"Evaluación *in vitro* de los agentes neurotóxicos liberados por las células de la microglía, infectadas con el virus dengue neuroadaptado (D4MB-6)".

EDGAR ORLANDO BELTRÁN ZÚÑIGA

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas Facultad de Ciencias Universidad El Bosque Bogotá - Colombia 2016 "Evaluación *in vitro* de los agentes neurotóxicos liberados por las células de la microglía, infectadas con el virus dengue neuroadaptado (D4MB-6)".

EDGAR ORLANDO BELTRÁN ZÚÑIGA

Trabajo de grado para obtener el título de

Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

MYRIAM LUCÍA VELANDIA ROMERO

Directora. Lic. Biología, MSc Ciencias Biológicas, PhD Ciencias Químicas

JAIME EDUARDO CASTELLANOS

Co-director. OD, MSc Ciencias Farmacológicas, PhD Ciencias Químicas

Grupo de Virología- Universidad El Bosque Facultad de Ciencias Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas Bogotá - Colombia 2016

RESUMEN

La infección causada por el virus del dengue (DENV) se ha relacionado con el desarrollo de alteraciones neurológicas y comportamentales en humanos. Dicha asociacione se ha confirmado por el desarrollo de signos claros de alteración neurológica durante y después de la infección y por la presencia de proteínas y/o RNA viral en líquido cefaloraquídeo o en muestras de tejido nervioso obtenidas post morten. Esto sugiere que el virus puede invadir el Sistema Nervioso Central (SNC).

Por la dificultad de reproducir los signos y síntomas del dengue en animales, nuestro grupo desarrolló un modelo *in vivo* de neuroinfección en el cual ratones neonatos se inocularon a nivel periférico con una cepa de virus adaptada a tejido nervioso (D4MB-6). Como resultado, se observó que la variante viral logró invadir el SNC e infectó algunas poblaciones celulares como neuronas, oligodendrocitos y células de la microglía. Estas últimas presentaron evidentes cambios morfológicos que sugerían activación. Adicionalmente se observó que en el tejido nervioso de animales infectados la infección indujo una exacerbada respuesta inmune y la excitotoxicidad por glutamato, espectos que en conjunto causaron la muerte neuronal y el daño en la arquitectura tisular. Sin embargo, la población celular del tejido nervioso que secreta estas moléculas no ha sido identificada aún.

Experimentalmente se ha demostrado que en diferentes patologías -incluso viralesla principal fuente de citoquinas pro-inflamatorias, glutamato y otros agentes provienen de las células de la microglía infectadas y/o activadas. Todos los agentes producidos y liberados por estas células, pueden de manera conjunta o independiente ocasionar el daño y la muerte neuronal. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó en un cultivo primario de células de la microglía de ratón lactante, su susceptibilidad a la infección con la variante adaptada -D4MB-6- o no a tejido nervioso y algunos aspectos relacionados con su activación.

Como resultado se observó que las células microgliales presentaron una alta susceptibilidad a la infección y en los tiempos post-infección evaluados presentaron altas tasas de proliferación y supervivencia. Adicionalmente se observó que las células presentaron cambios morfológicos y produjeron algunas moléculas proinflamatorias y glutamato, que indujeron a las células a sostener en los tiempos evaluados un estado de activación que fue modulado y regulado por los fármacos VPA o MK-801.

En conjunto estos resultados permitieron describir que la infección por DENV indujo la activación y producción de agentes pro-inflamatorios y glutamato por parte de las células de la microglía, por lo tanto, sugerimos que estas células son centrales en el desarrollo de la nueuroinfección y neuropatogenia causada por el DENV.

Palabras clave: Células de la microglía, neuropatogenia, DENV, virus neuroadapatado, activación celular.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre			
1	Purificación del cultivo primario de células de la microglía.			
2	Evaluación morfológica del cultivo.			
3	Determinación del porcentaje de pureza del cultivo de células de la microglia.	24		
4	Detección de la proteína E del DENV en células de la microglía.	29		
5	Porcentaje de células de la microglía infectadas con los virus DENV-4 o D4MB-6 en los diferentes tiempos evaluados	30		
6	Inmunomarcaje para la proteína NS1 del DENV en células de la microglia infectada.	31		
7	Detección de transcritos para las proteínas de Cápside y NS1 del DENV.	32		
8	Capacidad infecciosa de los virus liberados en sobrenadantes de microglía.	32		
9	Actividad metabólica de las células de la microglia expuestas a los diferentes controles y evaluadas por las técnicas de MTT (A) o Resazurina (B).	34		
10	Actividad metabólica de las células de la microglia expuestas a los diferentes virus DENV-4 o D4MB-6 y evaluadas por las técnicas de MTT (A) o Resazurina (B).	35		
11	Evaluación de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial en células de la microglía infectadas y sus controles por TMRE.	36		
12	Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en células de la microglia infectada.	36		
13	Esquema representativo de los tratamientos de las células de la microglía con los fármacos VPA o MK-801.	39		
14	Inmunoperoxidasa para Griffonia simplicifolia (IB4) sobre células de la microglía infectadas o no infectadas.	41		
15	Cuantificación de citoquinas por CBA en los sobrenadantes de las células de la microglía infectadas	43		
16	Evaluación de los transcritos de activación (F4/80, Iba-1) citoquinas (IFN-β, IL-6, IL-10, iNOS, TNF-α), quimoquinas (MCP-1) y moléculas de adhesión (ICAM) en las células de la microglía infectadas y sus controles.	44		
17	Cuantificación de los transcritos para TNF-a, IL-6, MCP-1 e INOS en las células de la microglía infectadas con el D4MB-6 a las 72 hpi.	45		
18	Cuantificación de glutamato intracelular en las células de la microglía infectadas con el D4MB-6 en los tres tiempos evaluados.	46		

19	Evaluación de la supervivencia de las células de la microglia infectadas y tratadas con los fármacos MK-801 o VPA.	47
20	Evaluación de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial (TMRE) y producción de LDH en células de la microglía infectadas y tratadas con los fármacos MK-801 y VPA.	48
21	Cuantificación de citoquinas y quimoquinas por CBA en los sobrenadantes de células de la microglía infectadas y tratada con MK-801 o VPA	49
22	Disminución en la expresión de los transcritos para TNF-α, IL- 6, MCP-1 e INOS en las células de la microglia infectadas y tratadas con los fármacos MK-801 y VPA.	50
23	Efecto de los fármacos MK-801 o VPA en la cuantificación de glutamato.	51

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCION	8
2.	MARCO TEÓRICO	9
	2.1 Patogénesis de la infección por el virus del dengue	9
	2.2 Introducción a las células de la microglía	. 10
	2.3 Características fenotípicas de las células de la microglía	. 11
	2.4 Activación de las células de la microglía	. 12
	2.5 Excitotoxicidad por glutamato liberado por las células de la microglía	. 14
	2.6 Producción de mediadores citotóxicos por las células de la microglía	. 15
	2.7 Inhibición de la respuesta inflamatoria y la excitotoxicidad por glutamato	. 16
1.	Objetivos	18
	3.1 Objetivo general	. 18
	3.2 Objetivos específicos	. 18
2.	JUSTIFICACIÓN	19
2		20
э.	Objetivo específico 1. Obtener, purificar y caracterizar cultivos primari	05
	de células de la microglía a partir de ratones neonatos.	.20
	5.1.1 Obtención de los cultivos primarios de células de la microalía	. 20
	5.1.1 Detección por inmunofluorescencia (IF) de los marcadores CD11b. OX2R e IBA-1	. 21
	5.2. Resultados.	.22
	5.2.1 Establecimiento y caracterización de los cultivos primarios de las células de la microglía	
	obtenidas a partir de ratones lactantes	. 22
	5.2.1.1 Obtención v purificación del cultivo.	.22
	5.2.1.2 Caracterización de la población celular	. 22
	Objetivo específico 2. Determinar la susceptibilidad de las células de l	a
	microglía a la infección por D4MB-6 y su efecto en la proliferación y	-
	supervivencia.	.25
	5.3.1 Obtención del virus neuroadaptado	. 25
	5.3.2 Evaluación de la susceptibilidad a la infección con el virus D4MB-6 en células de la	
	microglía	. 25
	5.3.3 Detección de antígeno viral por IFI en células de la microglía	. 25
	5.3.4 Evaluación de la producción de virus DENV en células de la microglía	. 26
	5.3.5 Evaluación de la expresión de transcritos virales por RT-PCR.	. 26
	5.3.6 Ensayos supervivencia celular por MTT y resazurina	. 27
	5.3.7 Ensayo de Tetrametilrodamina, ester etílico (TMRE)	. 27
	5.3.8 Evaluación de la supervivencia de las células de la microglía por Calceina	. 27
	5.3.9 Ensayo de actividad de la Lactato deshidrogenasa (LDH)	. 28
	5.3.10 Análisis estadístico	. 28
	5.4 Resultados	. 29
	5.4.1 Susceptibilidad a la infección	. 29
	5.4.2 Evaluación de la viabilidad y proliferación de las células de la microglía infectadas con e	el -
	virus D4MB-6	. 33

	Objetivo 3. Describir los cambios en la expresión de mediadores pro- inflamatorios y en los niveles de glutamato en sobrenadantes de célula de la microglía infectados con D4MB- 6.	as . 38
	5.5.1 Evaluación de los cambios morfológicos inducidos por el D4MB-6 en las células de la	
	microglía	. 38
	5.5.2 Cuantificación de citoquinas por el ensayo Cytometric Bead Array (CBA)	. 38
	5.5.3 Evaluación y cuantificación de transcritos para citoquinas, moléculas de adhesión e iNO.	S
	por qRI-PCR.	. 38
	5.5.4 Cuantificación de giutamato	. 38
	sitoquinas proinflamatorias on las células de la microalía infectadas con el DAMB 6	20
	5 5 6 Análisis estadístico	. 39 40
	5.6 Resultados	. 40
	5.6.1 Activación de las células de la microglía infectadas con el virus D4MB-6	. 41
	5.6.2 Producción de citoquinas	. 42
	3.6.3 Producción de glutamato	. 45
	5.6.4 Efecto de los fármacos MK-801 o VPA en la activación de las células de la microglia	
	infectadas	. 46
	5.6.5 Actividad métabolica medida por MTT en las células de la microglía infectadas y tratado	זג
	con los fármacos	. 46
	5.6.6 Efecto de los fármacos en el potencial de membrana mitocondrial de las células de la	
	microglia infectadas	. 47
	5.6.7 Producción de citoquinas en las celulas de la microglia tratadas	. 48 n1
	o VPA	. 51
4.	DISCUSIÓN	. 52
5.	CONCLUSIONES	. 57
6.	PERSPECTIVAS	. 58
7.	BIBLIOGRAFIA	. 59
8.	ANEXOS	. 68

1. INTRODUCCION

El número de reportes que involucran al DENV en alteracions del SNC ha ido en aumento en las dos últimas décadas. Esto sugiere que el tropismo viral y el perfil clínico asociado a la infección están cambiando, y de esta forma queda en evidencia la capacidad de este patógeno de acceder y afectar el tejido nervioso.

Son pocos los modelos que explican los mecanismos asociados al desarrollo de la neuropatogénia del DENV, por lo tanto, nuestro grupo establecio un modelo de neuroinfección en ratones inmunocompetentes utilizando una cepa de DENV-4 neuroadaptada denominada D4MB-6, la cual tras ser inoculada periféricamente, ingresó al sistema nervioso, e indujo signos de enfermedad similares a los observados en humanos. Este virus, infectó un gran número de células neuronales y no neuronales y entre estas últimas se identificarón las células de la microglía, las cuales presentaron un fenotipo que sugería activación celular.

Estudios de infección realizados con diferentes virus, incluidos los de la familia *Flaviviridae* – a la que pertenece el DENV-, han demostrado que bajo el estado de activación, las células de la microglía establecen una respuesta inmune local, liberando una gran cantidad de moléculas pro-inflamatorias y citotóxicas que buscan defender al tejido de la infección. Sin embargo, si son producidas de manera crónica, agravan y complican la neuropatogenia inducida por estos virus.

Por lo tanto, este trabajo evaluó y caracterizó in vitro la infección y producción de agentes neurotóxicos producidos por las células de la microglía murinas inoculadas con la variante viral D4MB-6. Para tal fin, el virus neuroadaptado fue inoculado sobre células de la microglia obtenidas de cerebro de ratón Balb/C de 7 dpn, luego, se evaluó por inmunofluorescencia (IF) y PCR la suceptibilidad a la infección. Se observó que las células de la microglía fueron altamente susceptibles a la infección y en ellas el virus se replicó y liberó eficientemente en los tiempos post-infección (p.i) evaluados. Adicionalmente se observaron evidentes cambios morfológicos, que sugieren activación. Esta última, se confirmó de manera directa e indirecta. La evaluación directa se llevó a cabo en un grupo de células infectadas en las cuales se detectó la sobrexpresión de las proteínas y/o los transcritos para algunas moléculas pro-inflamatorias como TNF-a, IL-6, MCP-1 e iNOS y un aumento considerable de glutamato intracelular. La evaluación indirecta se realizó mediante la administración de los fármacos VPA o MK-801 a las células infectadas. Como resultado se observó la disminución en la producción de las proteínas y/o los transcritos de todas las moleculas pro-inflamatorias y en la producción de glutamato intracelular.

En conjunto estos resultados nos permiten describir que la infección por DENV indujo la activación y producción de agentes pro-inflamatorios y glutamato por parte de las células de la microglía, por lo que se ubica a estas células en el centro de la nueuroinfección y neuropatogenia causada por el DENV.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Patogénesis de la infección por el virus del dengue.

Los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1 al 4) son virus RNA, de polaridad positiva de aproximadamente 11 kilobases, que pertenecen al serocomplejo dengue del género Flavivirus, familia F*laviviridae*. Estos virus son los agentes causales del dengue, que afecta aproximadamente entre 50 a 100 millones de personas cada año a nivel mundial, convirtiéndose en el agente viral transmitido por vectores de mayor importancia en salud pública. El *Aedes aegypti* es el mosquito transmisor, y una vez inocula el virus, se infectan las células dendríticas quienes producen la primera progenie viral, capaz de diseminarse a otras células.

El RNA genómico sintetizado a nivel intracelular codifica una única poliproteína la cual es clivada de forma co-traduccional dando origen a tres proteínas estructurales, cápside (core, C), proteína precursora asociada a la membrana (prM), proteína de la envoltura (E) y 7 proteínas no estructurales (NS, non structural) denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Chambers et al., 1990; Velandia & Castellanos, 2011). Las proteínas no estructurales del virus son de gran importancia en la replicación y ciclo celular viral, mientras que el ensamblaje de las proteínas estructurales promueve el desplazamiento y diseminación a otros tejidos.

La incidencia de infecciones asociadas a este patógeno ha aumentado 30 veces en los últimos 50 años, causando patologías que cursan con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde asintomáticas hasta entidades más complejas como el dengue con signos de alarma y dengue grave (Organización Mundial de la Salud, 2009; Bhatt et al., 2013).

Evidencia reciente sugiere que el DENV es capaz de replicarse en medula ósea y células endoteliales, además de su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, sin embargo aspectos relacionados con este proceso de invasión al SNC y de la cinética de replicación en este tejido aún no ha sido documentada (Gubler, 2010). Las infecciones por DENV que involucran el SNC pueden cursar de forma subclínica (Cabrera et al., 1984).), sin embargo aproximadamente el 10% de ellas pueden desarrollar manifestaciones neurológicas que dejan en evidencia el neurotropismo del virus (Velandia & Castellanos, 2012; Sahu et al., 2014; Verma et al., 2014). Estas fueron reportadas inicialmente en India, y hasta la fecha un número creciente de estudios clínicos han señalado que alrededor del 14% de las personas en la fase febril aguda y virémicas, presentaron síntomas o signos neurológicos asociados a la infección (Kumar et al., 2008). Estos signos se caracterizan por encefalopatías, encefalitis, síndromes mediados por el sistema inmune, disfunción muscular, desordenes neuro- oftálmicos (Carod-Artal, et al., 2013), convulsiones comportamentales (Araújo et al., (Estrada. 1983). desordenes 2012). polineuropatías (García-Rivera & Rigau-Perez, 2002), síndrome de Guillain Barré (Santos, 2004), entre otros.

