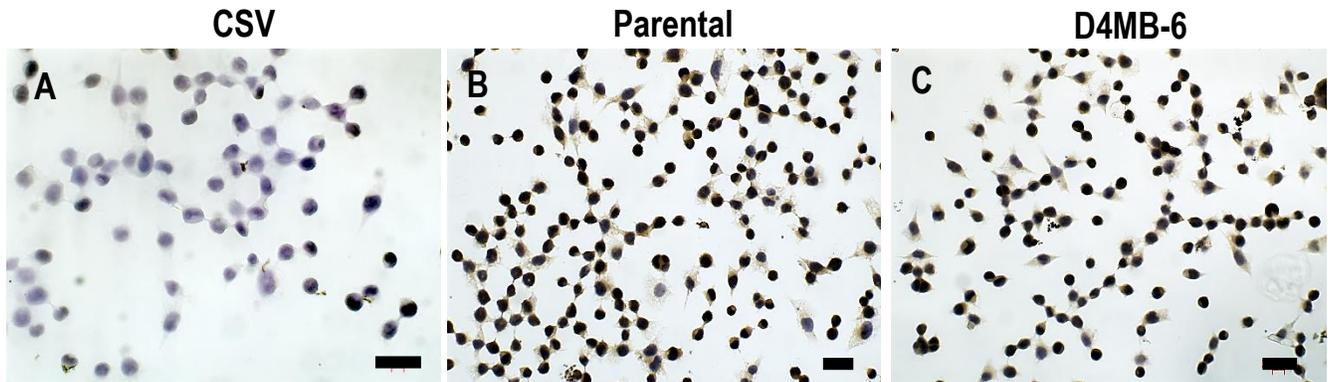


Figura 30. Inmunodetección para antígeno viral en células J774.

Se muestran las células J774 no infectadas (A) e infectadas por 24 h con virus parental (B) o D4MB-6 (C). Barra de 20µm.

Sin embargo, para determinar la condición específica que favoreciera la trans migración de los macrófagos, se evaluaron tres situaciones de infección: 1) Células endoteliales infectadas/ macrófagos no infectados, 2) Células endoteliales no infectadas/ macrófagos infectados y 3) ambos tipos celulares infectados.

En ninguna de las condiciones evaluadas se encontraron células J774 adheridas (o en suspensión) en el pozo inferior del sistema las 10 hpi (tiempo en el que disminuyó la TEER y aumentó la permeabilidad de la barrera), lo cual sugiere que la trans migración celular es un proceso que se da tiempo después de observar la disminución de la TEER, por lo que es prematuro evaluar la trans migración de células en este tiempo.

Por el contrario, a las 24 hpi se encontraron células en el pozo inferior del inserto, en las 3 condiciones evaluadas. En la tabla 1 se presenta el valor promedio de células transmigradas para cada una de las condiciones evaluadas; los resultados estadísticos (Kruskall-Wallis y Bonferroni), indican que no hay diferencias significativas entre las condiciones de trans migración evaluadas ($p > 0.05$), ni entre los tratamientos de infección de cada una de las condiciones (Tabla 3). Lo anterior indica que ninguna de estas condiciones parece favorecer en mayor medida, la trans migración de células J774, en el modelo de BHE en monocapa.

Adicionalmente, la morfología que presentaron las células J774 transmigradas en cualquiera de las tres condiciones experimentales, fue redondeada y con largas prolongaciones citoplasmáticas (Figura 31B), contraria a la morfología que presentaron las mismas células en el control de trans migración sin endotelio (Figura 31A), también se evidenciaron algunas células de mayor tamaño con un citoplasma extendido, típico de los macrófagos diferenciados (Figura 31C-D), lo que demostró que bajo las condiciones evaluadas, se puede favorecer el proceso de diferenciación celular de las J774.

Condición\ Tratamiento	Mock	Parental	D4MB-6	p	Resultado
Endotelio infectado - Macrófagos no infectados	31	28	42	0.2294	No hay diferencias entre los tratamientos
Endotelio no infectado - Macrófagos infectados	13	28	42		
Endotelio infectado - Macrófagos infectados	25	25	27		

Tabla 3. Promedio de células J774 transmigradas en el modelo de BHE en monocapa.

24 h después de la resiembra de las células J774 sobre el modelo de BHE en monocapa, se contaron las células que atravesaron la BHE en cada una de las condiciones evaluadas. Se muestra el promedio de dos cultivos de células no infectadas o inoculadas con el Mock, de tres infectados con parental y de seis infectados con D4MB-6. Los análisis estadísticos ($p < 0.05$) no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos

6.7.2 Modelo de BHE en Co-cultivo

Adicionalmente, se evaluó el proceso de trans migración de las J774 en el modelo de BHE en co-cultivo a las 10 y 24 hpi en las tres condiciones experimentales mencionadas anteriormente (Tabla 4). De esta forma se observó que existieron diferencias significativas (Kruskall-Wallis y Bonferroni) únicamente entre los tratamientos 1 y 2 ($p < 0.05$) y entre los tratamientos 2 y 3 ($p < 0.05$).

Estos resultados difieren de lo encontrado en el modelo en monocapa, lo que sugiere que la presencia de astrocitos en el modelo es un factor importante a aumentar de forma significativa el número de células transmigradas siendo el endotelio infectado -el que al parecer-, favorece en mayor medida la trans migración de células, sin importar si están o no infectadas.

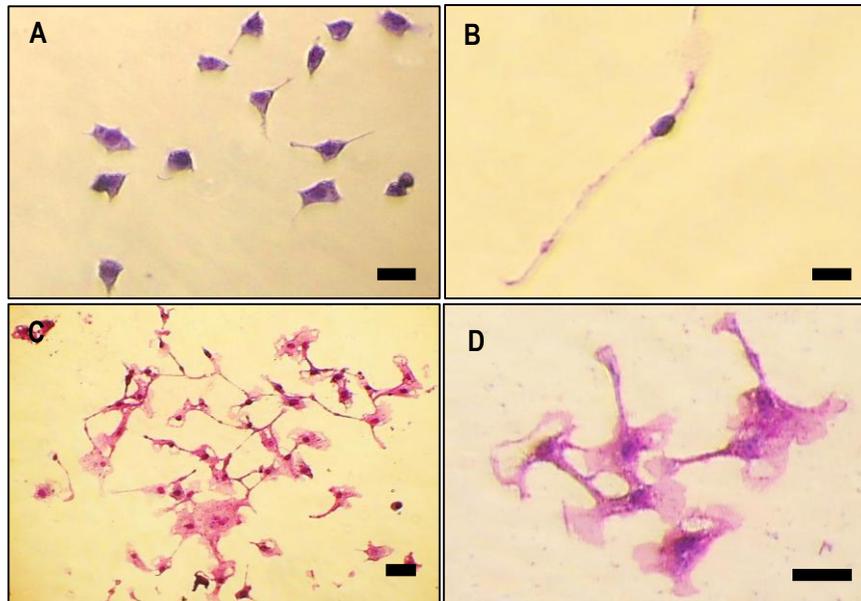


Figura 31. Morfología de las células J774 transmigradas.

Se muestra la morfología redondeada y citoplasma pequeño de las células no infectadas, los que sugieren un estado de indiferenciación asociado a monocitos (A). Con el proceso de trans migración los monocitos sufrieron cambios morfológicos como un mayor tamaño, citoplasmas extendidos y la emisión de prolongaciones citoplasmáticas largas, lo que sugiere un proceso de diferenciación a macrófagos (B-D). Barra de 20 µm.

	Condición\Tratamiento	Mock	Parental	D4MB-6	p(K-Wallis)	p(Bonferroni)
1	Endotelio infectado- Macrófagos no infectados	77	84	75		1 Vs 2 p=0.015
2	Endotelio no infectado- Macrófagos infectados	50	50	45	0.0114	1 Vs 3 p=1.000
3	Endotelio infectado- Macrófagos infectados	77	84	75		2 Vs. 3 p=0.015

Tabla 4 . Promedio de células J774 transmigradas en el modelo de BHE en co-cultivo.

24 h después de la resiembra de las células J774 sobre el modelo de BHE en co-cultivo, se contaron las células que atravesaron la BHE en cada una de las condiciones evaluadas. Se muestra el promedio de dos cultivos de células no infectadas o inoculadas con el Mock, de tres infectados con parental y de seis infectados con D4MB-6. Los análisis estadísticos ($p < 0.05$) mostraron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 y entre 2 y 3.

7 Discusión

El DENV es el flavivirus responsable del dengue, una de las infecciones arbovirales más frecuentes en humanos, con aproximadamente 50-100 millones de casos anuales a nivel mundial (Misra et al, 2006, Martínez-Gutierrez & Castellanos, 2006). Pese a que la mayoría de casos son asintomáticos, las manifestaciones clínicas tras la infección pueden variar desde signos de baja complicación, hasta manifestaciones más severas, que incluyen el aumento en la permeabilidad vascular, trombocitopenia y eventos hemorrágicos, característicos del dengue grave (antes conocido como fiebre de dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue) (Domingues et al, 2008; OMS & TRD, 2009, Velandia & Castellanos, 2011).