Los estudios moleculares que permitan identificar porque este virus puede tornarse neuroinvasivo y neurovirulento son escasos, debido –entre otros-, a la incapacidad del virus silvestre de infectar los animales de experimentación. Razón por la cual se ha propuesto por un lado el uso de cepas murinas inmunosuprimidas genética o farmacológicamente, o mediante el uso de cepas de DENV modificadas para simular y reproducir los signos y síntomas neurológicos reportados en humanos.

Por esta razón en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo in vivo de neuroinfección en el que ratones de diferentes edades posnatales (dpn), fueron inoculados intraperitonealmente con una variante neuroadaptada de DENV (D4MB-6). Solo en los animales de 2 y 7 dpn y el virus indujo encefalitis, acompañada de parálisis e inestabilidad postural. Además, por inmunohistoquímica se observó la infección de neuronas, oligodendrocitos, células endoteliales y células de la microglía, estas últimas junto a los astrocitos, mostraron cambios morfológicos asociados a la activación inmune, se observó la sobreexpresión de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Interferón gamma (IFN-Y) y de la quimioquina MCP-1, los cuales pudieron intensificar la respuesta inmune tisular local y favorecer el infiltrado de monocitos y la activación glial. Todos estos cambios en conjunto pudieron contribuir en diferente medida al deterioro de la arguitectura, funcionalidad tisular y muerte neuronal. Adicionalmente, se encontró que la infección indujo la excitotoxicidad por glutamato, la cual al parecer junto a la respuesta inmune local y sistémica, pudieron inducir el daño y la muerte neuronal generalizada (Velandia et al., 2012; Camacho, 2015).

El aumento en la producción de mediadores inflamatorios y la excitotoxicidad por glutamato en este modelo, inicialmente podrían explicarse por la susceptibilidad a la infección de distintos tipos celulares, y a la capacidad de todos ellos, de producir estos mediadores o de modificar su fisiología frente a la infección o a la respuesta establecida en contra de ella. Por ejemplo, algunos estudios al respecto sugieren que además de las neuronas, los astrocitos y las células de la microglía son las principales células productoras de moléculas proinflamatorias y glutamato. Sin embargo, estas dos últimas poblaciones divergen en su respuesta ante patógenos u otros agentes inflamatorios (Saura, 2007). Además, en cultivos mixtos de astrocitos y microglía se ha observado que las células de la microglía -aunque son minoría en el cultivo-, son las principales productoras de moléculas proinflamatorias y de óxido nítrico (NO) (Saura, 2007). Confirmando lo reportado in vivo, donde se ha visto que las células de la microglía pese a encontrarse en bajas proporciones (entre un 5 y 20% respecto al número total de células del tejido), son las principales productoras de sustancias proinflamatorias frente a diferentes patologías del tejido nervioso (Giulian & Baker, 1986).

2.2 Introducción a las células de la microglía.

El cerebro alberga fisiológicamente varias poblaciones de origen mieloide que incluyen las células perivasculares, los macrófagos meníngeos y del plexo coroideo, y la microglía. Debido a su origen común, estas células comparten

indiscriminadamente marcadores específicos de macrófagos y de la línea mieloide entre los cuales se pueden mencionar: la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1), el receptor de Orexina tipo 2 (OX2R), un miembro de la familia de glicoproteínas transmembrana similares al factor de crecimiento epidermal conocida como EMR1 o F4/80, el receptor de quimioquina CX3C 1 (CX3CR1), el receptor Fractalkine o receptor acoplado a proteínas G Mac-1 y, la cadena αM integrina o CD11b (Prinz & Priller, 2014). Adicionalmente, ha sido posible la identificación de formas anoméricas de los residuos de galactosa presentes en las cadenas laterales de oligosacáridos embebidos en las membranas de las células de la microglía por la lectina *Griffonia Simplicifolia* o Ib4 razón por la cual este marcador también es utilizado comúnmente para la identificación celular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Pennell et al., 1994; Boscia et al., 2013).

De esta manera podemos ver que estos marcadores además de ayudar a la identificación de la población celular, permiten de forma general, presumir el estado de activación de las células de la microglía y el establecer el papel de estas células frente a diversas alteraciones del tejido nervioso.

2.3 Características fenotípicas de las células de la microglía

Desde tempranas etapas del desarrollo cerebral, las células de la microglía muestran características fenotípicas similares a los macrófagos. Por ejemplo, en estadios tempranos del desarrollo, estas células presentan un cuerpo celular relativamente grande y cortas prolongaciones citoplasmáticas. A medida que el cerebro se va desarrollando, la microglía disminuye en número, dejando espacios que parecen ser reemplazados por largos procesos ramificados que se extienden desde los cuerpos celulares (Nakajima & Kohsaka, 2001). Esta morfología, por un lado les permite entrar en estrecho contacto con las neuronas, lo cual las convierte en su soporte estructural y metabólico (Barres, 2008). Por otro lado, la apariencia constante de células estrelladas sugiere que estas células están en un estado de inactividad o quietud conocido como microglía en reposo. Sin embargo, recientemente algunos estudios han demostrado que estas células constantemente extienden y retraen sus ramificaciones citoplasmáticas de forma aleatoria y dinámica alternando con breves periódicos estáticos. Estos cambios de forma y fenotipo, hacen que las células de la microglía se constituyan en una red celular que regula, vigila y controla inmunológicamente el SNC. Adicionalmente se sabe que las células de la microglía suplen el medio de factores nutritivos tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Chhor et al., 2013; Klegeris et al., 2007) lo que las convierte en ejes centrales de la homeostásis del tejido nervioso desde el desarrollo embrionario hasta la adultez (Prinz, Priller, Sisodia & Ransohoff, 2011; Ransohoff & Perry, 2009; Nimmerjahn et al., 2005).

Por lo anterior, es claro que las células de la microglía son capaces de detectar cambios ambientales y señales de daño tales como ondas de calcio extracelular y adenosin trifosfato (ATP) producidas por células vecinas que sufren alguna condición patológica, y además detectar alteraciones neuronales asociadas a

infecciones bacterianas, virales e incluso meningitis asépticas, enfermedades neurodegenerativas y trauma. Como respuesta a estas alteraciones la microglía instaura rápidamente respuestas específicas caracterizadas por una serie de variaciones fenotípicas y funcionales que en conjunto se conocen como activación microglial (Flaris et al., 1993; Carson, 2002).

2.4 Activación de las células de la microglía.

Los cambios medioambientales instaurados por las células del SNC así como el encuentro directo con patógenos son factores que afectan de manera considerable a las células de la microglía, en este sentido ellas también son capaces de reaccionar ante la presencia de mediadores inflamatorios incluso mucho antes de su encuentro con el patógeno o del contacto con neuronas dañadas, induciendo de igual manera al estado de activación (Perry & Holmes, 2014). En el estado de activación se generan de manera progresiva una serie de cambios caracterizados por variaciones fenotípicas y genotípicas instauradas inicialmente para promover mecanismos para la remoción del debris celular y la eliminación de patógenos o células infectadas por ellos.

Los cambios fenotípicos se asocian principalmente con la retracción de las prolongaciones citoplasmáticas, generando células con formas redondeadas, conocida como células ameboides. Adicionalmente se ha descrito que bajo estas mismas condiciones de activación, la microglía también puede extender por cortos periodos algunas prolongaciones, hecho que en estas células temporalmente favorecen su capacidad fagocítica, de migración y proliferación (Giulian & Baker, 1986).

Por su parte, las variaciones genotípicas en las células de la microglía activada se refieren a cambios en la expresión de diferentes transcritos y mediadores inflamatorios para defender el SNC afectado; en primera instancia se han descrito dos tipos de polarización de la microglía activada, las cuales por separado favorecen el establecimiento de diferentes perfiles funcionales conocidos como M1 y M2; siendo la polarización M1 (activación clásica) inducida por la presencia de citoquinas pro-inflamatorias generalmente como resultado de la interacción de ligandos específicos con receptores tipo Toll (TLRs) causando neuroinflamación. Por otra parte también se ha descrito la polarización M2 o activación alternativa la cual se induce por la presencia incrementada de IL-4 en el medio, la cual ha sido asociada con el proceso de neuroprotección en modelos *in vivo* (Ransohoff & Perry, 2009; Chhor et al., 2013).

Sin embargo esta clasificación es altamente controversial pues al respecto no existe una clara evidencia que describa completamente estas vías en las células de la microglía. Tampoco existe una descripción de las interacciones ligando-receptor, ni factores de transcripción que exclusivamente activen cascadas intracelulares en este tipo celular (Boche et al., 2013), por otro lado a pesar de que algunos mecanismos relacionan a la microglía estrictamente con acciones reguladoras del sistema inmune capaces de prevenir el daño neuronal (Giulian, 1993), una evidencia creciente soporta la hipótesis de que la activación de éstas contribuye en gran medida a neurotoxicidad debido en primera instancia a la generación de una fuerte respuesta inflamatoria, pero también a la producción de radicales libres u otras neurotoxinas, lo cual en conjunto se ha considerado como el mayor impedimento de la regeneración axonal (Chao et al., 1995, 1996).

En este sentido, las citoquinas liberadas por parte de las células de la microglía para instaurar una respuesta inflamatoria y defender el tejido de agentes agresores al mismo tiempo tiene la función de inducir al reclutamiento de otras células que contribuyan a la reparación tisular, de igual manera se ha reportado que la microglía secreta neurotrofinas que pueden favorecen la regeneración neuronal (Klegeris et al., 2007) contribuyendo a la homeostásis tisular. No obstante, en algunas ocasiones, la cronicidad de los mismos mecanismos instaurados para defender el tejido por las células de la microglía, parecen estar implicados en procesos como la excitotoxicidad por glutamato y la neuroinflamación (Nakajima & Kohsaka, 2001).

La neuroinflamación se refiere a la respuesta colectiva de la microglía y en menor proporción de otras células como astrocitos y oligodendrocitos ante la injuria en el SNC. Al respecto, ha sido ampliamente documentada la capacidad de las células de la microglía de contribuir a la inflamación cerebral, pues la liberación de diferentes mediadores de manera sostenida por estas células puede resultar altamente citotóxica y afectar las neuronas indirecta o directamente (Chao et al., 1995).

Los daños indirectos son producidos por factores liberados que actúan sobre células no neuronales, y en ellas se induce a su vez a producir otras moléculas que por sí solas son capaces de causar muerte neuronal. Por ejemplo la IL-1 β es liberada en altas concentraciones por las células de la microglía activada, sin embargo esta no actúa directamente sobre neuronas sino que amplifica la respuesta inflamatoria para que otros tipos celulares como los astrocitos puedan liberar factores adicionales con la capacidad de inducir directamente toxicidad neuronal (Prow et al., 2008). Por otro lado algunas citoquinas pro- inflamatorias producidas por las células de la microglía actúan directamente sobre las neuronas para inducir daño e incluso muerte, al respecto, se ha sugerido que en el SNC las células de la microglía son la fuente principal del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Hanisch & Kettenmann, 2007) y se ha reportado que específicamente el TNF- α liberado a partir de la microglía está altamente relacionado con neurotoxicidad y sus efectos podrían afectar potencialmente el mantenimiento de la arquitectura cerebral y la morfo-fisiología neuronal (Taylor et al., 2005).

Los efectos deletéreos del TNF- α se desencadenan cuando esta molécula entra en contacto con dos diferentes tipos de receptores celulares, uno de 55 kDa (TNF p55R) y otro de 75 kDa (TNF p75R) (Tartaglia & Goeddel, 1992; Medvedev et al., 1994). El primero tiene una secuencia citoplasmática acoplada a un dominio de muerte intracelular, el cual es esencial para la transducción de señales apoptóticas

(Micheau & Tschopp, 2003; Thorburn, 2004) mediante mecanismos relacionados con la activación de los factores de transcripción AP-1 y el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Baud & Karin, 2001) así como también con la transducción de señales y la activación de caspasas (Krammer, 2000). Por otra parte la activación del receptor TNFp75R se ha relacionado inicialmente con protección neuronal (Shen et al.,1997; Yang et al., 2007), aunque puede también inducir apoptosis (Suvannavejh et al., 2000). Ambos receptores están presentes tanto en neuronas como en las células gliales (Kinouchi et al.,1991) y sorpresivamente la activación de los receptores de TNF- α en neuronas se ha visto que solo ocurre en presencia de microglía o medio condicionado de microglía, aparentemente debido a que estas células activadas liberan Fas ligando, el cual induce apoptosis directamente en las neuronas.

Adicionalmente se ha sugerido que citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α e IL-1 β podrían actuar de forma sinérgica para inducir a la muerte neuronal, hecho que fue demostrado *in vivo* e *in vitro* (Glass et al., 2010; McCoy & Tansey, 2008). Además se ha señalado que dicha asociación esta mediada por el aumento en la producción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), enzima responsable de la producción de NO.

2.5 Excitotoxicidad por glutamato liberado por las células de la microglía.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, en este tejido es producido fisiológicamente por astrocitos y neuronas (Maezawa & Jin, 2010) y adicionalmente se ha reportado que en eventos patológicos incluso virales, se producen cantidades excesivas y sostenidas de glutamato por parte de las células de la microglía, hecho que se ha asociado con excitotoxicidad neuronal. Debido a que las células neuronales expresan receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) para glutamato, y las altas concentraciones de éste generan una despolarización sostenida en dicha población celular causando muerte celular por excitotoxicidad.

Al respecto, el virus de Encefalitis Japonesa (JEV) un flavivirus de la familia *Flaviviridae*, infecta y activa la microglía, induciendo en ellas la liberación de glutamato y TNF- α (Chen et al., 2012) conduciendo a excitotoxicidad (Chen et al., 2012; Ye et al., 2013), entidad patológica que causa la muerte neuronal por apoptosis asociada al influjo exacerbado del ion calcio -proporcional a la concentración de glutamato extracelular- al citoplasma de neuronas y otras células (Murugan et al., 2013).

La excitotoxicidad por glutamato, en primera instancia se genera por la inhibición del transporte de glutamato en los astrocitos. En este sentido, se ha reportado que los mecanismos por los cuales se aumenta la concentración de este aminoácido en el espacio extracelular incluyen el bloqueo de los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT) 1 y 2, impidiendo la recaptura de glutamato por parte de los astrocitos y por las células de la microglía. Por otro lado, se ha sugerido que un aumento en la transcripción de la enzima glutaminasa en las células de la microglía favorece la producción de glutamato a partir de glutamina (Takeuchi et al., 2006), aumentando la concentración del neurotransmisor en el espacio extracelular; por

otra parte, la sobreexpresión de los receptores tipo NMDA en la microglía favorecen la liberación de glutamato y la neuroexcitotoxicidad favoreciendo la alteración de la homeostasis tisular (Streit et al., 1992). Al respecto, también se ha reportado que las células de la microglía infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) liberan glutamato, el cual junto al TNF- α producido por la misma población celular, inducen la sobreexpresión y liberación de glutaminasa a partir de neuronas, favoreciendo también la excitotoxicidad celular.

Por otro lado el TNF- α a través de la vía TNFR1, promueve la liberación de glutamato el cual actúa de manera autocrina en las células de la microglía (Takeuchi et al., 2006). Así como también, la estimulación del receptor metabotrópico de glutamato (mGluR2) en estas mismas células induce la liberación de TNF- α . Además, se ha reportado que la adición de sobrenadante de células de la microglía sobre neuronas, trae como consecuencia la activación de la caspasa- 3, además de la inducción de apoptosis y la liberación de Fas ligando como cofactor de la neurotoxicidad inducida por TNF- α (Taylor et al., 2005).

2.6 Producción de mediadores citotóxicos por las células de la microglía.

Las células de la microglía en reposo producen la oxidasa fagocítica de NADPH (PHOX), y es ampliamente conocido que la activación clásica de estas células potencia su producción, sin embargo esta enzima solo se activa al ser estimulada por grandes cantidades de TNF- α , IL-1 β u otras citoquinas específicas. Al entrar en contacto con alguna de estas moléculas inductoras, PHOX se activa en las células de la microglía generando la producción de altos niveles de superóxido extracelular (O₂⁻) y radicales hidroxilo (OH⁻) y de esta forma o dismutar a peróxido de hidrogeno (H₂O₂) o reaccionar con el NO para producir peroxinitrítos (Bal-Price et al., 2002). Las moléculas resultantes a partir de estas cascadas se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS) y contribuyen no solo a la muerte de patógenos por las células de la microglía, sino también al daño neuronal. Adicionalmente se ha descrito que estas vías están altamente relacionadas con la inducción a proliferar de las células de la microglía (Mander et al., 2006) así como de producir TNF- α , IL-1 β e iNOS (Pawate et al., 2004; Chéret et al., 2008), moléculas que en conjunto exacerban la producción de ROS y peroxinitrítos.