Aunque el DENV es considerado como un virus no neurotrópico, se han descrito signos de alteración neurológica asociados a la infección, que incluyen encefalitis, encefalomielitis aguda diseminada, mielitis trasversa, síndrome de Guillén Barre (Misra et al, 2006), confusión mental, trastornos motores y cognitivos transitorios o permanentes (Velandia et al, 2012) entre otros. Al respecto, algunos estudios epidemiológicos indican que entre el 1% y el 5% de todos los casos sintomáticos con dengue presentan manifestaciones neurológicas, sin embargo, en áreas endémicas e hiperendémicas para el virus, el porcentaje de casos con encefalitis por DENV puede ser significativamente mayor, no obstante el sub-registro puede ser debido a que muchos signos neurológicos son posteriores a la infección y porque las manifestaciones neurológicas asociadas a la infección son aún consideradas como atípicas (Gulati & Maheshwari, 2007; Sips et al, 2012; Velandia et al, 2012).

Es probable, que las alteraciones neurológicas sean el resultado de la infección sistémica por DENV (encefalopatía por dengue), sin embargo, algunos estudios han sugerido que el virus puede ingresar directamente e infectar el tejido nervioso (Varatharaj, 2010; Sips et al, 2012). Al respecto, en muestras *post-mortem* se han reportado alteraciones neuropatológicas, como edema, congestión vascular e infiltración linfocítica perivascular en el tejido nervioso de pacientes con dengue. Otros estudios han detectado RNA viral e inmunoglobulinas G (IgG) e IgM en líquido cefalorraquídeo (CSF) (Solomon et al, 2000; Domingues et al, 2008; Sips et al, 2012) y la infiltración de macrófagos infectados con DENV dentro del parénquima cerebral, ubicados muy cerca de neuronas con claras alteraciones citopáticas como la presencia de acidofilia y el encogimiento del citoplasma celular (Sips et al, 2012).

A pesar de esto, son pocos los estudios acerca de la neuropatogenia por DENV (Sips et al, 2012) y hasta el momento no se conocen los mecanismos que podría utilizar el virus para ingresar y dispersarse dentro del SNC (Velandia et al, 2012).

Para estudiar la neuropatogenia, se han establecido modelos animales utilizando ratones de laboratorio (Velandia, 2012), sin embargo, estos animales no son hospederos naturales para el virus, por lo cual no es fácil replicar aislados humanos en ellos, o reproducir los mismos signos y síntomas de la enfermedad observadas en humanos (Yauch & Shresta, 2008).

Por esta razón es necesario adaptar el virus, para que éste pueda infectar, replicarse y producir en los ratones viremia y algunos de los signos y síntomas asociados a la infección (Bordignon et al, 2007; Yauch & Shresta, 2008; Velandia et al, 2012). La adaptación de cepas virales en animales de laboratorio, ha permitido obtener modelos de infección para el estudio de la patogénesis e identificar algunos mecanismos que podrían favorecer la neuroinfección por DENV (Bordignon et al, 2007). Al respecto, en nuestro laboratorio se desarrolló y caracterizó un modelo de neuroinfección en ratones lactantes de la cepa Balb/C (inmunocompetentes) utilizando una cepa de DENV-4 neuroadaptada con características altamente neurotrópicas, neurovirulentas y neuroinvasivas, que permitió obtener en tiempos tempranos post-infección, partículas virales en encéfalo y médula espinal sin que existieran alteraciones en los tejidos extraneurales de animales de 2 a 7 dpn (Velandia, 2012; Velandia et al, 2012; Bastidas, 2013).

En este modelo, se obtuvo un hallazgo muy interesante e importante y fue la alteración en la permeabilidad vascular de la BHE asociada a la infección con el virus D4MB-6. Este daño fue evidenciado por la extravasación del colorante Azul de Evans en los intersticios de órganos y tejidos como el nervioso (Velandia, et al, 2012), lo cual sugiere que la infección de las células del tejido nervioso con el virus dengue neuroadaptado D4MB-6 es fundamental para el desarrollo del dengue grave y que ésta infección induce la alteración en la BHE de los animales infectados, sugiriendo que este daño puede ser un mecanismo utilizado por el DENV logra ingresar y dispersarse en el SN (Velandia et al, 2012).

La alteración de la BHE como consecuencia de la infección por DENV, suscita un gran interés, debido a que este evento, podría favorecer el paso de virus libre (desde la luz del capilar hasta los tejidos), y/o la trasmigración de células como leucocitos, que infectados o no, podrían promover la infección y la inflamación del tejido, favoreciendo el desarrollo de la neuropatogenia. Por esta razón, el objetivo general de este trabajo propuso evaluar mediante la implementación de un modelo *in vitro* de BHE, la alteración del endotelio cerebrovascular inducido tras la infección con el D4MB-6, con el fin de determinar si estos procesos favorecen la entrada del virus o células al tejido nervioso.

Obtención y caracterización de los cultivos primarios y evaluación de la susceptibilidad a la infección:

Para cumplir con este objetivo fue necesario establecer inicialmente los protocolos de extracción y purificación de células endoteliales y astrocitos -dos de los elementos fundamentales de la UNV que conforman la BHE *in vivo*-, a partir de cerebro de ratón lactante, luego de ello se estableció el modelo *in vitro* de BHE en monocapa y co-cultivo.

Esta reportado que los cultivos primarios de células endoteliales, son la forma más adecuada de recrear las condiciones de barrera observadas *in vivo* (Cardoso et al, 2010), ya que presentan altos valores de TEER, baja permeabilidad y expresan de forma constante los marcadores celulares característicos para este tipo de células como las TJPs y JAM (Deli et al, 2005, Weidenfeller et al, 2005), especialmente cuando son cultivadas en condiciones que promueven un fenotipo diferenciado y polarizado, como el uso de membranas porosas, medios condicionados (Abbott, 2002, Haseloff et al, 2005) o estableciendo

co-cultivos de células endoteliales y glía (Abbott, 2005). Obviamente, el aislamiento y la obtención de cultivos celulares altamente purificados es un procedimiento costoso (Deli et al, 2005, Weidenfeller et al, 2005), por la cantidad de animales que se deben utilizar para establecer el modelo y por los procedimientos del cultivo utilizados para garantizar una alta pureza y enriquecimiento (Weidenfeller et al, 2005). Por lo anterior en nuestros experimentos, se aplicó el principio de las 3R (**Reemplazo** de aquellos cultivos celulares primarios que podían ser reemplazados por líneas celulares como el cultivo de macrófagos J774, la **Reducción** del número de animales utilizados para cada uno de los cultivos estandarizados y el **Refinamiento** por el cual los animales no sufrieron procedimientos invasivos ni dolorosos), para disminuir el número de animales utilizados y los costos.

Los cultivos primarios de células endoteliales y astrocitos obtenidos, presentaron diferentes tipos de células contaminantes por lo que fue necesario implementar algunos procedimientos para la purificación de los mismos, debido a que estas células contaminantes, pueden afectar las características de los cultivos y la reproducibilidad de los mismos (Weidenfeller et al, 2005).

De esta forma, para la purificación de las células endoteliales se implementó el procedimiento estandarizado por Pèriere et al. 2005, basado en el aprovechamiento de la expresión de la glicoproteína P (P-gP) únicamente en las células endoteliales, lo que les confiere a éstas células, la capacidad de sobrevivir a tratamientos con altas concentraciones de sustratos de la P-gP como puromicina, vinblastina o colchicina (Perrière et al, 2005). Esto permitió la obtención de cultivos de células endoteliales de ratones neonatos, con una morfología adoquinada similar entre células, con altos niveles de proliferación celular, altamente reproducibles entre cultivos, tal y como fue descrito previamente por Perriere et al, 2005 en endoteliales cerebrales de rata.

De este modo y utilizando la proteína vWF o Factor VIII como marcador, se observó que los cultivos tuvieron un 99% de pureza, indicando que el cultivo estaba conformado por células maduras y bien diferenciadas, esto último fue confirmado por la detección de las proteínas de unión estrecha TJPs ZO-1, Claudina I y Ocludina. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Lippmann et al 2013, que demuestra que las células endoteliales obtenidas de cerebros de ratones neonatos son similares a las obtenidas en animales adultos, debido a que la vascularización del SNC de roedores inicia de forma temprana (el día 9 de desarrollo pre-natal) con la formación de vasos sanguíneos cerebrales y la asociación pericitos-endotelio, y finaliza días antes de terminar el proceso de gestación con la aparición de astrocitos y la organización de las uniones altamente estrechas mediadas por las TJPs (Lippmann et al, 2013). Lo anterior indicó que nuestros cultivos poseían las características estructurales necesarias para el funcionamiento adecuado de los modelos de BHE estandarizados posteriormente.

De igual forma, fue necesario someter los cultivos de astrocitos a un proceso de purificación mecánica, que permitió obtener cultivos con un 95% de pureza, evaluado por la expresión de la proteína GLT-1, lo cual sugiere un estado de inmadurez de

las células obtenidas, debido a que en ratones los astrocitos se diferencian en los últimos días del desarrollo embrional, y culminan su diferenciación en etapas post-natales tardías (Lippmann et al, 2013), por lo tanto era necesario inducir en el cultivo un estado de maduración astrocítica, que promoviera la inducción de algunas propiedades de la BHE -como la alta TEER-. Por esta razón, se implementó una modificación al protocolo de Skaper et al, 2012, que consistió en prolongar por 8 días más el tiempo de cultivo post-purificado, de esta forma se obtuvo un 95% de células GFAP+, un porcentaje similar a lo reportado en cultivos de astrocitos en animales adultos (Pekni et al, 1998, Puschmann et al, 2010, Wilhelm et al, 2011).

De esta manera se obtuvieron cultivos primarios de células endoteliales y astrocitos a partir de animales lactantes, con características similares a las reportadas a partir de animales adultos, lo cual indicó que nuestros cultivos contaban con la morfología celular y las características estructurales adecuadas para la estandarización de los modelos de BHE.

Luego se evaluó sobre cada uno de los cultivos primarios, la susceptibilidad a la infección con DENV adaptado o no. Estudios previos han reportado la presencia de antígeno viral de DENV no adaptado, en neuronas, microglia y astrocitos (Sips et al, 2012), sin embargo, en nuestros cultivos de astrocitos se observó que estas células fueron completamente refractarias a la infección con ambos virus. Estos resultados coinciden con lo obtenido previamente en modelos *in vivo* (Velandia et al, 2012; Bastidas, 2013) e *in vitro* (Imbert et al, 1994), lo que sugiere que existen diferencias neuropatogénicas y de tropismo celular entre las cepas de DENV utilizadas en los diferentes estudios, similar a lo reportado previamente con cepas patogénicas y no patogénicas del WNV (Hussmann et al. 2013), confirmando que los diferentes genotipos de cada uno de los serotipos del DENV tienen diferentes niveles de virulencia y patogenicidad (Whitehorn & Simmons, 2011). Un ejemplo de esto son los estudios *in vivo* realizados en niños vietnamitas, en donde se evidenció que las infecciones con DENV-1 son más severas que las infecciones con DENV-2, diferente a lo observado en niños tailandeses donde el DENV-2 y 3, tienen mayores probabilidades de ocasionar dengue grave que el DENV-4 (Chau et al, 2008). Lo anterior indica que es posible encontrar incongruencias entre los resultados obtenidos en modelos de infección con serotipos de DENV diferentes al utilizado en nuestro modelo.

Por el contrario, observamos que las células endoteliales de ratones neonatos, fueron altamente susceptibles a la infección con ambos virus, lo cual ha sido previamente reportado por otros autores en modelos *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo el modelo *in vitro* desarrollado por Avirutnan et al. 1998, en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) inoculadas con una cepa de DENV-2 demostró que estas células se infectaron y secretaron quimioquinas como RANTES e IL-8, las cuales están implicadas en la alteración de la permeabilidad vascular (Avirutnan et al, 1998). Por su parte, Chen et al, 2007, desarrollaron un modelo de infección *in vivo*, utilizando ratones C57BL/6 infectados por vía intradérmica con una cepa de DENV-2, y describieron que los macrófagos y las células endoteliales fueron blanco de la infección por DENV (Chen et al, 2007). Adicionalmente, se ha reportado la infección de células de microvasculatura cerebral en necropsias de pacientes con dengue grave, lo cual sugiere que la infección en del endotelio, contribuye a la patogénesis viral, aumentando la viremia, secretando citoquinas, modulando rutas metabólicas complementarias o transformando el endotelio en un blanco

inmunológico de respuestas celulares y humorales (Dalrymple & Mackow, 2012). Por lo tanto, la infección en estas células podría ser un proceso clave en el ingreso del virus dentro del SNC.

A pesar de que ambos virus lograron infectar las células endoteliales los porcentajes de infección con el virus neuroadaptado fueron significativamente mayores a los obtenidos con el virus parental, lo que sugiere que las subpoblaciones virales neurovirulentas presentes en el virus D4MB-6 tienen una mayor afinidad por las células endoteliales que las subpoblaciones virales presentes en el virus parental. Lo anterior puede deberse a que la adaptación de los virus al tejido nervioso, es un proceso que presiona y selecciona las variantes virales que pueden infectar y replicarse en este tejido, siendo las mutaciones propias o adquiridas durante el proceso de adaptación, las que determinan la virulencia y la capacidad de infectar de manera eficiente las células del tejido nervioso (Velandia, 2012), por lo que era de esperarse que el virus no adaptado ocasionara menores porcentajes de infección en las células endoteliales que el virus D4MB-6.

Además de lo anterior, el alto porcentaje de infección observado con el virus D4MB-6 en nuestros resultados, también puede deberse a que la infección fue realizada en células con un bajo número de pasajes (4 pasajes), lo que ha sido previamente reportado en diferentes cultivos endoteliales primarios donde el DENV puede infectar cultivos endoteliales primarios hasta en un 80% después de 24 hpi, siendo estas células altamente permisivas a la infección con una MOI superior a 5 (Dalrymple & Mackow, 2011), lo que difiere de lo obtenido en nuestros resultados ya que con tan solo una MOI de 1 se logró un alto porcentaje de infección con el virus D4MB-6, lo que evidencia la virulencia de esta cepa viral.

Los Modelos de BHE

Establecido y caracterizado el cultivo de células endoteliales, se estableció el modelo de BHE en monocapa, sembrando las células endoteliales sobre la cara luminal de las membranas de policarbonato de los insertos transwell®, que favorece la polarización de las células, el bajo nivel de permeabilidad y restringe el movimiento de iones, asociado principalmente a la expresión y distribución adecuada de las TJP (Deli et al, 2005).

En nuestro modelo de BHE en monocapa, se reportaron valores de TEER de $1000\Omega/\text{cm}^2$ desde el cuarto hasta el sexto día post-siembra, que son valores muy altos respecto a lo reportado para otras especies (bovinas, felinas o murinas en edad adulta), debido quizás al uso de medio condicionado de astrocitos que contiene factores de crecimiento que favorecen la expresión de las TJP ZO-1, Claudina 1 y Ocludina, así como factores solubles que pueden ayudar a reforzar las uniones entre células (Demeuse et al, 2002).

In vivo se estima que la TEER de los microvasos de parénquima cerebral de mamíferos exceden los $2000\Omega/\text{cm}^2$ (Deli et al, 2005), sin embargo estos valores varían *in vitro* dependiendo de la especie animal de la que provengan las células, con un valor promedio de $400\Omega/\text{cm}^2$ (células cultivadas sin suero) a $700\Omega/\text{cm}^2$ (células cultivadas con suero) (Deli et al, 2005). Son pocos los modelos *in vitro* provenientes de cultivos primarios en los que se reportan valores de TEER superiores a 600-

700 Ω /cm², dentro de los que se encuentran algunos modelos en monocapa con células endoteliales porcinas que reportan entre 200-1800 Ω /cm² (Hoheisel et al, 1998, Tilling et al, 1998, Nitz et al, 2003). Por lo tanto nuestro modelo es uno de los primeros modelos murinos en donde utilizando células de ratones neonatos, se logran valores de TEER cercanos a los obtenidos *in vivo* con animales adultos.

A pesar de que en nuestro modelo en monocapa se obtuvieron altos niveles de TEER utilizando medio condicionado de astrocitos, el uso de medios condicionados en modelos de BHE ha sido controversial, debido a que no parecen funcionar de forma reproducible entre los diferentes modelos (Deli et al, 2005). Para solucionar problemas como la dediferenciación del endotelio y la baja expresión de TJPs, se ha reportado el uso de otras células de la UNV (como los astrocitos) en modelos de co-cultivo sembrados sobre el lado opuesto al endotelio de las membranas porosas, lo que permite el contacto entre células, siendo este contacto el responsable del mantenimiento de las características fenotípicas y funcionales del endotelio durante más tiempo (Demeuse et al, 2002; Deli et al, 2005; Abbot et al, 2005; Abbott et al, 2006). Por esta razón se decidió evaluar si la presencia de astrocitos en el modelo *in vitro* produce resultados distintos a los observados en el modelo en monocapa.

Para esto se sembraron los astrocitos en la cara abluminal de la membrana de los insertos y posteriormente las células endoteliales en la cara luminal, para establecer las interacciones glía-endotelio, que son fundamentales para el establecimiento de la función de barrera (Tao-Cheng et al, 1987; Haseloff et al, 2005). De esta forma en nuestro modelo de BHE en co-cultivo, se obtuvieron valores altos de TEER 1700 Ω /cm² al cuarto día y superiores a los 2000 Ω /cm² al sexto dps lo cual coincide con lo reportado previamente por Hoheisel et al, 1998, Tilling et al, 1998 y Nitz et al, 2003 en modelos porcinos, lo que sugiere que el contacto físico entre los pies astrocíticos y las células endoteliales, favorece el mantenimiento de uniones altamente estrechas entre célula y célula, lo que probablemente se debe a la producción continua de algunos factores como el TGF- β , GDNF, entre otros, que aunque en teoría están presentes en el medio condicionado, son rápidamente metabolizados por las células, por lo que posiblemente su efecto no es tan contundente como cuando hay una producción continua de estos factores (Abbott et al, 2006). Otros reportes han obtenido valores de TEER cercanos a 600 Ω utilizando células endoteliales primarias de origen bovino de un solo pasaje y astrocitos de rata (Wolburg et al, 1994), o células de la línea C6 de glioma de rata (Zenker et al, 2003), sin embargo el uso de células de diferentes especies animales en un solo modelo puede generar problemas de no reconocimiento inter-específico que debilitan las uniones entre las células endoteliales (Demeuse et al, 2002). Esto indica que en nuestro modelo es una ventaja que las células provengan de la misma especie animal, lo que optimiza las relaciones existentes entre los astrocitos y el endotelio.