Adicionalmente, la producción de la enzima iNOS también puede verse potenciada por la presencia de mediadores inflamatorios o citoquinas en astrocitos y microglia (Murphy, 2000). Una vez sobreexpresada esta enzima se producen altos niveles de NO (Bal-Price et al., 2002), y por ende sus efectos potenciales en el metabolismo celular como: inhibición de la citocromo oxidasa, inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial e inhibición de la glicólisis. Como resultado se producen cambios metabólicos que conducen a daños irreversibles y muerte en las células afectadas en diferentes procesos infecciosos (Bal-Price et al., 2002; Valko et al., 2007).

Adicionalmente las ROS son conocidas como importantes segundos mensajeros en la transducción de señales. Por ejemplo ROS generado a partir de la oxidasa

NAPDH ha mostrado ejercer un importante impacto en la producción *in vitro* de citoquinas y quimioquinas por la microglía infectada con virus como el HIV (Turchan-Cholewo et al., 2009) y Herpes Simplex Virus (HSV) (Lokensgard et al., 2001).

En conclusión la producción de ROS por parte de las células de la microglía, que bajo condiciones fisiológicas representa un beneficio potencial principalmente en la eliminación de patógenos invasores del SNC, puede por otro lado inducir a la presencia de daños irreparables principalmente a las células neuronales. El desbalance entre la generación de ROS y la habilidad de las células para desintoxicarse de estos mismos mediadores produce un estado conocido como estrés oxidativo; factor contribuyente a muchas entidades patológicas y procesos neurodegenerativos (Valko et al., 2007).

2.7 Inhibición de la respuesta inflamatoria y la excitotoxicidad por glutamato.

La neurotoxicidad por glutamato potenciada por la presencia de TNF- α en injuria tisular, estimulación con lipopolisacáridos (LPS) o la proteína Tat del HIV, suele bloquearse experimentalmente por el antagonista no competitivo del receptor NMDA, dizocilpine (MK-801) inhibiendo de esta forma la activación y la producción de NO y ROS a partir de las células de la microglía en el hipocampo (Boje & Arora, 1992; Streit et al., 1992).

Adicionalmente estudios in vivo han demostrado que en las infecciones causadas por el JEV ocurre una incrementada producción y liberación de mediadores bioactivos con elevado potencial neurotóxico. Al respecto, cultivos purificados de células de la microglía, astrocitos y neuronas fueron infectados independientemente con este flavivirus; como resultado se observó que las células de la microglía infectadas y no los otros tipos celulares fueron capaces de producir un aumento de TNF- α y glutamato. Sobrenadantes recolectados de estos cultivos a diferentes tiempos post-infección, se pusieron en contacto con las neuronas, resultando en injuria y muerte neuronal según la evaluación histológica, de esta forma se sugiere una interacción cooperativa entre la producción de TNF- α y glutamato para inducir neurotoxicidad (Chen et al., 2012). Este efecto fue revertido cuando las células de microglía infectadas, fueron tratadas con el fármaco MK-801 y estos sobrenadantes fueron puestos de nuevo sobre las neuronas. Bajo estas condiciones, se observó un efecto protector neuronal en contraste al control no tratado farmacológicamente. Estos resultados en conjunto sugieren que existe una alta producción de agentes citotóxicos a partir de las células de la microglía que son capaces de inducir a daño neuronal (Thongtan et al., 2010; Chen et al., 2012).

Otro fármaco utilizado para inhibir de forma significativa la inflamación mediada por factores secretados por la microglía y los astrocitos en la enfermedad de Alzheimer u otras neuropatologías, es el ácido valpróico (VPA). El VPA es un inhibidor de histonas desacetilasas (HDACs) que además de mostrar efectos sobre las células gliales, previene la muerte celular espontanea de neuronas corticales de rata *in vitro* (Jeong et al., 2003) y neuronas de hipocampo en bajas concentraciones de glucosa

y oxigeno (Rekling, 2003). Adicionalmente este fármaco previene la excitotoxicidad inducida por glutamato en las mismas células.

Un efecto directo del fármaco VPA sobre las HDACs, está representado por la inhibición de la transcripción de factores solubles como citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y metaloproteinasas de matriz (Shakespear et al., 2011), previniendo de esta forma una respuesta inmune exacerbada. La reducción transcripcional que se observa durante el tratamiento de VPA, se asocia con una disminución en la translocación del factor NF-kB al núcleo, debido a una inhibición en la disociación y degradación por proteasoma del factor IkB que mantiene al factor de transcripción NFkB en el citoplasma, reprimiendo de este modo la transcripción génica (Bode et al., 2007), sugiriendo este fármaco como un posible agente terapéutico en patologías inflamatorias del SNC (Xuan et al., 2014).

Hasta el momento no se conoce cuál es la participación de las células de la microglía durante la infección con el DENV con características neurotrópicas y neurovirulentas.

Por lo tanto, en el presente proyecto se evaluó la susceptibilidad de las células de la microglía de ratones neonatos a la infección con el DENV adaptado o no a tejido nervioso. Posteriormente se evaluó la activación asociada a cambios morfológicos, tasa de proliferación, supervivencia o muerte celular y la producción de agentes proinflamatorios como TNF- α y glutamato. Finalmente se evaluó si los fármacos MK-801 o VPA tienen algún efecto en la activación de las células de la microglía.

1. Objetivos

3.1 Objetivo general

• Evaluar *in vitro* los agentes neurotóxicos liberados por las células de la microglía, infectadas con el virus Dengue Neuroadaptado (D4MB-6).

3.2 Objetivos específicos

Obtener, purificar y caracterizar cultivos primarios de células de la microglía a partir de ratones neonatos.

Determinar la susceptibilidad de las células de la microglía a la infección por D4MB-6 y su efecto en la proliferación y supervivencia.

Describir cambios en la expresión de mediadores pro-inflamatorios y evaluar los cambios en la producción de glutamato por las células de la microglía infectadas con D4MB- 6.

2. JUSTIFICACIÓN

Es ampliamente conocido el papel que desempeñan las células de la microglía en la patogenia asociada a las enfermedades neurodegenerativas, trauma e infecciones virales. Al respecto nuestro grupo, desarrolló un modelo de neuroinfección *in vivo*, en el cual la inoculación de la variante neuroadaptada de DENV (D4MB-6), tras ser inoculada periféricamente en ratones neonatos infectó eficazmente las neuronas e indujo la activación de astrocitos y células de la microglía, además de la producción de moléculas como la quimioquina MCP-1 y TNF- α , así como el desarrollo de eventos excitatorios asociados al glutamato. Estos factores en conjunto pueden estar relacionados con el daño y la muerte generalizada de diferentes poblaciones neuronales. Sin embargo, la población celular del tejido nervioso que secreta estas moléculas no ha sido identificada aún.

Frente a lesiones e infecciones del SNC, se ha observado que las células de la microglía son las responsables de generar varios tipos de moléculas entre ellas citoquinas inflamatorias, radicales libres y glutamato, que en conjunto pueden inducir la muerte neruronal. Es probable que parte de los daños observados en el modelo de neuroinfección por DENV sean debidos a la infección y activación de las células de la microglía y la posterior producción y liberación de mediadores inflamatorios y neurotóxicos como el glutamato, sin embargo hasta el momento esta caracterización no se ha realizado.

Para tal fin, este proyéctó implementó un modelo *in vitro* para caracterizar el comportamiento de las células de la microglía -obtenidas de ratones Balb/C de 7 días de nacidos- infectadas con el virus D4MB-6. Como resultado se observó que las células microgliales presentaron una alta susceptibilidad a la infección y en los tiempos post-infección evaluados presentaron altas tasas de proliferación y supervivencia. Adicionalmente se observó que las células presentaron cambios morfológicos y produjeron algunas moléculas pro-inflamatorias y glutamato, que indujeron a las células a establecer de manera autocrina un estado de activación particular, que fue modulado y regulado por los fármacos VPA o MK-801.

3. METODOS Y RESULTADOS

A continuación se describirán los métodos utilizados para alcanzar cada uno de los objetivos específicos y los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

Objetivo específico 1. Obtener, purificar y caracterizar cultivos primarios de células de la microglía a partir de ratones neonatos.

5.1.1 Obtención de los cultivos primarios de células de la microglía.

Para obtener y caracterizar los cultivos primarios de células de la microglía se utilizaron ratones Balb/C de 7 días postnatales (dpn), los cuales permanecieron al cuidado de sus padres hasta el momento de ser procesados. Los animales fueron mantenidos con agua y comida ad libitum en el Bioterio de la Universidad Nacional de Colombia. A los 7 dpn, las crías fueron sacrificadas por sobredosis de anestesia (90mg/Kg de Ketamina® 50 (Holliday, B1643GAT) y 15mg/Kg de Xilazina®2 (3742DB) luego se extrajo el cerebro (sin cerebelo), el cual fue puesto en medio DMEM (Sigma-Aldrich, D1152) suplementado con Glutamax (Gibco, 35050061) v fue cortado en pequeños trozos con hoja de bisturí No. 15. Los fragmentos del tejido fueron recolectados y puestos en una solución de digestión compuesta por Glutamax (0.7mM), Colagenasa (Sigma-Aldrich, C0130) (2mg/ml), Dispasa (Sigma-Aldrich, 42613-33-2) (2mg/ml), L-cisteina (Sigma-Aldrich, C3290000) (0.72mg/ml), DNAsa I (Roche, 10104159001) (0.4mg/ml), diluidos en DMEM e incubados por 1 hora a 37°C en agitación constante, posteriormente fueron disociados mecánicamente cada 15 min. Pasado este tiempo y sin centrifugar se retiró el sobrenadante y fue reemplazado con 1.5 ml de solución ovomucoide compuesta por Glutamax (0.7mM), DNAsa (0.4mg/ml), albumina sérica bovina BSA (Sigma-Aldrich, A7906) (0.15 mg/ml) e Inhibidor de tripsina (Sigma-Aldrich, B7260) (3mg/ml), en la cual fue homogenizado el tejido e incubado por 2 min a 37°C. Posteriormente, la suspensión celular fue centrifugada por 3 min a 250 gravedades (g) y el sobrenadante fue retirado cuidadosamente para adicionar de nuevo 1.5 ml de la solución ovomucoide y disociar mecánicamente el pellet hasta no detectar agregados. Luego se adicionaron 4 ml de medio completo de cultivo - DMEM, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Hyclone, W78790) y Penicilina 100U/ml –Estreptomicina 100µg/ml (Gibco, 15140122)- y se centrifugó por 5 min a 200g. Finalmente, se descartó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm², en donde se mantuvieron por veinte días a 37°C y una atmósfera de 5% de CO² hasta obtener la confluencia del 100% de un cultivo mixto (astrocitos, oligodendrocitos y microglía).

Al cabo del día 20 se realizó la purificación del cultivo de las células de la microglía siguiendo el protocolo de Saura et al., 2003. Para esto, el cultivo mixto se incubó por 20 min en una solución de 0.25% de tripsina (Sigma-Aldrich, B7260) y 0.25 mM de EDTA (Sigma-Aldrich, E9884) en solución balanceada de Hank's (HBSS) (Sigma-Aldrich, H2387), diluido 1:2 en medio DMEM y bajo microscopio se observó el desprendimiento uniforme de una capa superficial celular, compuesta por

astrocitos y otros tipos celulares. Se retiró el medio y las células que permanecieron adheridas al frasco de cultivo (células de la microglía) fueron lavadas dos veces con PBS y se mantuvieron en las condiciones de cultivo descritas previamente. A las 24 h, después de haber alcanzado una confluencia aproximada del 60%, las células de la microglía fueron disociadas con una solución de tripsina al 1% y EDTA al 1mM en PBS 1X estéril por 20 min. La suspensión celular fue centrifugada y el pellet fue resuspendido en medio completo de mantenimiento. Finalmente se sembraron 6000 células sobre láminas recubiertas previamente con Poly-L-Lisina (Sigma-Aldrich, P9155) (10 μ g/ml) en placas de 24 pozos. A las 24, 48 o 72 horas post- siembra las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % por 30 min diluido en PBS 1X a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min cada uno. Sobre éstas se caracterizó la población celular y se determinó el porcentaje de pureza.

5.1.1 Detección por inmunofluorescencia (IF) de los marcadores CD11b, OX2R e IBA-1.

Las células se incubaron con cloruro de amonio 100mM por 30 min y se bloquearon los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo con BSA al 5%, suero de cabra (Gibco, 16210072) (2.5%) y suero de caballo (Sigma-Aldrich, H0146) (1%) en PBS toda la noche a 4°C y posteriormente se incubaron por 1h a 37°C con cada uno de los siguientes anticuerpos primarios: OX2R (Santa Cruz Biotechnology, sc-14392), CD11b (eBioscience, 14-0112-81) o Iba-1 (Abcam, ab5076) resuspendidos en la solución de bloqueo descrita anteriormente al 50%. Luego las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios respectivos (Anexo No. 1) y posteriormente con estreptavidina acoplada a Alexa Fluor® 594 (ThermoFisher Scientific, Z25007) (1 µg/ml) e incubada a temperatura ambiente. Finalmente se contrastaron los núcleos con Hoechst (Sigma-Aldrich, 33342) (2 µg/ml) diluido en agua desionizada y se realizó el montaje de las láminas con Vectashield (Vector, H-1200) para ser observadas bajo microscopio de fluorescencia (Zeiss AxioVision). Cada marcador se evaluó en tres láminas por cultivo a partir de tres cultivos independientes. Finalmente se realizó la captura de imágenes utilizando el software ZEN 2.0, Versión 2012 y se tomaron 8 campos por lámina para realizar el conteo de células positivas y hallar el porcentaje de pureza del cultivo con base en el número de células positivas para cada uno de los marcadores con respecto al número de células totales.

5.2. Resultados.

5.2.1 Establecimiento y caracterización de los cultivos primarios de las células de la microglía obtenidas a partir de ratones lactantes.

5.2.1.1 Obtención y purificación del cultivo.

Aproximadamente al día 20 post-siembra del homogenizado de cerebro, se observó el crecimiento abundante de células con diferentes morfologías, lo que confirmó la obtención de un cultivo mixto. Por lo tanto fue necesario establecer un protocolo que nos permitiera purificar exclusivamente las células de la microglía. Para esto, las células fueron sometidas a un proceso de disociación suave con una solución de Tripsina/EDTA con el cual se observó desde los 12 min el desprendimiento de manera lenta y homogénea de un tejido superficial (Figura 1A) que dejó sobre la superficie del frasco T75 una población de células adheridas con morfología predominantemente ovoide. Otras células presentaron pseudo- prolongaciones y prolongaciones de longitudes variadas y sólo algunas células presentaron formas ahusadas. En estas células los núcleos fueron redondeados y pequeños ubicados de forma concéntrica (Figura 1A y B). Pasadas 24 h post-purificación, se observó el crecimiento regular de la población de células con morfología ovoide y algunas estrelladas, con prolongaciones citoplasmáticas que variaron en su longitud (Figura **1C).** Esta morfología ha sido reportada previamente y fue compatible con las descripciones típicas de células de la microglía (Kitamura et al., 1973).



Figura 1. Purificación del cultivo primario de células de la microglía.

(A) Se observa una capa celular superficial en desprendimiento (Flechas) durante el proceso de tripsinización suave. (B) Se muestran en mayor detalle las células que permanecieron adheridas al frasco, las cuales mostraron una morfología redondeada después de una hora de purificación (Cabeza de flecha negras). (C) A las 24 h post-disociación suave, se observan las células con morfologías ovoides y estrelladas (Cabeza de flecha blanca). Las imágenes en contraste de fase son representativas de los diferentes cultivos realizados. Barra: 100μm (A) y 50μm (B, C).