Es poco común encontrar valores de TEER superiores a 600 Ω /cm² en modelos murinos adultos (Deli et al, 2005), esto hace que nuestro modelo sea uno de los pocos modelos reportados con valores de TEER cercanos a los observados *in vivo* (especialmente en el modelo de co-cultivo), sin necesidad de tratar los cultivos con fármacos como hidrocortisona o cAMP que son utilizados para aumentar los valores de TEER (Hoheisel, 1998; Weidenfeller et al, 2005) lo que indicó que nuestros

cultivos endoteliales, mantuvieron la integridad celular adecuada en las monocapas evitando la necesidad de inducir las propiedades de barrera por medio de fármacos. Lo anterior evidenció una ventaja de nuestro modelo, puesto que puede ser utilizado para evaluar el paso de moléculas de diferentes tamaños e incluso fármacos, debido a que los resultados pueden comportarse de forma más cercana a lo observado *in vivo*.

Paralelo a esto, se observó que los altos valores obtenidos en la TEER, están directamente asociados con una baja permeabilidad paracelular en el modelo, lo cual fue observado en nuestros ensayos de permeabilidad con el colorante Azul Dextrán. Lo anterior era de esperarse, debido a que los altos valores de TEER indican que las TJPs, están generando interacciones dinámicas controladas, que rigen la apertura paracelular de las células endoteliales en el modelo y al no existir un estímulo que interrumpa estas interacciones, no debe generarse un aumento en la permeabilidad del mismo (Cardoso et al, 2010). Esto es otro indicativo de que nuestros modelos de BHE contaron con las condiciones de cultivo y mantenimiento adecuadas, que permitieron la correcta polarización celular, que a su vez favoreció la ubicación adecuada de las TJPs intra y perimembranales, evitando así el paso paracelular de moléculas. Lo anterior ha sido previamente reportado en modelos *in vitro* utilizando células endoteliales provenientes de diferentes tejidos y especies (Deli et al, 2005), de hecho la baja permeabilidad de la BHE es una de las características más importantes a la hora de mantener la homeostasis microambiental del tejido nervioso, por lo que lograr modelos de BHE en donde se observen bajos valores de permeabilidad, indica que los modelos estandarizados son adecuados y altamente funcionales (Abbott, 2013).

Disfunción endotelial: Puerta de entrada del DENV para ingresar al tejido nervioso

Bajo las condiciones de infección evaluadas con los dos virus (parental y D4MB-6), se evidenció en ambos modelos de BHE, una alteración de la permeabilidad a partir de las 10 hpi, momento en el cual hubo una disminución de la TEER y un aumento del transporte paracelular de Azul Dextrán que continuó hasta las 48 hpi, observándose a su vez cambios en la distribución y expresión de las TJPs ZO-1 y Claudina 1.

La alteración en la expresión y distribución de las TJPs, es un mecanismo asociado directamente con la alteración de la BHE (Spindler & Hsu, 2012). Los resultados observados con Claudina 1 tras la infección con los virus parental o D4MB-6 a las 48 hpi, evidenciaron una acumulación de la proteína en el citoplasma, lo que coincide con lo reportado durante la infección con WNV a diferentes MOI de infección en tiempos tardíos p.i -entre el 3er y 5to dpi- (Verma et al, 2010). Esta acumulación indica que aunque la proteína continúa produciéndose, pueden existir cambios en los patrones de fosforilación de la misma, que impiden la correcta localización intramembranal de la proteína (González-Marisca et al, 2003), lo que evita que ejerza su función.

Adicionalmente, los cambios en la distribución de ZO-1 en nuestros modelos de BHE asociados a la infección -principalmente con el virus D4MB-6-, pueden ser debidos a modificaciones en el citoesqueleto de actina, que gracias a su interacción directa con los dominios intramembranales de las TJPs, puede afectar a su vez la localización de Claudina 1 y de otras TJP, alterando la permeabilidad de la BHE (Spindler & Hsu, 2012). Esto significa que la infección de las células

endoteliales con el virus D4MB-6 podría afectar la estructura y organización de los elementos del citoesqueleto celular, lo cual se ve reflejado en la relocalización de ZO-1 y así mismo de Claudina 1. Aunque es necesario realizar otros acercamientos experimentales para evaluar la premisa anterior, el hallazgo de daño en la distribución de ZO-1 es el primero en ser reportado tras la infección con un flavivirus, ya que en lo publicado hasta el momento durante la infección con WNV (Verma et al, 2009) o JEV (Agrawal et al, 2013), ZO-1 mantiene su ubicación durante el tiempo p.i en células epiteliales (CaCO2) o endoteliales (HUVEC) infectadas. La reacomodación del citoesqueleto de actina ocasionada por la infección con DENV ha sido previamente reportada en ensayos *in vitro* por Talavera et al, 2004 y Kanlaya et al, 2009 en células endoteliales de vasculatura humana, sugiriéndose que la reacomodación del citoesqueleto de actina inducido por la infección con DENV ocasiona un aumento en la permeabilidad vascular, lo cual está relacionado con la entrada del virus a las células por endocitosis -asociada a clatrin-, reportada previamente para DENV (Wang et al, 2010), sin embargo el mecanismo por el cual la infección logra reacomodar el citoesqueleto de actina aún no se conoce.

Además de lo anterior, se puede decir que la infección de las células con el virus D4MB-6 no parece generar una inhibición en la transcripción del gen que codifica para la proteína ZO-1, debido a que los resultados de la qPCR, muestran que tras la infección existen altos niveles de transcripción de esta TJP comparado con el CSV, alcanzando valores de expresión relativa superiores a 6 veces. Lo anterior concuerda con lo reportado para WNV por Xu et al 2010, en donde se observó que aunque la infección con WNV induce la endocitosis de algunas TJPs como Claudina 1, (seguido de su degradación en los lisosomas celulares), en ninguno de los tiempos p.i evaluados se observó una degradación de los transcritos primarios de estas proteínas (Xu et al, 2010), sin embargo es necesario realizar otros acercamientos experimentales que permitan determinar si tras la infección con DENV se favorece un proceso de degradación proteica.

Además de lo anterior, nuestros resultados mostraron que la relocalización de las TJPs está relacionada con la caída de la TEER y el aumento en la permeabilidad observada en ambos modelos, lo que a su vez, está relacionado con la transmigración del virus (parental y D4MB-6) desde la cámara superior hacia la inferior de los insertos. Esto se confirmó al detectar por plaqueo la presencia de partículas virales infecciosas en los sobrenadantes de la cámara inferior de los insertos en tiempos tempranos p.i (desde las 10hpi), lo que sugiere que el virus atravesó la BHE de forma paracelular, aprovechando la alteración en las TJPs, aunque no es posible descartar que el virus también pueda cruzar la BHE de forma transcelular. Esto coincide con lo reportado con JEV (Agrawal et al, 2013), en donde se reportó que la infección ocasionó la apertura de las TJPs, permitiéndose el paso paracelular de virus, y difiere de lo reportado para WNV, cuya transmigración se evidenció en tiempos p.i tardíos, por lo que se presume que su infiltración hacia SNC es predominantemente transcelular (Verma et al, 2009). Los resultados anteriores indican que el DENV logra atravesar la BHE de forma paracelular sin necesidad de que exista una asociación entre el virus y las células inmunes.

Adicional al daño en la distribución de las TJP asociado a la infección, otros procesos como la activación endotelial pueden favorecer el paso de células del sistema inmune hacia el parénquima cerebral. La activación endotelial, es un proceso en el

que se presenta la sobre-expresión de algunas moléculas de adhesión, citoquinas y quimioquinas, que normalmente se da como parte de un proceso inflamatorio. En nuestros modelos de BHE, se observó la activación del endotelio asociado a la sobreexpresión de las proteínas y los transcritos primarios de las moléculas de adhesión (VCAM, PECAM y E-sele), de la citoquina TNF- α y de la quimioquina MCP-1, durante la infección con los dos virus, pero fue más evidente durante la infección con el virus D4MB-6 comparado con lo observado con el virus parental en los tiempos p.i evaluados, lo que coincide con lo reportado previamente durante la infección por DENV o WNV, en donde se demostró que las células endoteliales infectadas cambiaron su perfil génico y expresaron algunos genes asociados a respuesta inmune (Dalrymple & Mackow, 2011). Esto significa que posiblemente el virus D4MB-6 tiene la capacidad de inducir de una forma más temprana la activación de diferentes vías de señalización y síntesis de las proteínas antes mencionadas, comparado con lo observado tras la infección con el virus parental.

El hecho que las células endoteliales presenten una sobre-expresión de proteínas involucradas en la trans migración de los macrófagos confirma que este proceso promueve entre otras cosas el acercamiento, *rolling* y la posterior diapédesis de las células del sistema inmune, culminando con la migración de leucocitos hacia el intersticio de los tejidos (Shen et al, 1997). Estos resultados, confirman lo reportado previamente en modelos *in vitro* de infección por DENV, en donde utilizando células HUVEC se demuestra la activación de estas células y la expresión de moléculas de adhesión como ICAM, VCAM y E-Sele en tiempos p.i tempranos (Chaturvedi y Basu, 2008), poniéndose en evidencia que el virus D4MB-6, parece favorecer en mayor medida la activación endotelial, aumentando la transcripción de algunos genes que codifican para proteínas de adhesión o citoquinas en las células endoteliales, comparado con lo observado con el virus parental. Esto significa que el virus D4MB-6 tiene la capacidad de desencadenar en las células endoteliales un proceso de activación que puede favorecer el proceso de trans migración celular, lo que concuerda con los hallazgos *in vivo* reportados por Bastidas 2013, en donde se sugiere que en una fase temprana de la infección se presenta una sobreexpresión de moléculas de adhesión en el endotelio cerebrovascular de los animales inoculados con el D4MB-6, lo que permitió el ingreso de las células inflamatorias activadas que tienen la función de iniciar y amplificar la respuesta inmune en el tejido nervioso (Bastidas, 2013).

Con respecto a lo anterior, diversos estudios han reportado que la expresión de las moléculas de adhesión está relacionada con otro mecanismo de ingreso viral al SNC, conocido como “*Caballo de troya*”, en donde monocitos/macrófagos infectados ingresan al SNC, posiblemente con ayuda de la alteración de la BHE, liberando el virus dentro del parénquima cerebral (Spindler & Hsu, 2012). Por lo tanto, en nuestros modelos de BHE, se evaluó la capacidad de trans migración de las células J774 (monocitos/macrófagos murinos) infectadas o no, sobre endotelio previamente infectado o no infectado.

De esta forma, se observó que solo a partir de las 24 hpi hubo trans migración de las células J774, tal como lo reporto Fletcher et al, 2009, en un modelo de BHE felino, en donde se evidenció el proceso de trans migración de linfocitos a partir de las 24 hpi (Fletcher et al, 2009), independiente de los cambios en la TEER y el aumento de la permeabilidad.

Sin embargo, la trans migración en el modelo de BHE en co-cultivo fue mayor únicamente cuando el endotelio estaba infectado, independientemente de si las células J774 estuvieran o no infectadas. Estos resultados concuerdan con lo reportado durante la infección de células endoteliales de la microvasculatura cerebral humana con el WNV (Verma et al, 2009) y para la JEV (Mishra et al, 2009) y confirman lo reportado por Dalrymple & Mackow, 2012, que sugiere que la infección de las células endoteliales contribuye de forma directa a la patogénesis del virus, modulando vías complementarias que transforman el endotelio en un blanco inmunológico, por lo que en el modelo de BHE en co-cultivo propuesto, la activación endotelial acompañada de la infección de estas células, favorece en mayor medida el mecanismo de caballo de troya; lo anterior difiere de lo postulado por otros investigadores en donde se piensa que la activación *per se* y no la infección de las células favorece la trans migración (Fletcher et al, 2009). Esto ha sido evidenciado en modelos *in vitro* en donde se observó que la infección de las células con el virus de inmunodeficiencia felina (FIV) no fue un estímulo suficiente para incrementar la trans migración de monocitos de sangre periférica (PMBC), siendo las células gliales presentes en el modelo (astrocitos y microglia) quienes parecieron favorecer el proceso de trans migración celular (Hudson et al, 2005).

Lo anterior explica porque se observa un mayor número de J774 trans migradas en el modelo de BHE co-cultivo que en el modelo de BHE en monocapa. Se ha reportado que en ausencia de astrocitos, el número de células trans migradas en modelos *in vitro* de BHE no es significativa, siendo la presencia de los astrocitos lo que favorece la trans migración de células TCD4 y CD8+ gracias a que los astrocitos también expresan moléculas de adhesión como ICAM-1 y secretan citoquinas y quimioquinas como MCP-1 las cuales están altamente relacionadas con el proceso de trans migración celular en estos modelos (Hudson et al, 2005). Esto significa que la presencia de astrocitos favorece la trans migración de células en nuestro modelo y que estos pueden estar directamente implicados en el proceso de ingreso de células inmunes al tejido nervioso (Hudson et al, 2005).

Finalmente, en nuestro estudio, se observó que la infección con el DENV parental y neuradaptado indujo la re-localización de las TJPs Claudina 1 y ZO-1, alteró la TEER, incrementó la expresión de transcritos primarios de citoquinas y algunas moléculas de adhesión e incrementó del transporte paracelular de moléculas, partículas infecciosas y macrófagos. Dado que estos eventos sucedieron en un lapso de 24 hpi, es posible que la alteración de la barrera endotelial fuese debida inicialmente a la pérdida o redistribución de la proteína ZO-1. Estos resultados, coinciden con lo reportado previamente para otros virus neurotrópicos en donde se sugiere que la infección modifica el patrón de expresión, de degradación o de fosforilación de esta proteína, alterando la transducción de señales en las que participa ZO-1 y generando a la pérdida de la función de barrera y en muchos casos a la muerte de las células endoteliales (Spindler y Hsu, 2012).

Toda la evidencia presentada en este trabajo indica que la alteración de la BHE puede ser uno de los mecanismos de entrada del DENV al SNC, el cual parece suceder de forma paracelular tras la relocalización de algunas TJPs, favoreciéndose el paso de partículas virales libres o asociadas a células utilizando el mecanismo de caballo de troya.

8 Conclusiones

- Se estandarizó el protocolo de aislamiento y purificación de células endoteliales de microvasculatura cerebral y de astrocitos de ratones lactantes con un 99% y 95% de pureza respectivamente.
- Se evidenció la expresión de las TJPs ZO-1 y Claudina 1, en su ubicación clásica, lo que fue un indicativo de la integridad de los modelos.
- Los astrocitos de ratón neonato fueron refractarios a la infección con los DENV parental y D4MB-6.
- Las células endoteliales de ratón neonato fueron susceptibles a la infección con el DENV adaptado o no, observándose un 49% de infección con el virus D4MB-6 y 12% con el parental a las 48hpi.
- Se reportaron valores superiores a $1000\Omega/\text{cm}^2$ de TEER, relacionados con la baja permeabilidad en los modelos de BHE en monocapa o co-cultivo utilizando cultivos primarios de ratones neonatos.
- La infección con el DENV adaptado o no, indujo la disminución de la TEER y aumentó de la permeabilidad a partir de las 10 hasta las 48 hpi.
- Los cambios en la funcionalidad de los modelos de BHE *in vitro*, están asociados con la relocalización de las proteínas ZO-1 y Claudina 1, siendo más evidente el daño ocasionado por el virus D4MB-6.
- El virus DENV adaptado o no atraviesa la BHE de forma paracelular.
- Se evidenció la sobreexpresión de los transcritos primarios para algunas moléculas de adhesión y citoquinas, lo que demostró el proceso de alteración y activación endotelial asociada a la infección por DENV.
- La infección con el DENV adaptado o no, indujo la transmigración de células J774, lo que sugiere que el virus utiliza el mecanismo de caballo de troya para favorecer el ingreso del virus al SNC.

9 Perspectivas

- Evaluar si la infección con el virus parental y D4MB-6 induce la degradación o endocitosis de algunas de las TJPs intramembranales.
- Evaluar si la infección con el virus parental o D4MB-6 altera la estabilidad citoarquitectónica de los filamentos de actina en las células endoteliales.
- Evaluar en un modelo de BHE constituido por endotelio, astrocitos y neuronas el proceso de alteración endotelial, de infección neuronal y de trans migración de células inmunes

10 Bibliografía

1. Abbott, N. J. (2002). Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *Journal of Anatomy*, 200, 629–638.
2. Abbott, N. J. (2005). Dynamics of CNS Barriers: Evolution, Differentiation, and Modulation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25 (1), 5-23.
3. Abbott, N. J. (2013). Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of inherited metabolic disease*, 36, 437–449.
4. Abbott, N. J, Patabendige, A. A, Dolman, D. E, Yusof, S. R, & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37, 13–25.
5. Abbott, N. J, Rönnbäck, L. & Hans, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews| Neuroscience*, 7, 41-53.
6. Agrawal T, Sharvani V, Nair D, Medigeshi GR (2013). Japanese encephalitis virus disrupts cell-cell junctions and affects the epithelial permeability barrier functions. *PLoS One*, 24, 8(7)
7. Anderson, R, Wang, S, Osiowy, C, & Issekutz, A. C. (1997). Activation of Endothelial Cells via Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection of Peripheral Blood Monocytes. *Journal of Neurovirology*, 71(6), 4226–4232.
8. Andrews, B. S, Theofilopoulos, A. N, Peters, C. J, Loskutoff, D. J, Brandt, W. E, & Dixon, F. J. (1978). Replication of Dengue and Junin Viruses in Cultured Rabbit and Human Endothelial Cells. *Infection and Immunity*, 776-781.
9. Avirutnan, P., Malasit, P., Seliger, B., Bhakdi, S., & Husmann, M. (1998). Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(11) 6338-46
10. Ballabh, P, Braun, A, & Nedergaar, M. (2004). The blood–brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 16, 1-13.
11. Banks, W. A, & Erickson, M. A. (2010). The blood–brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiology of Disease*, 37, 26–32.
12. Bastidas L, (2013). Identificación de las vías de propagación utilizadas por un virus dengue neuroadaptado para ingresar al sistema nervioso. Tesis de Mestría, Laboratorio de Virología, Universidad El Bosque
13. Basu, A & Chaturvedi, U. C. (2008). Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS immunology and medical microbiology*, 53, 287–299.
14. Bevilacqua, M, Pober, J, Mendrick, D, Cotran, R, & Gimbrone, M. (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 9238-9242.
15. Brown, R. C, Morris, A, & O'Neil, R. G. (2007). Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain research*, 1130, 17-30.