5.2.1.2 Caracterización de la población celular

Sobre los cultivos obtenidos se caracterizó la población celular, evaluando inicialmente la expresión del marcador OX2R. Se observó por IF que las células purificadas presentaron un patrón de marcaje intenso a nivel membranal para la proteína OX2R, lo que permitió definir su forma. Morfológicamente, algunas de las

células presentaron forma estrellada, con pseudo-prolongaciones listas a extenderse, otras células presentaron un contorno festoneado que bordeaba un núcleo generalmente excéntrico y una cantidad considerable de citoplasma. En estas células se observaron al menos una o dos ramificaciones delgadas, las cuales fueron fuertemente marcadas (Figura 2), lo que sugiere que es a partir de estos filopodios que se desprenden las ramificaciones adicionales, como ha sido reportado previamente para estas células. De manera particular el marcador Iba-1 se observó intensamente en la zona perinuclear, y tenue en el citoplasma de una subpoblación celular, que presentaba un soma relativamente pequeño del cual se desprendían algunas ramificaciones, y de estas surgían otras secundarias, de menor diámetro y extensión respecto a las primeras (Figura 2).

OX2R

CD11b

lba-1



Figura 2. Caracterizacion citoquímica del cultivo.

Se muestra la distribución celular de los tres marcadores utilizados para caracterizar las células de la microglía. En el panel superior se muestra una imagen panorámica del cultivo donde se observa la alta reactividad para cada marcador permitió confirmar la pureza del cultivo. En el panel inferior se muestra en detalle la morfología de las células observando una gran similitud entre el marcaje obtenido para OX2R y CD11b que mostraron células con morfología redondeada. Por su parte Iba-1 dejó en evidencia extensas prolongaciones citoplasmáticas. De esta forma se demostró que el cultivo obtenido presentó un alto grado de pureza. Cada marcador se evaluó en tres láminas de tres cultivos independientes. Barra: 100µm (superiores) y 20µm (inferiores).

Con base en su detección por IF, se determinó que los cultivos obtenidos presentaron un 97.5% de pureza. Este marcador mostró un patrón de marcaje homogéneo y una intensidad de fluorescencia fuerte en el citoplasma. Otros marcadores como el CD11b y la proteína Iba-1 también fueron utilizados para

confirmar la pureza del cultivo. Con estos se determinó el 96.6 y 95.4% de pureza respectivamente (Figura 3).



Figura 3. Determinación del porcentaje de pureza del cultivo de células de la microglia.

Sobre las células purificadas se evaluaron los marcadores microgliales OX2R, CD11b e Iba-1 por IF. Con cada marcador se obtuvo un 97.5, 96.6 o 95.4% de células positivas respectivamente. De esta forma se demostró que el cultivo obtenido presentó un alto grado de pureza. Se muestran los promedios para cada marcador evaluado en tres láminas de tres cultivos independientes.

En conjunto estos resultados nos sugieren que el protocolo estandarizado para la obtención de células de la microglía de ratones lactantes permitió la obtención de un cultivo con un 97,5% de pureza, morfologías variadas y diferencias en los patrones de detección de los marcadores. Estas características han sido descritas previamente en células microgliales de diferentes especies, evaluadas tanto *in vivo* como *in vitro* (Peudenier, et al. 1991; Jin et al 2005; Devarajan et al, 2014).

Objetivo específico 2. Determinar la susceptibilidad de las células de la microglía a la infección por D4MB-6 y su efecto en la proliferación y supervivencia.

5.3.1 Obtención del virus neuroadaptado

Se utilizó un aislado clínico de DENV-4 obtenido a partir de un suero de paciente colombiano el cual se propagó en células C6/36 para producir el *virus parental* y luego proceder a realizar su neuroadaptación *in vitro* e *in vivo*. La neuroadaptación *in vitro* se consiguió tras inocular el *virus parental* en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) a una multiplicidad de infección (MOI) de 1, pasadas 72 horas post-infección (hpi), las células se lisaron para obtener una suspensión viral la cual se denominó Dengue 4 SH-Pasaje 1 (D4SH-1), este pasaje se inoculó de manera seriada sobre células SH-SY5Y para obtener los pasajes D4SH-2 y D4SH-3, respectivamente.

Este último pasaje viral después se utilizó para realizar la neuroadaptación *in vivo*, tras inocularse vía intracerebral en ratones Balb/C de 2 o 3 dpn, pasados 6 días post- infección (dpi) los animales se sacrificaron con una sobredosis de ketamina (90 mg/Kg) y xilazina (15 mg/Kg), se extrajeron los cerebros y se homogenizaron en DMEM suplementado con SFB al 2% y antibiótico (penicilina 100UI/ml) y estreptomicina 100 μ g/ml), luego la suspensión se clarificó y el sobrenadante obtenido se denominó Dengue 4 *Mouse Brain*- Pasaje 1 (D4MB-1). De igual modo este virus fue inoculado intracerebralmente en ratones de la misma edad obteniendo la variante D4MB-2 y así sucesivamente hasta obtener la variante D4MB-6 (Velandia et al., 2012).

5.3.2 Evaluación de la susceptibilidad a la infección con el virus D4MB-6 en células de la microglía.

Las células de la microglía (6000 células por pozo) obtenidas previamente se sembraron en láminas tratadas con Poli-L-Lisina y se inocularon con el virus D4MB-6 a una MOI de 1; como controles se utilizaron de células no infectadas (No Inf) inoculadas con el virus *parental* (DENV-4), inoculadas con homogenizado de cerebro no infectado (Mock) y virus inactivados por calor (D4MB-6^C) lo cual se realizó incubando la suspensión viral a 56°C por una hora o inactivado el virus por luz ultravioleta por una hora (D4MB-6^{UV}) a 45 Watts. La inoculación de los virus se llevó a cabo en una suspensión de DMEM suplementado con SFB al 5% y antibiótico (Penicilina 100U/ml; Estreptomicina 100µg/ml) a 37°C durante 1h en agitación constante, posteriormente se retiró el inóculo y se adicionó medio de mantenimiento y las células permanecieron a 37°C con 5% de dióxido de carbono (CO₂) por 24, 48 o 72 horas post infección (hpi) y luego se fijaron como se describió previamente.

5.3.3 Detección de antígeno viral por IFI en células de la microglía

Las células de la microglía se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.3% por 30 min, luego se bloquearon los sitios inespecíficos y se incubó el anticuerpo primario dirigido contra la proteína E del virus (Chemicon, Mab8744) por 1 h a 37°C o con el

anticuerpo contra la proteína NS1 (Abcam, ab41623). Posteriormente las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado (Vector, BA-9200) y posteriormente con Streptavidina acoplada a Alexa Fluor® 647 (ThermoFisher Scientific, Z25008) (2 µg/ml). Luego se contrastaron los núcleos con Hoescht (2 µg/ml) por 15 min y se montaron las láminas con Vectashield. Finalmente, las células se visualizaron bajo microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioimager A2) utilizando el software Zen 2.0 versión 2012, para la captura de imágenes. Se tomaron ocho campos por lámina para realizar el conteo directo de células positivas y negativas para el antígeno viral de la proteína E. Se realizaron tres réplicas a partir de tres cultivos independientes.

5.3.4 Evaluación de la producción de virus DENV en células de la microglía.

8000 células de la microglía sembradas en laminillas en placas de 24 pozos se inocularon con el virus D4MB-6 y los respectivos controles, como se describió previamente. A las 24, 48 o 72 hpi se recolectaron los sobrenadantes de tres pozos por condición (pool) y fueron almacenados a -80°C hasta su uso. Paralelamente se sembraron células LLC-MK2 (Línea celular de Riñón de *Macaca mulatta*) las cuales se mantuvieron en DMEM suplementado con SFB al 10% y Penicilina 100U/ml – Estreptomicina 100 µg/ml a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 95%.

Luego de esto las células fueron disociadas con tripsina (0.25%) y EDTA (0.5mM) en PBS, y se sembraron 10000 células por pozos en placas de 96 pozos y a las 24 horas se inocularon con los sobrenadantes (puro, 1:2 o 1;4) obtenidos previamente. A las dos horas post incubación, se retiraron los sobrenadantes y se agregaron 100 µl de 4% de carboximetilcelulosa por pozo (Sigma-Aldrich, C4888) en medio DMEM y se incubó a 37°C y atmósfera de CO₂ por 72h. Al cabo de este tiempo, las células fueron fijadas como se describió previamente. Luego las células LLC-MK2 fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.3% y se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de metanol al 50% y peróxido de hidrógeno al 0.5% en PBS, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo con suero de cabra al 10% durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente las células se incubaron por 1h a 37°C con el anticuerpo anticuerpo primario contra la proteína E del virus en PBS y suero de bloqueo al 5%, a continuación se incubó con una estreptavidina acoplada a peroxidasa durante 40 min a temperatura ambiente y se visualizaron las células bajo microscopio y se realizó la captura de 7 campos por pozo con el software ZEN 2.0. Se evaluaron tres replicas por condición a partir de 3 cultivos independientes, y se realizó el conteo de células totales e infectadas y se determinó el porcentaje de infección.

5.3.5 Evaluación de la expresión de transcritos virales por RT-PCR.

Se sembraron 20.000 células de la microglía en placas de 6 pozos (35 mm diámetro) y se inocularon con el virus D4MB-6 o sus respectivos controles como se describió previamente. A las 24, 48 o 72 hpi se extrajo el RNA total utilizando el método de Trizol® (Invitrogen, 15596-026). Posteriormente, se tomaron 100 ng de RNA total el

cual se retro-transcribió (utilizando el sistema OneStep Kit, Invitrogen, 125740198) y se amplificaron los transcritos virales para Cápside (C) y NS1. El gen de β -actina se utilizó como control de carga. Los productos de amplificación esperados de 125 pb para el transcrito de C y de 186 pb para el transcrito para NS1, fueron visualizados utilizando un gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etídio (Sigma-Aldrich, E1510).

5.3.6 Ensayos supervivencia celular por MTT y resazurina

Se sembraron 8000 células de la microglía en placas de 96 pozos, y se inocularon con el virus D4MB-6, DENV-4 o sus respectivos controles. A las 24, 48 o 72 hpi, se retiró el medio de los pozos y las células se incubaron por 2 h a 37°C con una solución de MTT a 5 mg/ml en medio DMEM. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 70 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma- Aldrich, D8418) por pozo y se incubó por 15 min a 37°C, luego la placa agitó por 10 min y se evaluó la absorbancia de la solución utilizando un lector de Elisa a 570 nm. Para los ensayos de resazurina se adicionó una solución a 4.4 µg/ml en medio DMEM, la cual se incubó por 1 h a 37°C. Luego de evidenciar un cambio de color de azul a violeta, se realizó la lectura de la absorbancia utilizando un lector de Elisa a 570 nm. En ambos casos se evaluaron tres o cuatro réplicas por cultivo a partir de tres cultivos independientes.

5.3.7 Ensayo de Tetrametilrodamina, ester etílico (TMRE).

La realización de este ensayo tiene como objetivo evaluar posibles cambios en el potencial de membrana mitocondrial en nuestro caso por fluorometría en células vivas adheridas a la superficie de una microplaca. Para su realización, se sembraron 6000 células de la microglía por pozo en placas de 96 pozos e incubaron con el D4MB-6, DENV-4 o sus respectivos controles. A las 24, 48 o 72 hpi, se retiró el medio y las células se incubaron con la solución de tetrametilrodamina contenida en el kit de TMRE (ABCAM, AB 113852) diluida en medio DMEM 1X sin rojo fenol (Gibco Life Technologies, D11054) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las células se lavaron con BSA al 0.2% en PBS y se leyó la fluorescencia a 549nm utilizando el lector TECAN Infinite® 200 PRO - Life Sciences. Se evaluaron tres réplicas por condición en tres cultivos independientes.

5.3.8 Evaluación de la supervivencia de las células de la microglía por Calceina.

Se evaluó la viabilidad de las células de la microglía inoculadas con el virus D4MB-6, DENV-4 o sus controles con Calceina AM.

Para esto se sembraron 10000 células de la microglía en placas de 96 pozos (3 réplicas por condición) y se incubaron con el D4MB-6 o sus respectivos controles por una hora bajo las condiciones de infección descritas anteriormente. A las 24, 48 o 72 hpi las células de la microglía se incubaron por una hora a temperatura ambiente con una solución de Calceina 2,5µM preparada en HBSS, posteriormente

se leyó la placa en un lector de fluorescencia TECAN Infinite® 200 PRO, utilizando los filtros de excitación y emisión de 494/517 nm respectivamente. Se evaluó la fluorescencia de las células vivas en cada una de las condiciones experimentales y se determinó el porcentaje de viabilidad por este método con base en los controles establecidos por el fabricante. Se evaluaron tres réplicas por condición de tres cultivos independientes.

5.3.9 Ensayo de actividad de la Lactato deshidrogenasa (LDH).

Es un método para cuantificar la citotoxicidad celular basada en la medición de la actividad de la enzima LDH liberada a partir de las células estimuladas o no. Para su realización en nuestros ensayos se sembraron 6.000 células por pozo en placas de 96 pozos, luego fueron inoculadas con el D4MB-6, DENV-4 o sus controles. Pasadas 24, 48 o 72 hpi, se centrifugó la microplaca a 250 g por 10 min y se removieron los sobrenadantes los cuales se transfirieron a otra placa de 96 pozos por separado para ser procesados con las soluciones contenidas en el kit de LDH (Roche, 11644793001) siguiendo las instrucciones de fabricante. Sobre estos se adicionaron 60 µl de la mezcla de reacción (1.5 µl de catalizador de Diaforase/NAD+mixture y 58.5 µl de solución de tinción de yodo tetrazolio clorado (INT) y lactato de sodio, por pozo evaluado) y se incubaron por 30 min a 15°C protegidos de la luz. Posteriormente se leveron en un espectrofotómetro (Awareness Technology Inc, Stat Fax- 2100) a 490 nm. Los datos se normalizaron contra los controles No Inf para el DENV-4 y contra el Mock para el D4MB-6 para obtener el porcentaje de citotoxicidad. Se evaluaron cuatro réplicas por condición en tres cultivos independientes.

5.3.10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la susceptibilidad a la infección de las células de la microglía se realizó una transformación angular con el fin de normalizar los datos, posteriormente se utilizó el estadístico *t*- student para comparar el número de células totales e infectadas, con ambos virus en los tres tiempos evaluados (24 vs. 48 hpi, 48 vs. 72 hpi y 24 vs. 72 hpi) usando un p<0.05 para definir la significancia estadística.

Para el análisis de la viabilidad, supervivencia y muerte celular, se utilizó la prueba de Kruskall-Wallis (Anova no paramétrico) y su análisis post-hoc se realizó con la prueba de Bonferroni, los valores de p<0.05 se tuvieron en cuenta como estadísticamente significativos para la comparación en los distintos tratamientos (No Inf, Mock, D4MB-6^C, D4MB-6^{UV}, DENV-4 y D4MB-6), durante los diferentes tiempo evaluados.

5.4 Resultados

5.4.1 Susceptibilidad a la infección

Las células de la microglía inoculadas con el virus D4MB-6, DENV-4 o los respectivos controles fueron procesadas por IF para detectar la proteína E del DENV en los tiempos post-infección evaluados. En primera instancia se encontró que estas células fueron altamente susceptibles a la infección con los dos virus y presentaron un patrón de marcaje diferencial según el virus y tiempo evaluado.

En los tres tiempos post-infección se observaron células de la microglía infectadas con ambos virus. El marcaje de las células de la microglía infectadas con el DENV-4 mostró un patrón difuso, distribuido en el citoplasma celular y una intensidad de fluorescencia leve y moderada asociada con el tiempo post-infección (**Figura 4**).



Horas post-infección

Figura 4. Detección de la proteína E del DENV en células de la microglía.

Se detectó la proteína E del virus a las 24, 48 y 72 hpi en células de la microglía infectadas con los virus DENV-4 o D4MB-6. Se observó que su expresión e intensidad aumentaron en los diferentes tiempos post- infección en las células infectadas con las dos variantes virales. Se muestran imágenes representativas de tres cultivos independientes con 3 réplicas para cada condición.

El promedio de células positivas para el antígeno viral en la microglía inoculada con el DENV-4 a las 24 hpi fue del 74% (Figura 5). A las 48 hpi se observó un incremento en el porcentaje de células infectadas del 77% y a las 72 hpi se detectó el antígeno viral en el 76.39% de las células evaluadas. De esta forma se observó que entre las 24 y 48 hpi con el DENV-4, hubo un incremento en el porcentaje de células infectadas di rincremento en el porcentaje de células infectadas.