16. Buckner, C. M, Luers, A. J, Calderon, T. M, Eugenin, E. A, & Berman, J. W. (2006). Neuroimmunity and the Blood–Brain Barrier: Molecular Regulation of Leukocyte Transmigration and Viral Entry into the Nervous System with a Focus on NeuroAIDS. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 1, 160–181.
17. Bordignon, J., Strottmann, D. M., Mosimann, A. L., Probst, C. M., Stella, V., Noronha, L,... Dos Santos, C. N. (2007). Dengue neurovirulence in mice: Identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. *Journal of Medical Virology*, 79(10), 1506-1517.
18. Cardier, J. E, Rivas, B, Romano, E, Rothman, A. L, Perez-Perez, C, Ochoa, M, y otros. (2006). Evidence of Vascular Damage in Dengue Disease: Demonstration of High Levels of Soluble Cell Adhesion Molecules and Circulating Endothelial Cells. *Endothelium*, 13, 335–340.
19. Cardoso, F. L, Brites, D, & Brito, M. A. (2010). Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain research reviews*, 1-36.
20. Carlos, T & Harlan, J. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 84(7), 2068-2101.
21. Carman, C. V, Sage, P. T, Sciuto, T. E, de la Fuente, M. A, Geha, R. S, Ochs, H. D, y otros. (2007). Transcellular Diapedesis Is Initiated by Invasive Podosomes. *Immunity*, 26(6), 784–797.
22. Carvey, P, Hendey, B, & Monahan, A. (2009). The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *Journal of Neurochemistry*, 111, 291–314.
23. Chaturvedi, U., Agarwal, R., Elbishbish, E., & Mustafa, A. (2000). Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 28, 183-188.
24. Chaturvedi, U. C, Dhawan, R, Khanna, M, & Mathur, A. (1991). Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. *Journal of General Virology*, 72, 859-866.
25. Chau, T., Quyen, N., Thuy, T., Tuan, N., Hoang, D., Dung, N,... Simmons, C. (2008). Dengue in Vietnamese Infants—Results of Infection Enhancement Assays Correlate with Age-Related Disease Severity. *Journal of Infectious Disease*, 198(4), 516–524.
26. Chen, H. C., Hofman, F. M., Kung, J. T., Lin, Y. D., & Wu-Hsieh, B. A. (2007b). Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *Journal of Virology*, 81(11), 5518-5526.
27. Dalrymple, N. A, & Mackow, E. R. (2012). Roles for Endothelial Cells in Dengue Virus Infection. *Advances in Virology*, 1-8.
28. Dalrymple, N, & Mackow, E. R. (2011). Productive Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells Is Directed by Heparan Sulfate-Containing Proteoglycan Receptors. *Journal of Virology*, 9478–9485.
29. Deli, M. A, Abraham, C. S, Kataoka, Y, & Niwa, M. (2005). Permeability Studies on In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1), 59-127.

30. Demeuse P, Kerkhofs A, Struys-Ponsar C, Knoop B, Remacle C, van den Bosch de Aguilar P, (2002). Compartmentalized coculture of rat brain endothelial cells and astrocytes: a syngenic model to study the blood-brain barrier. *Journal of Neurosciences Methods*. 121(1):21-31.
31. Domingues R. B., Kuster, G. W., Onuki-Castro, F. L., Souza, V. A., Levi, J. E., & Pannuti, C. S. (2008). Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *Journal of the Neurological Sciences*, 267(1-2), 36-40
32. Engelhardt, B, & Sorokin, L. (2009). The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in immunopathology*, 31, 497–511.
33. Feldman, G. J, Mullin, J. M, & Ryan, M. P. (2005). Occludin: Structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 883 – 917.
34. Feng, S, Cen, J, Huang, Y, Shen, H, Yao, L, Wang, Y, y otros. (2011). Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Secreted by Leukemic Cells Increase the Permeability of Blood-Brain Barrier by Disrupting Tight Junction Proteins. *Plos One*, 6(8), 1-11.
35. Fernandez-Borja, M, van Buul, J, & Hordijk, P. (2010). The regulation of leucocyte transendothelial migration by endothelial signalling events. *Cardiovascular Research*, 86, 202–210.
36. Fletcher, N. F, Bexiga, M. G, Brayden, D. J, Brankin, B, Willett, B. J, Hosie, M. J, Jacque J.-M, Callanan J. J, (2009). *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35, 592–602.
37. Furuse, M, Fujita, K, Hiiragi, T, Fujimoto, K, & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141, 1539-1550.
38. Furuse, M, Hirase, T, Itoh, M, Nagafuch, A, Yonemura, S, Tsukita, S, y otros. (1993). Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions. *The Journal of Cell Biology*, 123(6), 1777-1788.
39. González-Mariscal, L, Betanzos, A, Nava, P, & Jaramillo, B. E. (2003). Tight junction proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 81, 1-44.
40. Gulati, S., & Maheshwari, A. (2007). Atypical manifestations of dengue. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH*, 12(9), 1087-1095.
41. Günzel, D, & Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews*, 525-569.
42. Halstead, S. B, & Simasthien, P. (1970). Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale Journal of biology and medicine*, 42, 276-292.
43. Harhaj, N. S, & Antonetti, D. A. (2004). Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 1206–1237.

44. Haseloff, R. F, Blasig, I. E, Bauer, H. C, & Bauer, H. (2005). In Search of the Astrocytic Factor(s) Modulating Blood–Brain Barrier Functions in Brain Capillary Endothelial Cells In Vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1), 25-39.
45. Hawkins, B. T, & Davis, T. P. (2005). The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 173-185.
46. Hicks, K, O'Neil, R. G, Dubinsky, W. S, & Brown, R. C. (2010). TRPC-mediated actin-myosin contraction is critical for BBB disruption following hypoxic stress. *American journal of physiology. Cell physiology* 298, 1583-1593.
47. Hoheisel D, Nitz T, Franke H, Wegener J, Hakvoort A, Tilling T, Galla HJ.(1998). Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 244(1), 312-6.
48. Hu, Y. J, Wang, Y.D, & Tan, F.Q. (2013). Regulation of paracellular permeability: factors and mechanisms. *Molecular biology reports*, 40, 6123-6142.
49. Hung, S. L, Lee, P. L, Chen H. W, Chen L. K, Kao, C. L, King C. C. (1999), Analysis of the steps involved in Dengue Virus entry into host. *Virology* 257, 156-167
50. Hussmann KL, Samuel MA, Kim KS, Diamond MS, Fredericksen BL. (2013). Differential replication of pathogenic and nonpathogenic strains of West Nile virus within astrocytes. *Journal of virology*, 87(5):2814-22.
51. Imbert JL, Guevara P, Ramos-Castañeda J, Ramos C, Sotelo J. (1994), Dengue virus infects mouse cultured neurons but not astrocytes. *Journal of medical virology*, 42(3):228-33.
52. Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V, (2009). Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration. **Journal of Proteome Research**,8(5),2551-62.
53. Keller, A. (2013). Breaking and building the wall: the biology of the blood-brain barrier in health and disease. *The European Journal of Medical Sciences*, 143, 1-13.
54. Kyle, J. L, & Harris, E. (2008). Global spread and persistence of Dengue. *Annual Review of Microbiology*, 62, 71-92.
55. Laia, C. H, Kuob, K. H, & Leo, J. M. (2005). Critical role of actin in modulating BBB permeability. *Brain Research Reviews*, 50, 7-13.
56. Lippmann E. S, Al-Ahmad A, ,,, Shusta E.V (2013) Modeling the blood–brain barrier using stem cell sources. *Fluids and barriers of the CNS* 10(1).
57. Martina, B. E, Koraka, P, & Osterhaus, A. D. (2009). Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical microbiology reviews*, 22, 564–581.
58. Martínez-Gutierrez, M., & Castellanos, J. E. (2006). Dengue hemorrágico, ¿una aberración inmunológica? *Revista de la facultad de medicina*, 11(2), 1-10.

59. Mathur, A, Khanna, N, & Chaturvedi, U. (1992). Breakdown of blood-brain barrier by virus-induced cytokine during Japanese encephalitis virus infection. *International journal of experimental pathology*, 73, 603-611.
60. Mishra, M. K, Dutta, K, Khaleelull, S, Saheb, S. K, & Basu, A. (2009). Understanding the molecular mechanism of blood–brain barrier damage in an experimental model of Japanese encephalitis: Correlation with minocycline administration as a therapeutic agent. *Neurochemistry International*, 55, 717–723.
61. Misra, U, Kalita, J, Syam, U, & Dhole, T. (2006). Neurological manifestations of dengue virus infection. *Journal of the Neurological Sciences*, 244, 117 – 122.
62. Nakaoka, R, & Banks, W. A. (2003). In Vitro Methods in the Study of Viral and Prion Permeability Across the Blood–Brain Barrier. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1), 171-180.
63. Nazli, A, Chan, O, Dobson-Belaire, W, Ouellet, M y otros. (2010). Exposure to HIV-1 Directly Impairs Mucosal Epithelial Barrier Integrity Allowing Microbial Translocation. *Plos Pathogens*, 6(4), 1-20.
64. Nielsen, D. G. (2009). The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virology Journal*, 6(211), 1-7.
65. Nimmerjahn, A. (2009). Astrocytes going live: advances and challenges. *The Journal of physiology*, 1639–1647.
66. Nitz, T., Eisenblatter, T., Psathaki, K., and Galla, H.-J. (2003). Serum-derived factors weaken the barrier properties of cultured porcine brain capillary endothelial cells in vitro. *Brain Research*. 981, 30–40.
67. OMS, & TRD. (2009). Dengue, guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. *Programa regional de dengue*, 1-170.
68. Pekny M, Stanness KA, Eliasson C, Betsholtz C, Janigro D.(1998), Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia*, 4, 390-400.
69. Perrière, N, Demeuse, P, Garcia, E, Regina, A, Debray, M, Andreux, J. P, y otros. (2005). Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood–brain barrier-specific properties. *Journal of Neurochemistry*, 93, 279–289.
70. Persidsky, Y, Ramirez, S, Haorah, J, & Kanmogne, G. (2006). Blood–brain Barrier: Structural Components and Function Under Physiologic and Pathologic Conditions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1, 223–236.
71. Puschmann, T. B., Dixon, K. J, & Turnley, A. M. (2010). Species Differences in Reactivity of Mouse and Rat Astrocytes in vitro. *Neurosignals*(18), 152-163.
72. Roe, K, Kumar, M, Lum, S, Orillo, B, Nerurkar, V. R, & Verma, S. (2012). West Nile virus-induced disruption of the blood–brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *Journal of General Virology*, 93, 1193–1203.
73. Rubin, L. L, Hall, D. E, Porter, S, Barbu, K, Cannon, C, Homer, H. C, y otros. (1991). A Cell Culture Model of the Blood-Brain Barrier. *The Journal of Cell Biology*, 115, 1725-1735.

74. Schreibelt, G, Kooij, G, Reijkerker, A, van Doorn, R, Gringhuis, S. I, van der Pol, S, y otros. (2007). Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *The FASEB Journal*, 21, 3666-3676.
75. Shen J, T-To SS, Schrieber L, King NJ (1997), Early E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and late major histocompatibility complex antigen induction on human endothelial cells by flavivirus and comodulation of adhesion molecule expression by immune cytokines. *Journal of Virology*. 71(12), 9323-32
76. Sips, G. J., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2012). Neuroinvasive flavivirus infections. *Reviews in Medical Virology*, 22(2), 69-87.
77. Solomon, T. (2004). Flavivirus encephalitis. *The New England Journal of Medicine*, 351(4), 370-378
78. Sofroniew, M. V, & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathology*, 7-35.
79. Spindler, K. R, & Hsu, T. H. (2012). Viral disruption of the blood–brain barrier. *Trends in Microbiology*, 1-9.
80. Srikiatkachorn, A. (2009). Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thrombosis and haemostasis 2009*, 102, 1042–1049.
81. Skaper, S. D, Argentini, C, Barbierato, M. (2012) Culture of Neonatal Rodent Microglia, Astrocytes, and Oligodendrocytes from Cortex and Spinal Cord. *Neurotrophic Factors: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 846, 67-77.
82. Stamatovic, S. M, Keep, R. F, Kunkel, S. L, & Andjelkovic, A. V. (2003). Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction ‘opening’: signaling via Rho and Rho kinase. *Journal of Cell Science*, 116(22), 4615-4627.
83. Stevenson, B. R, & Keon, B. H. (1998). The tight junction: Morphology to molecules. *Annual review of cell and developmental biology*, 14, 89-109.
84. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I (2004). IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *Journal of general virology*, 85(Pt 7):1801-13.
85. Tao-Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW, (1998). Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *Journal of Neurosciences*, 10, 3293-9.
86. Tilling, T., Korte, D., Hoheisel, D., and Galla, H.-J. (1998). Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *Journal of Neurochemistry*. 71,1151–1157.
87. Togashi, H, Sakisaka, T, & Takai, Y. (2009). Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell adhesion & Migration*, 3(1), 29-35.
88. Varatharaj , A. (2010). Encephalitis in the clinical spectrum of dengue infection. *Neurology India*, 58(4) 585-559
89. Velandia, M. L. (2012). Desarrollo de un modelo experimental para evaluar la neuro e inmunopatogenia por virus dengue. Bogotá: Tesis doctoral-Universidad Nacional de Colombia.
90. Velandia, M. L, & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33-43.
91. Velandia, M. L, Acosta-Losada, O, & Castellanos, J. E. (2012). In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. *Journal of neurovirology*, 18, 374–387.

92. Verma, S, Lo, Y, Chapagain, M, Lum, S, Kumar, M, Gurja, U, y otros. (2009). West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology*, 385, 425–433.
93. Wang JL, Zhang JL, Chen W, Xu XF, Gao N, Fan DY, An J (2010), Roles of small GTPase Rac1 in the regulation of actin cytoskeleton during dengue virus infection. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 31;4(8).
94. Weidenfeller, C, Schrot, S, Zozulya A, Galla H. J. (2005) Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Research* 1053, 162 – 174.
95. Weiss, N, Miller, F, Cazaubon, S, & Couraud, P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 842–857.
96. Weksler, B. B, Subileau, E. A, Perrière, N, Charneau, P, Holloway, K, Leveque, M, y otros. (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *The FASEB Journal*, 1-26.
97. Wilhelm, I, Fazakas, C, & Krizb, I. A. (2011). In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 71, 113–128.
98. Whitehorn J, Simmons CP (2011). The pathogenesis of dengue. *Vaccine*, 29(42), 7221-8.
99. Wolburg H, Neuhaus J, Kniessel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C, Risau W (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *Journal of Cell Science*. 107 (Pt 5):1347-57.
100. Xu, Z, Waeckerlin, R, Urbanowski, M. D, van Marle, G, Hobman, T. C, (2010). West Nile Virus infection causes endocytosis of a specific subset of tight junction membrane proteins. *Plos One*, 7 (5), 1-11
101. Yábar, C. (2003). Rol de las proteínas no estructurales en los eventos de replicación del ARN del virus Dengue: propuesta de un modelo de replicación del ARN. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 20(1), 51-57.
102. Yang, C. M, Lin, C. C., Lee, I. T, Lin, Y. H., Yang, C. M, Chen, W. J, y otros. (2012). Japanese encephalitis virus induces matrix metalloproteinase-9 expression via a ROS/c-Src/ PDGFR/PI3K/Akt/MAPKs-dependent AP-1 pathway in rat brain astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 9(12), 1-15.
103. Yang, Y, Estrada, E. Y, Thompson, J. F, Liu, W, & Rosenberg, G. A. (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 27, 697–709.
104. Yauch, L.E, Shresta S , (2008). Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Research* 0(2):87-93
105. Zhang, Z, (2010). Blood-Brain Barrier in vitro Model: A Tissue Engineering Approach and Validation. *FIU Electronic Theses and Dissertations*. Paper 246, 1-136.
106. Zenker D, Begley D, Bratzke H, Rübsamen-Waigmann H, von Briesen H. (2003). Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. *The Journal of Physiology*, 551(Pt 3), 1023-32.

ANEXO 1

LISTADO DE SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LOS CULTIVOS CELULARES

1. Cultivo de células endoteliales

Solución	Sigla	Contenido	Marca- Código
Solución de digestión 1		a. DNAsa Tipo I (0.15 ng/ml).	MP biomedicals, 0210057401
		b. Colagenasa Tipo I (1 mg/ml)	Gibco-Invitrogen, 17100017
		Resuspender en medio DMEM/F12.	Sigma, D6421
Solución de parada	SP	a. DMEM suplementado con SFB al 5% inactivado por calor a 56°C	Gibco-Invitrogen,16000044
Solución de albúmina sérica bovina	BSA	a. BSA al 20%	Sigma, A2153
		Resuspendido en DMEM/F12	Sigma, D6421
Solución de digestión 2		a. DNAsa Tipo I (0.06 ng/ml)	MP biomedicals, 0210057401
		b. Colagenasa (1mg/ml)	Gibco-Invitrogen, 17100017
		c. Dispasa (1mg/ml)	MP biomedicals, 0219502205
		Resuspendida en DMEM/F12	Sigma, D6421
Buffer fosfato salino 10X	PBS	a. Fosfato Monobásico de sodio (17mM)	Sigma, S5011
	10X	b. Fosfato dibásico de sodio (91mM)	Sigma, S5136
		c. Cloruro de sodio (1.5M)	Sigma, S5886
		Resuspendido en agua G1 y esterilizado	
Gradiente de percoll al 33%		a. 10% de PBS10X	
		b. 10% de SFB	Gibco-Invitrogen,16000044
		c. Percoll al 33%	Sigma, P1644
		Diluido en PBS 1X	
Solución de colágeno		a. Colágeno IV (5mg/ml)- solución stock.	Sigma, C5533
		Resuspendida en Ácido acético estéril 0,1N	Sigma, A9967
		Preparar alícuotas de 1mg/ml	
Matriz extracelular endotelial		a. Colágeno IV, 10µg/ml	Sigma, C5533
		b. Fibronectina, 10 µg/ml	Invitrogen, PHE0023
	MP-D	a. SFB al 20%.	Gibco-Invitrogen,16000044