Por su parte, el patrón de marcaje para el D4MB-6 a las 24 hpi, presentó una marcación moderada en el citoplasma y en la región perinuclear de la mayor parte de las células. A las 48 y 72 hpi se observó un mayor número de células positivas con esta variante viral. Específicamente a las 72 hpi el antígeno viral se encontró en la región perinuclear o distribuido de forma difusa en el citoplasma en pequeñas vesículas marcadas de manera intensa. Estas vesiculas fueron evidentes en las células infectadas con el DENV-4, sin embargo en éstas la intensidad del marcaje fue menor (Figura. 4). Las células infectadas con este virus, presentaron la siguiente cinética de infección: A las 24 hpi el 72.3% de las células fueron positivas para el antígeno viral, a las 48 hpi se observó una leve disminución a un 69.2% y a las 72 hpi hubo un aumento estadísticamente significativo de las células infectadas con respecto al tiempo inmediatamente anterior (82.9%) (p=0.037) (Figura. 5) y como era de esperarse, en ninguno de los controles se detectó antígeno viral.



Figura 5. Porcentaje de células de la microglía infectadas con los virus DENV-4 o D4MB-6 en los diferentes tiempos evaluados.

Las células inoculadas con cada uno de los virus se procesaron por IF, para detectar la proteína E del DENV, luego se determinó el número total de células y de estas las que fueron positivas para el antígeno. Se muestras que ambos virus infectaron entre un 70 y 80 porciento de las células. Se muestra el promedio de 3 láminas por cultivo de tres cultivos independientes. *Estadísticamente significativo p=0.038. Prueba estadística: *t*-student, previamente se realizó la transformacion angular para normalizar los datos.

Por IF también se evaluó la expresión de la proteína NS1 como un indicador de la capacidad replicativa de ambos virus (DENV-4 o D4MB-6) descartando con ella, la posibilidad que estas células pudieran -en nuestro modelo-, fagocitar partículas virales. En los tres tiempos evaluados se detectó la proteína NS1 en las células infectadas con ambos virus (**Figura 6**), sin embargo los conteos de células

infectadas sólo se realizaron utilizando el anticuerpo contra la proteína E del DENV, debido a que la detección de esta proteína fue más intensa y frecuente que la observada con NS1.



Figura 6. Inmunomarcaje para la proteína NS1 del DENV en células de la microglia infectadas. Se detectó la proteína NS1 del DENV en las células de la microglía en los tres tiempos evaluados, se evidencia un patrón de marcaje citoplasmático en algunas células o perinuclear en otras, tanto en las células infectadas con el virus DENV-4 como con la variante viral D4MB-6. Se realizaron 3 experimentos a partir de tres cultivos independientes. La barra de magnificación corresponde a 50µm.

Estos mismos hallazgos, fueron confirmados por RT-PCR. El producto amplificado para el segmento del RNA viral que codifica para la proteína de la Cápside con un tamaño 125 pb, fue detectado de manera tenue a las 24 hpi, con un aumento a las 48 h el cual se mantuvo invariable hasta las 72 hpi. Por su parte, el producto amplificado para la proteína NS1 con un tamaño de 186 pb fue visible de manera intensa a las 24 hpi, tenue a las 48 hpi y de nuevo intenso a las 72 hpi (**Figura 7**).



Fig 7. Detección de transcritos para las proteínas de Cápside y NS1 del DENV. Se muestran los productos amplificados por RT-PCR en un gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio para las proteínas Cápside y NS1 del DENV en los tres tiempos evaluados. Control positivo Homogenizado de cerebro infectado (+). Control negativo Sin plantilla (-). Carril 1: Células No Inf. Carril 2: Células inoculadas Mock. Carril 3: Células Infectadas con D4MB-6, en cada uno de los tiempos evaluados. Se muestra un gel representativo de tres cultivos independientes.

Una vez confirmada por IFI y PCR la susceptibilidad a la infección de las células de la microglía con ambos virus, generó gran interés evaluar específicamente la infección eficiente del virus D4MB-6 y la capacidad de la microglía de producir partículas virales infecciosas de esta variante. Para tal fin, se recolectaron sobrenadantes de células infectadas o sus controles y se pusieron en contacto sobre células LLC-MK2 puros o diluidos (1:2 o 1:4). En los sobrenadantes (diluidos 1:4) obtenidos en los tres tiempos evaluados e infectadas con el D4MB-6, se detectó a las 24 hpi el antígeno viral en el 27 % de las células LLC-MK2. Esta cifra aumentó en las células inoculadas con los sobrenadantes de la microglía infectada por 48 hpi (34%) y se obtuvo un pico máximo de infección del 62% cuando las células LLC-MK2 fueron inoculadas con los sobrenadantes recolectados a las 72 hpi, lo cual resultó estadísticamente significativo (Figura 8). Como era de esperarse no se detectó la proteína viral en ninguno de los controles evaluados





Estos resultados en conjunto demostraron que las células de la microglía obtenidas son altamente susceptibles a la infección con el D4MB-6, además de permitir su replicación activa y liberación al medio extracelular, de esta manera nos propusimos evaluar los efectos de la infección en la supervivencia celular.

5.4.2 Evaluación de la viabilidad y proliferación de las células de la microglía infectadas con el virus D4MB-6.

Confirmada la susceptibilidad a la infección de las células de la microglía mediante las técnicas de IF y PCR, así como su capacidad para producir partículas virales infecciosas, evaluamos los efectos de la infección en la actividad metabólica, supervivencia y muerte celular utilizando diferentes técnicas, cada una de ellas con diferente nivel de sensibilidad.

En los controles, la evaluación por MTT y Resazurina demostraron que hubo un aumento en la actividad metabólica de las células inoculadas con el Mock, o con los virus inactivados por Luz UV (D4MB-6^{UV}) o calor (D4MB-6^C). Por tal razón, escogimos al Mock como control para comparar el comportamiento de las células inoculadas con los virus DENV-4 y D4MB-6 y se tuvieron en cuenta los datos obtenidos para cada ensayo realizado por MTT o Resazurina dentro de las 24h postsiembra como tiempo inicial o tiempo cero.

Por el ensayo de MTT, las células de la microglía inoculadas con el Mock, presentaron una tasa de proliferación en promedio del 10% entre las 0 y 24h postsiembra, posteriormente en estas mismas células se observó entre las 24 y 48 hpi un aumento en la actividad metabólica del 19%, la cual resultó estadísticamente significativa (p=0.041) y entre las 48 y las 72 hpi la proliferación se incrementó en un 9,25% sin ser significativa (p>0.05) **(Figura 9A).**

Sin embargo, por el método de resazurina se observó que a pesar de que en todas las condiciones hubo un aumento tiempo-dependiente en la actividad metabólica, las células no inoculadas (No Inf) en promedio, presentaron promedios mayores (6%) respecto al Mock en todos los tiempos evaluados, sin embargo esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (p>0.05) (Figura 9B).

Por otro lado, cuando se evaluó la actividad metabólica de las células infectadas se observó que éstas presentaron porcentajes similares entre ellas, entre las 24 y 48 hpi, esta aumentó en un 19% en la microglía infectada tanto con el virus DENV-4 como para el D4MB-6 por MTT, del mismo modo entre las 48 y 72 hpi se observó un aumento en la actividad metabólica del 8% para el virus DENV-4 y del 5% para el D4MB-6. Estos datos fueron ligeramente menores con respecto a lo observado en las células inoculadas Mock en los tres tiempos post-infección, sin embargo esta diferencia fue estadísticamente significativa solo a las 72 hpi (10%) (p<0.05).



Figura 9. Actividad metabólica de las células de la microglia expuestas a los diferentes controles y evaluadas por las técnicas de MTT (A) o Resazurina (B). Se observa un aumento constante en la actividad metabólica de las células de la microglia dependiente del tiempo, sugiriendo de esta manera que la adición de los diferentes controles (Mock, DENV^{UV} o DENV^C) no afectó la supervivencia celular. Se muestran los promedios por condición a partir de 3 cultivos independientes. *Estadísticamente significativo p<0.05. Kruskall-Wallis Test.

Por el contrario, cuando se evaluó la actividad metabólica de las células por resazurina se observó que las células infectadas con el virus DENV-4 o D4MB-6 presentaron tasas metabólicas más altas con respecto a las células inoculadas con el Mock a las 24 (14%), 72 (5%) y 96 hpi (9%) y a las células inoculadas con los virus inactivados (DENV-4^{UV} y DENV-4^C), especialmente a las 96 hpi (<10%) (**Figura 10**). Según estos resultados, la infección con cualquiera de los virus no indujo -aparentemente- alteraciones en la supervivencia ni actividad metabolica celular. Adicionalmente, evaluamos con dos técnicas diferentes la muerte celular (apoptosis y necrosis) asociada a la infección.





La actividad metabólica aumentó de una manera dependiente del tiempo tanto en células infectadas como en sus controles, sin embargo esta fue mayor en las células infectadas a las 24, 72 y 96 hpi. Las gráficas muestran los promedios en cada una de las condiciones a partir de 3 cultivos independientes. *Estadísticamente significativo p<0.05. Kruskall -Wallis test.

Por el ensayo de TMRE se observó que las células infectadas con cada uno de los virus en los tres tiempos evaluados, no presentaron cambios importantes en la permeabilidad mitocondrial con respecto a los controles no infectados, de esta manera se obtuvieron 31.000, 32.000 y 34.000 unidades relativas de fluorescencia (URF) a las 24, 48 y 72 hpi respectivamente, lo cual confirmó que durante la infección las células no sufrieron daños que alteraran la fisiología mitocondrial (Figura 11).

Por el ensayo de Calceina, se observó que las células de la microglía presentaron a las 24 h de infección con el D4MB-6 un 87% de supervivencia y del 91% a las 48 y 72 hpi, comparadas con la supervivencia de las células inoculadas con el Mock que fue del 100%. Sin embargo al evaluar la actividad de la enzima LDH se observó que las células infectadas con el D4MB-6 presentaron un 47,1% de citotoxicidad a las 24 hpi mientras que en las células infectadas con el virus DENV-4 se observó solo un 16.6%. A las 48 hpi no fue posible detectar la actividad de la enzima LDH asociada a la infección con ninguno de los virus. Finalmente a las 72 h se observó que el virus D4MB-6 indujo a un 7.52 % de citotoxicidad mientras que el virus DENV-4 no se presentó citoxicidad. (**Figura 12**).





Ensayo de tetrametilrodamina ester etilico (TMRE) en el cual se observó que la infección no causó alteraciones en la permeabilidad mitocondrial de las células de la microglía, las intensidades de fluorescencia fueron similares a los controles en los tres tiempos evaluados. Se muestra el promedio de 3 réplicas por condición de tres cultivos independientes.



Figura 12. Liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en células de la microglia infectada. Se evaluó la liberación de LDH en sobrenadantes de células de la microglía expuestas a los virus DENV-4 o D4MB-6 y los datos de absorbancia obtenidos se normalizaron respecto a los controles células no infectadas o Mock respectivamente. La citotoxicidad celular asociada a la infección fue mayor en los sobrenadantes recolectados a las a las 24 hpi con los virus DENV-4 y D4MB-6 en comparación con los demás tiempos. Se muestran los promedios de cuatro réplicas a partir de tres cultivos independientes.*Estadísticamente significativo p= 0.46. Kruskall-Wallis test.

Estos resultados sugieren que las células de la microglía obtenidas a partir de ratones Balb/C neonatos fueron susceptibles a la infección con DENV, lo que las convierte en importantes blancos de la infección. Adicionalmente se observó que la infección no afectó la supervivencia ni la fisiología mitocondrial de estas células en los tiempos evaluados, sin embargo, sugerimos que la infección indujo la producción de LDH como un posible mediador inflamatorio producido por la infección viral.

Objetivo 3. Describir los cambios en la expresión de mediadores proinflamatorios y en los niveles de glutamato en sobrenadantes de células de la microglía infectados con D4MB- 6.

5.5.1 Evaluación de los cambios morfológicos inducidos por el D4MB-6 en las células de la microglía.

Las células de la microglía previamente fijadas fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.3% y se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de metanol al 50% y peróxido de hidrógeno al 0.5% en PBS, luego se bloquearon los sitios inespecíficos con suero de cabra al 10% por 1 h a temperatura ambiente. Luego las células se incubaron por 1h a 37°C con la lectina *Griffonia simplicifolia* o lb4 para el reconocimiento del péptido ampliamente utilizado como marcador de superficie, (Vector, RL-1102) (10µg/ml) en PBS y suero de bloqueo al 5%, a continuación se incubó con una estreptavidina acloplada a peroxidasa (Vector, A-2014) (1µg/ml) durante 1h. Finalmente, se contracolorearon las células con una solución de Hemalum de Mayer en una dilución 1:1 en agua destilada y se realizó el montaje de las láminas con Entellan® (Merck Millipore, 107960) para ser visualizadas al microscopio de luz.

5.5.2 Cuantificación de citoquinas por el ensayo Cytometric Bead Array (CBA)

Se sembraron 8.000 células de la microglía sobre láminas de vidrio pre-tratadas con Poli-L-lisina (10 µg/ml) en placas de 24 pozos. 24 horas post-siembra se infectaron como se describió previamente y se mantuvieron por 24, 48 y 72 hpi. Al finalizar cada uno de los tiempos, se recolectaron los sobrenadantes y se cuantificaron las citoquinas IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70 usando el sistema Mouse Kit Inflamation BDTM Cytometric Bead Array (CBA)(Becton Dickinson, 552364) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos obtenidos para cada citoquina fueron comparados contra una curva estándar.

5.5.3 Evaluación y cuantificación de transcritos para citoquinas, moléculas de adhesión e iNOS por qRT-PCR.

Se realizó extracción de RNA total en cada uno de los tiempos p.i definidos previamente, utilizando el método de Trizol (Invitrogen, 15596-018). Posteriormente se tomaron 100 ng de RNA total el cual se se retro- transcribió, amplificó y cuantificó para los transcritos de interés, utilizando la enzima SuperScript® III Platinum® One step (Invitrogen, Life technologies, 11745-100) para RT-PCR en combinación con SYBR Green One- Step (Invitrogen life technologies, 11736-051) y los datos fueron normalizados contra el gen de referencia β -actina. Los programas de amplificación utilizados para cada transcrito, se describieron en el anexo No. 2 así como los primers utilizados.

5.5.4 Cuantificación de glutamato.

Se sembraron 30.000 células de la microglía en placas de 6 pozos y se inocularon con el D4MB-6 o sus respectivos controles. Pasadas 24, 48 o 72 hpi las células se

disociaron como se describió previamente. El pellet se re- suspendió en 100µl del buffer de ensayos del kit para la detección de Glutamato (Abcam, Ab83389) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los lisados celulares se incubaron por 15 min en hielo y se centrifugaron por 5 min a 4°C para remover material insoluble. Se recolectó el sobrenadante y 100 µl fueron transferidos a una placa de 96 pozos por condición, luego se le adicionaron 100µl del mix de reacción compuesto por buffer de ensayo, desarrollador, y enzima (según las instrucciones del fabricante) y se incubó a 37°C por 30 min protegido de la luz. La medición se realizó a 450nm en un lector de microplacas TECAN Infinite ® 200 PRO. Las absorbancias obtenidas de los pozos evaluados se normalizaron con respecto a un control de células expuestas al mix en ausencia de enzima (background) y se obtuvieron los promedios en cada condición, luego cada uno de los datos fue reemplazado en la ecuación de la regresión lineal obtenida de los estándares. De esta forma se obtuvo la concentración de glutamato en cada una de las muestras. Se evaluaron 3 cultivos independientes y cada condición tuvo cuatro réplicas.

5.5.5 Efecto de los fármacos MK-801 y VPA en la supervivencia, producción de transcritos y citoquinas proinflamatorias en las células de la microglía infectadas con el D4MB-6.

30000 células se sembraron en placas de 6 pozos. Pasadas 24 horas post-siembra (hps) se inocularon con el D4MB-6 o sus respectivos controles (No Inf y Mock). A las 24 hpi las células fueron tratadas con los fármacos MK-801 (25μ M) o VPA (10mM) (concentraciones estandarizadas previamente).

A las 72 horas post-tratamiento con los fármacos (96 hpi), las células fueron procesadas para evaluar la supervivencia (MTT), la expresión de citoquinas y otras proteínas (CBA y qRT-PCR), y la producción de glutamato siguiendo los protocolos descritos previamente. La evaluación por MTT se realizó por triplicado a partir de tres cultivos independientes, el resto de ensayos se realizaron por triplicado a partir de dos cultivos independientes.



Figura 13. Esquema representativo de los tratamientos de las células de la microglía con los fármacos VPA o MK-801. Células de la microglía se sembraron a una confluencia previamente estandarizada para cada ensayo en el cual se administraría cada fármaco y a las 24 horas postsiembra se infectaron a una M.O.I de 1. 1 día después se trataron con VPA o MK-801 por 72 horas, tiempo en el cual se llevó a cabo la evaluación del efecto de los fármacos sobre la actividad metabólica (MTT), perfil transcripcional (RT-PCR) y de la liberación de citoquinas en sobrenadantes (CBA).

5.5.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el estadístico *t*- student. De esta forma se comparó el la liberación de citoquinas, la producción de transcritos y la cuantificación de glutamato intracelular a partir de las células de la microglía infectada con el D4MB-6 entre las: 24- 48 hpi, 48- 72 hpi y 24- 72 hpi, y se tuvo en cuenta el valor de p<0.05 para evaluar la significancia estadística.

5.6 Resultados

5.6.1 Activación de las células de la microglía infectadas con el virus D4MB-6.

Se utilizó la isolectina Ib4, como un marcador de activación de las células de linaje monocítico. Al respecto, en los cultivos no infectados encontramos al menos dos sub-poblaciones celulares. Una población correspondió a células con un núcleo excéntrico ocupando una pequeña parte del citoplasma, con prolongaciones citoplasmáticas largas y delgadas. El marcaje para Ib4 en el soma de estas células, fue fuerte y permitió delimitar el contorno celular, mientras que en las prolongaciones fue moderada. La segunda población observada correspondió a células con morfologías ovoides y núcleos concéntricos de gran tamaño ocupando una parte considerable del citoplasma celular (Figura 14). Características descritas previamente en células de la microglía de diferentes especies evaluadas tanto *in vivo* como *in vitro* (Peudenier et al. 1991; Jin et al 2005). En contraste, la microglía infectada a las 72 hpi, mostró una fuerte positividad para Ib4 especialmente en las células con morfología ovoide (Figura 13).



Figura 14. Inmunoperoxidasa para *Griffonia simplicifolia* (IB4) sobre células de la microglía infectadas o no infectadas.

La reactividad del marcador de isolectina permitió diferenciar la morfología típica de la microglía, por su parte las células no infectadas muestran extensas prolongaciones citoplasmáticas (A) (flechas), en contraste las células infectadas con el virus D4MB-6 a las 72 hpi, mostraron una morfología celular redondeada (B) (cabeza de flecha). Se muestra una imagen representativas de tres experimentos independientes. La barra corresponde a 100µm.

Otro indicador de la activación microglial a las 72 hpi fue el incremento estadísticamente significativo ($p \le 0.05$) del transcrito para Iba-1 de 12 veces respecto al Mock. Estos resultados nos permiten sugerir que la infección indujo en estas células una serie de eventos de activación, condición en la cual estas células suelen aumentar su tasa de proliferación y su capacidad de migración, además de producir gran cantidad de agentes citotóxicos y pro-inflamatorios (Devarajan et al, 2014).

Por lo tanto evaluamos, la producción de algunos mediadores inflamatorios y de glutamato por parte de las células de la microglía infectadas con el D4MB-6, así como algunos cambios en el perfil transcripcional de algunos genes de importancia en el estado de activación

5.6.2 Producción de citoquinas

Según lo obtenido en el ensayo de CBA en sobrenadantes, en ninguna de las condiciones y tiempos evaluados se detectó la IL-12p70, IFN- γ ni IL-10. A las 24 hpi se detectaron cantidades muy bajas de TNF- α (0.4 pg/ml) en los sobrenadantes de las células inoculadas con el Mock, mientras que en los sobrenadantes de las células infectadas con D4MB-6 se detectaron 7.3 pg/ml. En este tiempo p.i también se detectó la quimioquina MCP-1 en las células inoculadas con el Mock y en los sobrenadantes de las cólulas infectadas de las células infectadas con el virus D4MB-6 obteniendo de esta forma 416.3 y 8536.9 pg/ml respectivamente. Por su parte, la IL-6 se detectó (236.6 pg/ml) en las células estimuladas con el Mock y en los sobrenadantes de las células de la microglía infectadas con el virus D4MB-6 (451.8 pg/ml) (**Figura 15**).

A las 48 h, las células inoculadas con el Mock o infectadas con el virus D4MB-6 presentaron cantidades de MCP-1 de 948.9 y 8624.7 pg/ml respectivamente. Por otro lado, el TNF- α en este mismo tiempo p.i se detectó en las células inoculadas con el Mock con una concentración de proteína de 223.81 pg/ml mientras que en los sobrenadantes de las células infectadas con el virus D4MB-6 los valores fueron de 3782.3 pg/ml. IL-6 se detectó en las células inoculadas con Mock con valores de 152.2 pg/ml y en las células infectadas con el D4MB-6 con concentraciones de 12558.4 pg/ml. Finalmente, a las 72 hpi se detectó el pico máximo de liberación de las citoquinas. La detección de TNF- α , MCP-1 e IL-6 fue de 9510.2; 11196.09 y 33070.6 pg/ml respectivamente en las células infectadas, mientras que en el control Mock se detectaron con valores de 446.7, 972.9 y 3805.1 pg/ml respectivamente (**Figura 15**).

Por RT-PCR se evaluó de forma cualitativa la expresión de los transcritos para TNF- α , IL-6, IFN- β , MCP-1, ICAM, IL-10 e iNOS. En nuestros ensayos, a las 24 hpi las células de la microglía infectadas con el D4MB-6 mostraron un notable incremento en la expresión del transcrito para TNF- α , IL-6 e iNOS, respecto a las células inoculadas con el Mock o no infectadas. Este patrón de expresión se mantuvo a las 48 y 72 hpi donde se observaron las bandas específicas, pero con mayor intensidad en las células infectadas con el virus D4MB-6 respecto a los controles. A las 24 hpi en ninguna de las condiciones evaluadas se detectó el IFN- β , por su parte a las 48 y 72 hpi se detectó una banda de intensidad tenue a moderada de 110 pb en las células infectadas con el D4MB-6 o inoculadas con el Mock (**Figura 16**).



Figura 15. Cuantificación de citoquinas por CBA en los sobrenadantes de las células de la microglía infectadas.

Los sobrenadantes de las células de la microglía infectadas o inoculadas con los controles (Mock y DENV^C) se procesaron para cuantificar liberación de citoquinas por CBA. Solo se detectaron las citoquinas TNF-a, IL-6 y la quimoquina MCP-1 siendo más evidentes a las 48 y 72 hpi. Se muestra el promedio de 3 réplicas por condición de tres cultivos independientes. *Estadísticamente significativo p<0.05. Kruskall wallis test.

A las 24 hpi en las células control, se detectó el transcrito para MCP-1 con una banda tenue de 136 pb. En las células infectadas con el D4MB-6 se observó una banda de mayor intensidad respecto a los controles, la cual fue más intensa a las 48 y 72 hpi. ICAM e IL-10, sólo detectaron en las células de la microglía infectadas con D4MB-6 específicamente en las células infectadas con la variante D4MB-6 (**Figura 16**).



Figura. 16. Evaluación de los transcritos de activación (F4/80, Iba-1) citoquinas (IFN- β , IL-6, IL-10, iNOS, TNF- α), quimoquinas (MCP-1) y moléculas de adhesión (ICAM) en las células de la microglía infectadas y sus controles.

Se muestran los productos amplificados por RT-PCR en un gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio para cada uno de los transcritos en los tres tiempos evaluados. Control positivo Homogenizado de cerebro infectado (+). Control negativo Sin plantilla (-). Carril 1: Células No Inf; 2: Células inoculadas Mock; 3: Células Infectadas con D4MB-6. Se muestra un gel representativo de tres experimentos independientes.

* Aumento en la intensidad de señal a las 72 hpi.

De acuerdo a estos resultados, se observó que las células de la microglía a las 72 h de infección con la variante D4MB-6 establecieron una fuerte respuesta de tipo inflamatorio. Por esa razón seleccionamos las proteínas TNF- α , IL-6, MCP-1 e iNOS para ser evaluadas por qRT-PCR utilizando como gen de referencia β -actina y comparando la expresión de estos genes respecto a las células inoculadas con el Mock o No Inf.

De este modo se encontró a las 72 hpi un incremento en 7.22 veces en los transcritos para TNF- α ; 8.6 veces en los niveles de IL-6 y de 11.8 veces para MCP-1 con respecto a las células inoculadas con el Mock. Finalmente, la expresión de

iNOS –transcrito de especial importancia en la producción de especies reactivas de oxígeno- estuvo aumentada 8.1 veces respecto al Mock a las 72 hpi (**Figura 17**).



Fig 17. Cuantificación de los transcritos para TNF-a, IL-6, MCP-1 e INOS en las células de la microglía infectadas con el D4MB-6 a las 72 hpi.

Por qRT-PCR se observó que el virus D4MB-6 a las 72 hpi indujo en las células una sobreexpresión de los transcritos evaluados con respecto a las células inoculadas con el Mock. Se utilizó el gen de β -actina como gen de referencia. Se muestran los promedios de 3 replicas por condición de tres cultivos independientes.

3.6.3 Producción de glutamato

En las células de la microglía no infectadas o inoculadas con el D4MB-6^C no se detectó glutamato intracelular. Por el contrario, en las células inoculadas con el Mock se detectó una concentración de 0.2nM, 1.0nM y 0.9nM a las 24, 48 y 72 hpi respectivamente (**Figura 18**).

Por esta razón se utilizó como punto de referencia la concentración de glutamato obtenido en las células inoculadas con el Mock para comparar la producción de este neurotransmisor inducida por la infección. Al respecto a las 24 hpi en las células de la microglía infectadas con el D4MB-6, se detectó 1.6nM de glutamato intracelular, mientras que a las 48 hpi esta concentración se duplicó (2.8nM). Finalmente, a las 72 hpi se alcanzó un pico máximo de detección de glutamato de 11.7nM (Figura 18).

Esto nos permite concluir que las células de la microglía infectadas con el virus D4MB-6 establecieron una respuesta inflamatoria caracterizada por la producción de citoquinas y además de glutamato. Sugiriendo de esta manera que la microglía produce agentes que podrían tener un efecto tóxico sobre otras células como consecuencia de la infección viral.



Figura 18. Cuantificación de glutamato intracelular en las células de la microglía infectadas con el D4MB-6 en los tres tiempos evaluados.

Las ce´lulas de la microglia infectadas con el virus D4MB-6 fueron lisadas y procesadas según las instrucciones del fabricante para elavaluar la producción de glutamato. Se observa que la infección a las 48 y 72 hpi, indujo una producción elevada glutamato en estas células. Se muestra el promedio de cuatro réplicas a partir de tres cultivos independientes. *Estadísticamente significativo p<0.05. Prueba estadística: ANOVA de una vía.

5.6.4 Efecto de los fármacos MK-801 o VPA en la activación de las células de la microglia infectadas.

Según evidencia previa en nuestro laboratorio, el D4MB-6 induce en el modelo *in vivo*, la activación exacerbada de la respuesta inmune y la excitotóxicidad por glutamato y ambos procesos fueron reducidos por la aplicación de los fármacos VPA y MK-801 respectivamente (Camacho S, 2015). Por lo obtenido hasta el momento, vemos que las células de la microglía son la fuente, o una de las fuentes más importantes de mediadores pro-inflamatorios y citotóxicos asociados a la neuropatogenia por DENV observada *in vivo* en el SNC.

Por lo tanto, en el modelo *in vitro*, evaluamos sobre las células de la microglía infectadas con el virus D4MB-6 el efecto de los fármacos MK-801 y VPA, en su supervivencia (medido por MTT, TMRE, LDH), en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (CBA y qRT-PCR) y glutamato (ensayo colorimétrico para detección de Glutamato).

5.6.5 Actividad métabolica medida por MTT en las células de la microglía infectadas y tratadas con los fármacos

La administración de los fármacos MK-801 ($25\mu M$) o VPA (10mM), no afecto la supervivencia de las células microgliales.

Se observó que las células infectadas y sus respectivos controles presentaron a las 72 horas post tratamiento con los fármacos y 96 horas post-infección, un aumento en su actividad metabólica. Al respecto, en las células inoculadas con el Mock y tratadas con el fármaco MK-801 se observó un aumento en la actividad metabólica

(103.1%) con respecto a las células no tratadas con este fármaco, por su parte la administración del mismo en células infectadas, indujo a la generación de una actividad metabólica de 97.54% en las células infectadas con el virus D4MB-6 y del 99,63% en las células infectadas con el virus DENV-4. Algo similar sucedió con el tratamiento con VPA, donde se observó un aumento en la supervivencia celular del 108.6% cuando las células fueron infectadas con el virus D4MB-6 y del 107.56% en las células infectadas con el DENV-4 respecto al control de células infectadas no tratadas, descrito anteriormente. Comparado con el 92.7% y 94.5% en las células infectadas.



Figura 19. Evaluación de la supervivencia de las células de la microglia infectadas y tratadas con los fármacos MK-801 o VPA.

Se evaluó por MTT el efecto de los fármacos MK-801 o VPA en las células de la microglia infectadas por 96h y tratadas por 72h. De esta forma se observó que los farmacos aumentarón la actividad metabólica de las células infectadas respecto a las no tratadas. Se muestra el promedio de cuatro réplicas a partir de tres cultivos independientes.

*Estadísticamente significativo. p<0.05. Prueba estadística: ANOVA de una vía.

5.6.6 Efecto de los fármacos en el potencial de membrana mitocondrial de las células de la microglía infectadas.

Se evaluaron los posibles cambios en el potencial de membrana mitocondrial asociados a la administración de los fármacos MK-801 o VPA. Se observó que la administración de éstos, no produjo cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial obteniendo intensidades de fluorescencia similares a las observadas en los cultivos infectados no tratados (37000 URF) a las 72 horas post- tratamiento (**Figura 19A**). Por otro lado, el tratamiento de las células de la microglía infectadas con los fármacos indujo una disminución no significativa en la producción de LDH en este mismo tiempo (**Figura 19B**).



Figura 20. Evaluación de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial (TMRE) y producción de LDH en células de la microglía infectadas y tratadas con los fármacos MK-801 y VPA.

Las células de la microglia infectadas y tratadas con los fármacos fueron expuestas a la sonda TMRE **(A)** o procesadas para cuantificar la actividad de la LDH **(B)** como se describe en los materiales y métodos. Se observa que en ninguna de las condiciones evaluadas hubo cambios en el potencial de membrana mitocondrial, lo que confirma que la infección no afecta la fisiología del organelo. Por otro lado se encontró que los fármacos indujerón una disminución no significativa en la liberación de LDH, siendo mas evidente con el fármaco MK-801. Se muestra el promedio de tres réplicas a partir de tres cultivos independientes. **URF: unidades relativas de fluorescencia**.

5.6.7 Producción de citoquinas en las células de la microglía tratadas

Ambos fármacos indujeron un efecto inmunomodulador, que redujo la liberación de mediadores pro-inflamatorios.

Por ejemplo, se observó en las células infectadas y tratadas con MK-801 una disminución en la concentración de TNF- α que correspondió a 437.67 pg/ml y de 433.99pg/ml cuando fueron tratadas con VPA, comparado con lo obtenido en las células infectadas no tratadas donde se cuantificó 11,344 pg/ml (**Figura 21**).



Figura 21. Cuantificación de citoquinas y quimoquinas por CBA en los sobrenadantes de células de la microglía infectadas o no y tratadas con MK-801 o VPA

Los sobrenadantes de las células de la microglía infectadas y tratadas con los fármacos fueron evaluados por CBA. Se observó que los tratamiento con los fármacos indujo una considerable disminución en la producción y liberación de moléculas pro- inflamatorias a las a 72 h de tratamiento comparado con los controles infectados no tratados. Se muestra el promedio de tres réplicas por condición de tres cultivos independientes. *Estadísticamente significativo p<0.05. Kruskal Wallis test.

Todas las evaluaciones se realizaron a las 72 horas post- tratamiento con el fármaco, para ver detalles, revisar Fig. 13.