Medio de cultivo Pre-Definido		b. Penicilina-Estreptomicina, 10.000U/mL	Gibco/Invitrogen, 15140122
		c. Glutamax, 0.7mM.	Gibco/Invitrogen, 35050061
		d. Puomicina, 3µg/ml	Invitrogen, A1113803
		Diluidos en DMEM/F12	Sigma, D6421
Medio de cultivo Definido MD		a. SFB 20%.	Gibco-Invitrogen, 16000044
		b. Penicilina-Estreptomicina (10.000U/mL)	Gibco/Invitrogen, 15140122
		c. Glutamax (0,7mM).	Gibco/Invitrogen, 35050061
		d. Heparina, 15U/ml.	MP biomedicals, 101931
	bFGF	e. Factor de crecimiento fibroblástico (1ng/ml)	Sigma, F0291
		Diluidos en DMEM/F12.	Sigma, D6421
Medio condicionado de astrocitos	MCA	Sobrenadante de cultivo de astrocitos confluente	
Solución de disociación 1	SD1	a. Tripsina al 1%	Sigma, T4799
		EDTA (1 mM)	Sigma, E9884
		Diluido en PBS 1X	
Solución de criopreservación	SC	a. Dimetil-sulfoxido (DMSO) al 10%.	Sigma, D8418
		Diluido en medio MD	

2. Cultivo de astrocitos

Solución	Sigla	Contenido	Marca, Código del reactivo
Solución de digestión 3		a. Glutamax (0,7mM)	Gibco/Invitrogen, 35050061
		b. Colagenasa (2mg/ml)	Gibco-Invitrogen, 17100017
		d. Dispasa (2mg/ml)	MP biomedicals, 0219502205
		e. L-cisteina (0,72mg/ml)	Merck- Millipore, 2430
		f. DNAsa I (0,4mg/ml)	MP biomedicals, 0210057401
			Diluidos en DMEM
Solución Ovomucoide		a. Glutamax (0,7mM)	Gibco/Invitrogen, 35050061
		b. DNAsa (0,4mg/ml)	MP biomedicals, 0210057401
		c. BSA (0,15mg/ml)	Sigma, A2153
		d. Inhibidor de tripsina (3mg/ml)	Sigma, T0256
			Diluidos en DMEM.

Medio de cultivo	MC	a. SFB al 10%	Gibco-Invitrogen, 16000044
		b. Penicilina-Estreptomicina (10.000U/mL)	Gibco/Invitrogen, 15140122
		Diluidos en DMEM	Sigma, D1152
Solución de disociación 2	SD2	a. Tripsina (0.25%)	Sigma, T4799
		b. EDTA (0.5mM)	Sigma, E9884
		Diluidos en PBS 1X	
Matriz extracelular de astrocitos	a. Poly-L-Lisina, 10µg/ml		Sigma, P6282
	Resuspendida en agua Grado I estéril		

3. Otras soluciones

Solución	Sigla	Contenido	Marca, Código del reactivo
Buffer glicina		a. NaCl (0.136M)	Sigma, S5886
		b. KCl (5mM)	Carlo Erba, CH0227
		c. MgCl ₂ ·6H ₂ O (0.49mM)	JT Baker, 4003
		d. CaCl ₂ (0.68mM)	Merck, 102379
		Glicina (99.9mM)	JT Baker, 4057
		Resuspendidos en 1L de PBS 1X	
		Ajustar el pH a 3.0 con HCl 1N	
Cristal violeta		a. Cristal violeta 1gr por cada 100ml de solución.	Molecular Probes, 152511
		Resuspender en 70% de metanol y 30% de Agua desionizada estéril.	JT Baker, 9070

ANEXO 2

LISTADO DE ANTICUERPOS PRIMARIOS, SECUNDARIOS Y ESTREPTAVIDINAS

ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAR LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE DE ENDOTELIO				
	Anticuerpo primario	Origen	Concentración de uso	Marca
1	ZO-1	Conejo	1:40	Invitrogen
2	Factor von Willebrand	Conejo	1:50	Abcam
3	VCAM	Conejo	1:300	Santa Cruz
4	PECAM	Cabra	1:300	Santa Cruz
5	ICAM	Cabra	1:300	Santa Cruz
6	E-selectina	Conejo	1:300	Santa Cruz
7	Claudina 1	Cabra	1:300	Santa Cruz
8	Ocludina	Conejo	1:300	Santa Cruz

ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA ACARATERIZAR LOS CULTIVOS DE ASTROCITOS				
	Anticuerpo primario	Origen	Concentración de uso	Marca
1	GFAP	Conejo	1:500	Dako
2	GLT-1	Conejo	1:200	Sigma

ANTICUERPO PRIMARIO PARA LA DETECCIÓN DE DENV				
	Anticuerpo primario	Origen	Concentración de uso	Marca
1	Anti Encephalitis de St. Louis MAB8744	Ratón	1:100	Millipore

ANTICUERPOS SECUNDARIOS, ESTREPTAVIDINAS Y HOESCHTT				
	Anticuerpo secundario	Fluoróforo	Concentración de uso	Marca
1	Anti-Conejo Biotinilado	*NA	1:200	Vector
2	Anti-Cabra Biotinilado	*NA	1:200	Vector
3	Anti-ratón Biotinilado	*NA	1:200	Vector
4	Estreptavidina-Alexa 594	Rojo	1:600	Invitrogen
5	Estreptavidina-Cy5	Fucsia	1:20	Invitrogen
6	Estreptavidina-FITC	Verde	1:200	Vector
7	Hoeschtt	Azul	1:1000	Sigma

*NA: No aplica.

ANEXO 3
SECUENCIAS DE LOS PRIMERS

	Proteína		Primers (5'-->3')	Amplicón (pb)	Secuencia (NCBI)
Moléculas de adhesión	VCAM	forward	CCC GAA CTC CTT GCA CTC TA	116	NM_011693.3
		reverse	TGT GCC TCC ACC AGA CTG TA		
	PECAM	forward	TCA CCA TCA ACA GCA TCC AT	115	L06039.1
		reverse	TGA GAC CTG CTT TTC GAG GT		
TJP	ZO-1	forward	GGA TGG TGC TAC AAG TGA TG	137	NM_009386.2
reverse		CGC CTT CTG TAT CTG TGT CT			
Citoquina	TNF- α	forward	TGA AGG GAA TGG GTG TTC AT	142	NM_013693.2
reverse		GAG TTG GAC CCT GAG CCA TA			
Quimioquina	MCP-1	forward	AGC ACC AGC CAA CTC TCA CT	136	NM_011333.3
		reverse	CGT TAA CTG CAT CTG GCT GA		
Housekeepin	β -actina	forward	ATC CTC TTC CTC CCT GGA GA	233	NM_007393.3
		reverse	TGC CTG GGT ACA TGG TGG TA		

Proteína	Primers (5'-->3')		Amplicón (pb)	Secuencia (NCBI)	
M del DENV	Primera ronda	forward	GAT GAG GGA AGA TGG GGA GTT GTT AGT CTG TGT GGA CCG AC	670	- JX024758.1
		reverse	TAC ATG ACC CAG GTR GAC GT		
	Segunda Ronda	forward	CAA CAA ATG CAC YCT YAT TGC CA	137	- -
		reverse	TAC ATG ACC CAG GTR GAC GT		

Los primers fueron diseñados utilizando el programa Primer 3® y confirmados con ayuda del programa Primer versión 1.01, serial number 50059, Scientific & Educational software.

ANEXO 4

PROGRAMAS DE AMPLIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES TRANSCRITOS

Proteína	Programa de amplificación qRT-PCR	No. Ciclos
VCAM	50°C-15min, 95°C-5min, 94°C-30seg, 60°C-30 seg, 40°C-1min. Meltin Curve 65°C-95°C	40
PECAM	50°C-15min, 95°C-5min, 94°C-30seg, 55°C-30 seg, 40°C-1min. Meltin Curve 65°C-95°C	40
ZO-1	50°C-15min, 95°C-5min, 94°C-30seg, 60°C-30 seg, 40°C-1min. Meltin Curve 65°C-95°C	40
TNF- α	65°C-15min, 95°C-5min, 94°C-30seg, 60°C-30 seg, 40°C-1min. Meltin Curve 65°C-95°C	40
MCP-1	55°C-15min, 95°C-5min, 94°C-30seg, 60°C-30 seg, 40°C-1min. Meltin Curve 65°C-95°C	40
Virus	50°C-15min, 95°C-5min, 94°C-30seg, 60°C-30 seg, 40°C-1min. Meltin Curve 65°C-95°C	40
β -actina	50°C-15min, 95°C-5min, 94°C-30seg, 50°C-30 seg, 40°C-1min. Meltin Curve 65°C-95°C	40