Estos hallazgos se confirmaron por qRT-PCR. En las células infectadas y tratadas con el fármaco MK-801 se observó una disminución en la expresión del transcrito para TNF- α de 6.47 veces con respecto al Mock, y el tratamiento con VPA mostró un efecto inmunomodulador mayor pues disminuyó su expresión a 3.97 veces, comparado con lo obtenido en las células infectadas no tratadas que fue de 7.22 veces (Figura 21).

Los tratamientos también redujeron la producción de la quimioquina MCP-1. Con ambos tratamientos se observó una reducción en la concentración de proteína a 377.9 pg/ml y 415.7 pg/ml con el tratamiento con MK-801 y VPA respectivamente, comparado con las células no tratadas que presentaron 13910.92 pg/ml. De igual modo los transcritos para MCP-1 disminuyeron a 5.26 y 6.32 veces respectivamente cuando se trataron con cada uno de los fármacos comparado con lo obtenido en las células infectadas no tratadas de 11.85 veces.

Algo similar se obtuvo para la IL-6, en los sobrenadantes obtenidos a partir de células infectadas y tratadas con MK-801 o VPA se detectó 322.7 pg/ml y 716.2 pg/ml respectivamente, una reducción en la importante comparada con lo obtenido en las células infectadas no tratadas que correspondió a 36873.54 pg/ml. Del mismo modo los transcritos disminuyeron su expresión a 4.75 y 4.52 veces bajo el tratamiento con MK-801 y VPA respectivamente en comparación con lo obtenido en las células no tratadas cuya expresión fue de 8.60 veces con respecto al Mock.

Finalmente, por qRT-PCR se observó una reducción en la expresión de transcritos para iNOS, la cual fue de 7.53 veces en las células de la microglía tratadas con MK-801 y 6.66 veces en las tratadas con VPA, respecto a la expresión de 8.91 veces obtenido en las células infectadas con D4MB-6 y no tratadas farmacológicamente **(Figura 22).**





La expresión de los transcritos para estás moléculas pro-inflamatorias se cuantificó por qRT-PCR en las células infectadas y tratadas. Se observó que la administración de ambos fármacos indujo una disminución en la expresión de los transcritos evaluados. Se muestra el promedio de tres réplicas a partir de tres cultivos independientes por experimento. *Estadísticamente significativo p<u>≤</u>0.05. Kruskal Wallis test.

5.6.8 Producción de glutamato en las células de la microglía tratadas con los fármacos MK-801 o VPA

Respecto a la producción de glutamato por parte de las células de la microglía infectadas y tratadas, se observó que los dos fármacos utilizados redujeron de manera significativa la producción de glutamato. En las células tratadas con el fármaco MK-801 la concentración de glutamato se redujo a 2.38nM, y en las tratadas con VPA la concentración fue de 1.12nM, comparado con lo obtenido en las células infectadas no tratadas que fue de 11.77nM (Figura 23).





La administración de los fármacos (72 horas de tratamiento: Ver esquema) indujo una disminución en la producción de glutamato. Sin embargo VPA mostró mayor efecto inhibitorio en su producción. Se realizaron tres réplicas a parir de tres cultivos independientes por experimento.*Estadísticamente significativo p<0.05. Kruskall Wallis test.

De esta forma caracterizamos la respuesta de las células de la microglía frente a la infección por D4MB-6, la cual estuvo representada por la producción de moléculas pro-inflamatorias y glutamato, del igual modo se determinó que con los fármacos MK-801 y VPA tienen un efecto directo sobre las células de la microglia y reducen considerablemente su activación y la producción de los factores solubles.

4. DISCUSIÓN

A pesar de ser considerado un virus no neurotrópico, la evidencia sugiere que el DENV puede infectar y afectar el SNC en humanos. Al respecto, algunos reportes demuestran que la infección puede cursar con alteraciones neurológicas leves, moderadas o severas, entre las cuales se reportan: coma, convulsiones, encefalitis, encefalopatías, síndrome de Guilláin Barré, entre otros (Verma et al., 2014).

Son pocos los modelos que explican la neuroinfección y la neuropatogenia que sucede durante la infección con el DENV. Por esa razón en nuestro grupo se desarrolló un modelo de neuroinfección en el cual tras inocular periféricamente en ratones de 2 y 7 dpn, una variante neuroadaptada del DENV denominada D4MB-6, fue posible reproducir algunos signos neurológicos que han sido previamente reportados en humanos. En principio, se observaron daños en la arquitectura del tejido y la pérdida neuronal, asociada a la invasión del virus al tejido y a la exacerbada respuesta inmune local, mediada por células inmunes infiltradas y a la infección y/o activación de las células de la glía. En este modelo, resultaron de particular interés las células de la microglía debido a que estas fueron susceptibles a la infección y mostraron adicionalmente cambios morfológicos que sugerían activación (Velandia et al., 2012).

Por lo tanto nos propusimos evaluar y caracterizar *in vitro* la respuesta de las células de la microglía frente a la infección con el D4MB-6.

En primer lugar, nuestro modelo nos obligó a obtener células de la microglía a partir de tejido cerebral de ratones de 7 días de nacidos para replicar algunas condiciones evaluadas en el modelo *in vivo*. Por lo tanto, modificamos el protocolo de Deierborg, 2013, en el cual sustituimos la tripsina por una solución de colagenasa y dispasa para disociar el tejido cerebral y se evitó el uso de gradientes de centrifugación y la adición de factores como el estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) que pueden influir en los estados de activación y de diferenciación de las células recuperadas (Moussaud & Draheim, 2010). Estos cambios junto a la purificación por tripsinización suave nos permitieron obtener alrededor de $4,5x10^4$ células de la microglía por cerebro procesado con un 96 % de pureza, y aunque este número fue menor al reportado con el protocolo de purificación con perlas magnéticas ($3x10^6$) (Ganter et al,1992), nos permitió obtener un cultivo reproducible, altamente puro, con una baja activación y una alta capacidad de proliferación.

Una vez obtenidas y caracterizadas las células de la microglía evaluamos la susceptibilidad a la infección con el virus D4MB-6. La infección de las células de la microglía con el DENV ha sido reportada por Bhatt et al., 2015, y Tsai et al, 2016. Los primeros autores reportaron la infección de estas células con los cuatro serotipos del DENV, y la producción de una gran cantidad de partículas virales (10¹⁰ unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mI) al tercer día post-infección). También se reportó que estas se activan de manera diferencial frente a cada uno

de los serotipos del virus. Tsai et al, reportaron tanto *in vitro* como *in vivo* la infección de la microglía y reportaron que estas células en el modelo *in vivo* tienen un papel protector que retrasa la progresión de la infección y de los daños neurológicos asociados al virus. Esta última asociada principalmente a la producción de citoquinas y otros agentes antivirales.

En nuestro modelo observamos que las células de la microglía fueron altamente susceptibles a la infección con el D4MB-6 y produjeron de manera eficiente progenie viral. Esto confirma que las células de la microglía (cultivos primarios o de línea (BV-2)) se comportan de manera similar a los macrófagos y demuestra que las células de linaje mieloide (microglía y macrófagos) son un blanco importante en la infección por DENV (Tsung-Ting et al., 2016).

Adicionalmente, en las células de la microglía infectadas detectamos vesículas intracelulares intensamente marcadas con el anticuerpo dirigido contra la proteína E del virus. La acumulación de antígeno o partículas virales en estas vesículas, se ha considerado como un buen indicador de la capacidad replicativa de virus como el HIV en estas células (producción) (Orenstein, 1988), pero también se ha sugerido que es posible que en dichos compartimentos el virus sea almacenado y también transportado. De ser así, en conjunto todos estos aspectos convertirían a la microglía en importantes reservorios virales, ya que estas células infectadas podrían acumular partículas virales en estos organelos por largos periodos de tiempo y quizas liberarlas de manera gradual (Gendelman et al., 1988; Lee et al., 1993).

Aunque el transporte y la acumulación de DENV en células de la microglía no habían sido reportadas previamente, hasta el momento desconocemos la razón de esto. Sin embargo, nuestros resultados confirman que las células de la microglía son un blanco importante para la infección por DENV adaptado o no al tejido nervioso tanto *in vitro* como *in vivo* (Velandia et al., 2012), y en estas se replica y produce eficientemente.

Debido a que la microglía establece una fuerte respuesta contra varios patógenos, evaluamos en nuestro modelo algunos aspectos relacionados con la activación de estas células asociada a la infección con el D4MB-6.

Activación de la microglía por el virus D4MB-6

En nuestro modelo de infección *in vivo* con el D4MB-6 reportamos previamente que la infección indujo cambios morfológicos en estas células, e *in vitro* observamos en los tres tiempos evaluados variaciones en el fenotipo obteniendo a las 48 y 72 hpi predominantemente células con morfología ameboides y redondeadas. Algo similar reporto Tsai et al. en 2016 utilizando un virus no adaptado a tejido nervioso, en un modelo de infección *in vivo* como *in vitro*, lo que confirma que el DENV adaptado o no a tejido nervioso infectó y estimuló las células de la microglía, y que estas células son un blanco importante de la infección y patogenia por este virus.

Los cambios morfológicos han sido reportados previamente en otras patologías neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Walker et al, 2015) y en algunas neuroinfecciones por HIV (Eugenin et al., 2005) y JEV (Thongan et al., 2010). Los cambios morfológicos de las células de la microglía están estrechamente asociados a la activación y producción de agentes pro-inflamatorios, lo que sugiere que estas células responden frente a la agresión de manera fenotípica y genotípica ante un estímulo que puede ser directo o indirecto.

Producción de citoquinas y otros agentes pro-inflamatorios

En nuestro modelo, la infección con el D4MB-6 indujo la expresión de MCP-1, TNF- α , IL-6, iNOS, glutamato y LDH, estableciendo de acuerdo a esto una polarización tipo M1.

Interesantemente, esta activación fue atenuada de manera importante por la aplicación de los fármacos VPA o MK-801. Cabe recordar que el VPA inhibe la deacetilación de las histonas, modulando la expresión de genes asociados a respuesta inmune y supervivencia celular, mientras que el fármaco MK-801 bloquea de manera no competitiva el receptor NMDA de glutamato, y la microglía al igual que las neuronas expresan estos receptores y son sensibles a este fármaco (Chen et al, 2012). Por lo tanto, el efecto de estos fármacos en nuestro modelo sugiere que el virus indujo en estas células una respuesta que conllevó a la producción de agentes como el TNF- α y glutamato; la cual pudo ser simultánea y sinérgica aunque aún no podemos definir cuál de ellas sucedió primero.

En los experimentos con células infectadas no tratadas, observamos en los diferentes tiempos post-infección evaluados que el D4MB-6 indujo la producción de grandes cantidades de TNF- α . Esto nos sugiere -dada la naturaleza de este factorque es central en la respuesta del tejido nervioso durante la infección por DENV y coincide con lo reportado en pacientes y en otros modelos de infección sistémica donde el TNF- α es detectado tempranamente en suero y en tejidos (Tolosa et al, 2011), por lo que es considerado como un agente inmunomodulador y un marcador de severidad asociado a la infección.

El TNF- α en el tejido nervioso es producido principalmente por las células de la microglía y sólo en condiciones patológicas muy específicas por los astrocitos y neuronas (Tolosa et al, 2011). Este factor es pleiotrópico y participa tanto en la homeóstasis del tejido nervioso como en la progresión de procesos fisiopatológicos.

De acuerdo a nuestros resultados, la infección y la replicación del D4MB-6 moduló de manera directa la producción de TNF- α , la cual pudo inducir un *loop* paracrino que incrementó y estimuló su producción, y la de otras moléculas como la IL-6 y el glutamato. Esto nos sugiere que la microglía activada por el D4MB-6 responde de manera dual produciendo de manera simultánea agentes pro-inflamatorios y citotóxicos como el TNF- α y el glutamato y neuroprotectores como la IL-6.

Al respecto, a pesar de que la IL-6 es ampliamente conocida como una citoquina pro-inflamatoria, tambien ha mostrado favorecer la supervivencia celular mediante el establecimiento de un papel anti-inflamatorio; además se ha descrito que esta citoquina es requerida para controlar la respuesta inmune local y sistémica (Baloul y Lafón, 2003). Adicionalmente IL-6 en el tejido nervioso, incrementa la permeabilidad de la BHE e induce la proliferación y la activación de la microglía (Winter et al, 2004) y por otro lado favorece el incremento en la producción de NO lo cual causa la disfunción de las neuronas motoras de la médula espinal (Krishnan et al, 2004). Esto hace de la IL-6 una citoquina con actividad dual que depende de un fino balance en el estímulo (intensidad y duración), su concentración y el tipo de células blanco. De acuerdo a nuestros resultados, las células de la microglía podrían ser una fuente de esta citoquina la cual es producida por las células infectadas y activadas y podría explicar los hallazgos reportados recientemente. Al respecto Mehta et al. 2016 reportaron un aumento en la concentración de IL-6 e IL-8 en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes que presentaron alteraciones neurológicas por dengue, y sugieren que su presencia en concentraciones altas puede contribuir a la patogénesis y severidad de la enfermedad, y aclaran que el papel de estas citoquinas en LCR está por determinar pues no se ha establecido el tipo celular del tejido nervioso que las produce.

Glutamato y otros agentes neurotóxicos

Como se dijo anteriormente, la producción y liberación de glutamato inducida por el D4MB-6 está relacionada directamente con la producción de TNF- α . La excitotoxicidad por glutamato asociada a la infección por DENV fue sugerida por nuestro grupo en el modelo *in vivo* y es al parecer, es un factor determinante en la neuropatogenia causada por otros flavivirus como fue reportado previamente en modelos de neuroinfección con JEV (Chen et al., 2012). De acuerdo a nuestros resultados y a los reportados con JEV las células de la microglía son las principales células productoras y liberadoras de este neurotransmisor y de nuevo ubica a esta célula en el centro de la neuropatogenia por estos virus.

En nuestro modelo, como en otros tanto *in vitro* como *in vivo* la liberación y la producción de glutamato dependen directamente de la presencia de TNF- α . *In vivo* las altas concentraciones de TNF- α bloquean los transportadores de glutamato (GLT) presentes en los astrocitos y estimulan a las células de la microglía a producir y liberar glutamato, lo cual aumenta la concentración del neurotransmisor en el espacio extracelular (Olmos y Lladó, 2014). Este último se une al receptor NMDA presente en las células e induce -por lo menos en las neuronas-, la despolarización, la inhibición de la respiración mitocondrial y la entrada masiva de calcio que en conjunto inducen la muerte neuronal (Bal-Price & Brown, 2001). Dentro del rompecabezas de la neuropatogenia por DENV podemos sugerir que las células de la microglía infectadas y activadas producen TNF- α y glutamato, y estos dos agentes pueden tener efectos directos y lesivos sobre las neuronas.

En nuestro modelo también se observó un aumento en la expresión de iNOS. Estos hallazgos están de igual modo relacionados con el incremento de glutamato y TNF-

 α en el medio y coincide con lo reportado por Nakamura en 2003 en microglía estimulada con LPS, y al estrés oxidativo inducido por el virus Herpes Simplex I en ratones (Marques, 2008). Adicionalmente, la enzima iNOS sólo se expresa en el tejido nervioso en condiciones de estrés y se reporta que puede producir más de 1µM de ON. El ON causa en el tejido nervioso entre otros aspectos la activación, proliferación y migración de las células de la microglía y la muerte neuronal por inhibición de la respiración mitocondrial, la despolarización mitocondrial y la muerte neuronal por glutamato es central en el desarrollo de la neuropatogenia por DENV y esta depende de la infección y activación de las células de la microglía.

Por último, resaltamos como un resultado particular de nuestro modelo la liberación de grandes cantidades de LDH en las primeras 24 hpi. La liberación de LDH no asociada a lisis celular, es considerada como un indicador de sobre-activación de macrófagos, y ha sido reportada durante falla hepática aguda. En esta, los macrófagos sobre activados deben inducir la muerte de las células infectadas y/o dañadas y a la vez inducir la proliferación de las mismas, por lo tanto, se sugiere que la producción y liberación de esta enzima en tiempos tempranos acelera los procesos e induce la recuperación del tejido (Kotoh et al, 2011). Este proceso no había sido reportado previamente para DENV y sugiere que la microglía responde tempranamente frente a la infección, liberando LDH sin que esta estuviera asociada al daño y muerte celular. Aunque este hallazgo es novedoso y muy interesante durante la infección por DENV debe ser estudiado con más detalle.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que las células de la microglía son centrales en el desarrollo de la neuropatología por DENV.

Son células altamente susceptibles al virus y producen grandes cantidades de partículas virales. Que luego de la infección se activan y producen moléculas como TNF- α que regulan de manera auto y paracrina la superviviencia y la activación misma de las células. También sugerimos que durante la activación las células de la microglía producen glutamato y este junto al TNF- α y otras citoquinas al parecer son algunos de los agentes que promueven la inflamación, el stress y la muerte neuronal durante la infección *in vivo*.

5. CONCLUSIONES

- 1. Se obtuvo un cultivo de células de la microglía a partir de ratones neonatos con un alto porcentaje de pureza y bajo estado de activación.
- 2. Se confirmó la alta susceptibilidad a la infección de las células de la microglía con el virus DENV adaptado o no a tejido nervioso y además estas células produjeron particulas virales infecciosas.
- El D4MB-6 indujo la activación de las células de la microglía asociada a cambios morfológicos y a la producción de LDH, TNF-α, IL-6, MCP-1, glutamato e iNOS como posibles agentes de defensa antiviral.
- El uso de los fármacos VPA y MK-801 permitió verificar que la activación de la microglia asociada a la infección con el D4MB-6. Esta depende directamente del glutamato y de factores como TNF-α.
- 5. La infección de las células de la microglía activadas frente a la infección del D4MB-6 lo cual podría explicar in vivo la neuropatogenia de la infección.

6. PERSPECTIVAS

- 1. Evaluar y caracterizar *in vitro* la producción de ROS u otras moléculas relacionadas a stress oxidativo asociadas a iNOS durante la infección con el D4MB-6.
- 2. Evaluar los mecanismos involucrados en la producción de LDH, glutamato y mediadores inflamatorios y el efecto de los mismos en la infección por D4MB-6.
- 3. Evaluar sobre neuronas *in vitro*, los efectos que tienen los mediadores proinflamatorios o citotóxicos producidos por las células de la microglía.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1. Akiyama, H. Barger, S. Barnum, S. Bradt, B. Bauer, J. Cole, G. et al. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 21:383–421.
- Alliot F, Marty MC, Cambier D, Pessac B. (1996). A spontaneously immortalised mouse microglial cell line expressing CD4. Brain Res Dev Brain Res. 95:140–3.
- 3. Aloisi F. (2001). Immune function of microglia. Glia. 36:165–79.
- Araújo, F. Nogueira, R. De Sousa -Araújo, M. Perdigão, A. Cavalcanti, et al. (2012). Dengue in Patients with Central Nervous System Manifestations, Brazil. Emerg Infect Dis. 18(4): 677–79.
- 5. Bal-Price, A. Moneer, Z. Brown, G. (2002). Nitric oxide induces rapid, calciumdependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. Glia. 40(3): 312–23.
- 6. Baloul, L. Lafon, M. (2003). Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. Biochimie. 85(8):777-88.
- Barger SW, Hörster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson M. (1995). Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca2⁺ accumulation. Proc Natl Acad Sci USA. 92(20):9328-32.
- 8. Barres, B. (2008). The mystery and magic of glia: A perspective on their roles in health and disease. Neuron. 60(3):430–40.
- 9. Baud, V. Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. Trends Cell Biol. 11(9):372–77.
- 10. Bhatt, S. Gething, P. Brady, O. Messina, J. Farlow, A. Moyes, C. et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. Nature. 496: 504–07.
- Bezzi, P. Carmignoto, G. Pasti, L. Vesce, S. Rossi, D. Rizzini P. et al. (1998). Prostaglandins stimulate calciumdependent glutamate release in astrocytes. Nature. 391: 281-85.
- Boche, D. Perry, V. Nicoll, J. (2013). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. Neuropathol Appl Neurobiol. 39(1): 3–18.
- Bode, K. Schroder, K. Hume, D. Ravasi, T. Heeg, K. Sweet, M. et al. (2007). Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. Immunol. 122: 596-606.
- 14. Boje, K. Arora, P. (1992). Microglial produced nitrid oxide and nitrogen oxides mediate neuronal cells. Brain Res. 587(2): 250 56.
- Boscia, F. Esposito, C. Casamassa, A. De Franciscis, V. Annunziato, L. Cerchia, L. (2013). The isolectin IB4 binds RET receptor tyrosine kinase in microglia. J Neurochem. 126(4): 428-36.
- 16. Cabrera, J. Lopes, O. Hernández, E. (1984). Alteraciones electroencefalográficas en la fiebre hemorrágica de dengue. Revisión sobre sus manifestaciones neurológicas. Rev Cub Med. 23: 468-78.

- 17. Camacho, S. (2015). Evaluación de la Excitotoxicidad por glutamato inducida por el virus dengue neuroadaptado D4MB-6 (Tesis de Maestría). Universidad El Bosque. Bogotá- Colombia.
- Carlson, N. Wieggel, W. Chen, J. Bacchi, A. Rogers, S. Gahring, L. (1999). Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. J Immunol. 163(7): 3963-8.
- 19. Carod-Artal, F. Wichmann, O. Farrar, J. Gascón, J. (2013). Neurological complications of dengue virus infection. Lancet Neurol. 12(9): 906–19.
- Carson, M. (2002). Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems, functional implications for multiple sclerosis. Glia. 40:218– 31.
- 21. Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. (1998). Mature microglia resemble immature antigen presenting cells. Glia. 22:72–85.
- 22. Chambers, T. Hahn, C. Galler, R. Rice, C. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu Rev Microbiol. 44:649–688.
- 23. Chao, C. Hu, S. Peterson, P. (1995). Glia, cytokines, and neurotoxicity. Crit Rev Neurobiol. 9(2-3):189-205.
- 24. Chao, C. Hu, S. Peterson, P. (1996). Glia: the not so innocent bystanders. J Neurovirol. 2(4):234-39.
- 25. Chen, C. Ou, Y. Chang, C. Pan, H. Liao, S. Chen, S. et al. Raung SL, Lai C. (2012). Glutamate released by Japanese encephalitis virus infected microglia involves TNF-α signaling and contributes to neuronal death. Glia. 60(3):487-501.
- 26. Chéret, C. Gervais, A. Lelli, A. Colin, C. Amar, L. Ravassard, P. et al. (2008). Neurotoxic activation of microglia is promoted by a Nox1-dependent NADPH oxidase. J. Neurosci. 28(46): 12039–51.
- 27. Chhor, V. Le Charpentier, T. Lebon, S. Oré, M. Celador, I. Josserand, J. et al. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia *in vitro*. Brain Behav Immun. 32:70–85.
- 28. De Groot, C. Montagne, L. Janssen, I. Ravid, R. Van, D. Veerhuis, V. (2000). Isolation and characterisation of adult microglial cells and oligodendrocytes derived from postmortem human brain tissue. Brain Res Brain Res Protoc. 5:85–94.
- 29. Deierborg, T. (2013). Preparation of primary microglia cultures from postnatal mouse and rat brains. Methods Mol Biol. 1041:25-31.
- 30. Devarajan, G. Chen, M. Muckersie, E. Xu, H. (2014). Culture and characterization of microglia from the adult murine retina. ScientificWorldJournal. 2014:894-368.
- Drapier, J. Hibbs, J Jr (1986): Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. Inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. J Clin Invest. 78:790–797.
- 32. Estrada, R. (1983). Sobre los síndromes neurológicos que han ocurrido durante nuestras dos recientes epidemias por virus dengue y sus posibles interrelaciones. Rev Cub Hig Epid. 21:105-113.

- Eugenin, E. Dyer, G. Calderon, T. Berman, J. (2005). HIV-1 tat protein induces a migratory phenotype in human fetal microglia by a CCL2 (MCP-1)- dependent mechanism: possible role in NeuroAIDS. Glia. 49(4):501-10.
- 34. Fenn, A. Henry. C. Huang, Y. Dugan, A. Godbout, J. (2012). Lipopolysaccharide- induced interleukin (IL) 24 receptor-alpha expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice. Brain Behav Immun. 26:766–777.
- 35. Fine, S. Angel, R. Perry, S. Epstein, L. Rothstein, J. Dewhurst, S. et al. (1996) Tumor necrosis factor inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. J. Biol. Chem. 271, 15303-06.
- 36. Flaris, N. Densmore, T. Molleston, C. Hickey, W. (1993). Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: Definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. Glia. 7:34-40.
- 37. Ford, A. Goodsall, A. Hickey, W. Sedgwick, J. (1995). Normal adult ramified microglía separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. J Immunol. 154:4309–21.
- 38. Ganter, S. Northoff, H. Mannel, D. Gebicke-Harter, P. (1992). Growth control of cultured microglia. J Neurosci Res. 33:218–230.
- 39. Gao, H. Hong, J. (2008). Why neuro-degenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. Trends Immunol. 29(8):357-65
- 40. García-Rivera, E. & Rigau-Perez, J. (2002). Encephalitis and dengue. Lancet. 360(9328): 261.
- 41. Gendelman, H. Orenstein, J. Martin, M. Ferrua, C. Mitra, R. Phipps, T. et al. (1998). Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. J Exp Med. 167:1428-1441.
- Georg, B. Morwinsky, A. Keitel, V. Qvartskhava, N. Schreor, K. Heaussinger D. (2010). Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. Glia. 58:691–705.
- 43. Gerhauser, I. Hansmann, F. Puff, C. Kumnok, J. Schaudien, D. Wewetzer, K. et al. (2012). Theiler's murine encephalomyelitis virus induced phenotype switch of microglia *in vitro*. Neuroimmunol. 252(1-2):49-55.
- Ghoshal, A. Das, S. Ghosh, S. Mishra, M. Sharma, V. Koli, P. Sen, E. Basu, A. (2007). Proinflammatory mediators released by activated microglía induces neuronal death in Japanese encephalitis. Glia. 55:483–96.
- 45. Giulian, D. (1993). Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. Glia. 7(1):102-10.
- 46. Giulian, D & Baker, T. (1986). Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. J Neurosci. 6(8):2163-78.
- 47. Glass, C. Saijo, K. Winner, B. Marchetto, M. Gage, F. (2010). Mechanisms

underlying inflammation in neurodegeneration. Cell. 140 (6): 918-34.

- Görg, B. Morwinsky, A. Keitel, V. Qvartskhava, N. Schreor, K. Heaussinger D. (2010). Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. Glia. 58:691–705.
- 49. Greenamyre, J. Porter, R. (1994). Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. Neurology. 44:S7–S13.
- 50. Gubler, D. (2010). Dengue Viruses. In: Brian, W.J., Mahy Marc H.V Regenmortel, Van Regenmorter (Eds.), Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology. Academic Press. 371–381.
- 51. Hanish, U. (2002). Microglia as a Source and Target of Cytokines. Glía. 40: 140-155.
- 52. Hanisch, U. Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci. 10(11): 1387–94.
- Hewett, S. Csernansky, C. Choi, D. (1994): Selective potentiation of NMDAinduced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. Neuron. 13:487–94.
- 54. Hickey, W. (2001). Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. Glia. 36:118–24.
- 55. Jeong, M. Hashimoto, R. Senatorov, V. Fujimaki, K. Ren, M. Lee, M. et al. (2003). Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition. FEBS Lett. 542(1-3):74-78.
- 56. Jin, D. Lim, C. Hwang, J. Ha, I. Han, J. (2005). Anti-oxidant and antiinflammatory activities of macelignan in murine hippocampal cell line and primary culture of rat microglial cells. Biochem Biophys Res Commun. 331(4):1264-1269.
- 57. Kinouchi, K. Brown, G. Pasternak, G. Donner, D. (1991). Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor-alpha in the brain. Biochem Biophys Res Commun. 181(3):1532–38.
- 58. Kitamura, T. (1973). The origin of brain macrophages-some considerations on the microglia theory of Del Rio-Hortega. Acta Pathol Jpn. 23(1):11-26.
- 59. Klegeris, A. McGeer, E. McGeer, P. (2007). Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease. Curr Opin Neurol, 20(3):51–357.
- 60. Kotoh, K. Kato, M. Kohjima, M. Tanaka, M. Miyazaki, M. Nakamura, K. et al. (2011). Lactate dehydrogenase production in hepatocytes is increased at an early stage of acute liver failure. Exp Ther Med. 2(2):195-199.
- 61.Krammer P. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. Nature, 407(6805):789–795.
- 62. Krishnan, C. Kaplin, A. Deshpande, D. Pardo, C. Kerr, D. Transverse myelitis: Pathogenesis, diagnosis and treatment. Front Biosci 2004; 9:1483-9.
- 63. Kumar, R. Tripathi, S. Tambe, J. Arora, V. Srivastava, A. Nag, V. (2008). Dengue encephalopathy in children in northern india: clinical features and comparison with non dengue. J Neurol Sci. 269(1-2):41–48.
- 64. Lee, S. Liu, W. Roth, P. Dickson, D. Berman, J. Brosnan, C. et at. (1993). Macrophage colony stimulating factor in human fetal astrocytes and

microglia: differential regulation by cytokines and lipopolysaccharide, and modulation of class 11 MHC on microglia. J Immunol. 150:594-604.

- 65. Liang, J. Takeuchi, H. Doi, Y. Kawanokuchi, J. Sonobe, Y. Jin, S. (2008). Excitatory amino acid transporter expression by astrocytes is neuroprotective against microglial excitotoxicity. Brain Res. 1210:11–19.
- 66. Liao, S. Chen, C. (2001). Differential effects of cytokines and redox potential on glutamate uptake in rat cortical glial cultures. Neurosci Lett. 299:113–116.
- 67. Lipton, S. Choi, Y. Pan, Z. Lei, S. Chen, H. Sucher, N. (1993): A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. Nature. 364:626–32.
- 68. Liu, G. Nagarajah, R. Banati, R. Bennett, M. (2009). Glutamate induces directed chemotaxis of microglia. Eur J Neurosci. 29(6):1108-18.
- Lokensgard, J. Hu, S. Sheng, W. VanOijen, M. Cox, D. Cheeran, M. et al. (2001). Robust expression of TNF-alpha, IL-1beta, RANTES, and IP- 10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. J Neurovirol. 7(3):208-19.
- 70. Mack, C. Vanderlugt-Castaneda, C. Neville, K. Miller, S. (2003). Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 144(1-2):68-79.
- 71. Maezawa, I. & Jin, L. (2010). Rett syndrome microglia damage dendrites and synapses by the elevated release of glutamate. J Neurosci. 30(15): 5346– 56.
- 72. Mander, P. Jekabsone, A. Brown, G. (2006). Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. J Immunol. 176(2):1046–1052.
- 73. Marques, C. Cheeran, M. Palmquist, J. Hu, S. Lokensgard, J. (2008). Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. J Neurovirol. 14(3):229-38.
- 74. McCoy, M. & Tansey, M. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. J Neuroinflammation. 5: 45.
- 75. Medvedev, A. Sundan, A. Espevik, T. (1994). Involvement of the tumor necrosis factor receptor p75 in mediating cytotoxicity and gene regulating activities. Eur J Immunol. 24(11):2842–49.
- 76. Mehlhorn, G. Hollborn, M. Schliebs, R. (2000). Induction of cytokines in glial cells surrounding cortical beta-amyloid plaques in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer pathology. Int J Dev Neurosci. 18(4-5):423-31.
- 77. Mehta, V. Verma, R. Garg, R. Malhotra, H. Sharma, P. Jain, A. (2016). Study of interleukin-6 and interleukin-8 levels in patients with neurological manifestations of dengue. J Postgrad Med. 2016. Epub ahead of print.
- 78. Melief, J. Koning, N. Schuurman, K. Van De Garde, M. Smolders, J. Hoek, R. et al. (2012). Phenotyping primary human microglia: tight regulation of LPS responsiveness. Glia. 60(10):1506-17.
- 79. Micheau, O. & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor 1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell. 114(2):181–90.

- Moussaud S, Draheim H. (2010). A new method to isolate microglia from adult mice and culture them for an extended period of time. J Neurosci Meth. 187: 243–53.
- 81. Murphy, S. (2000). Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. Glia. 29(1): 1–13.
- 82. Murugan, M. Ling, E. Kaur, C. (2013). Glutamate receptors in microglia. CNS & Neurological Disorded Drug Targets. 12(6):773-84.
- 83. Nakajima, K. & Kohsaka, S. (2001). Microglia: Activation and their significance in the central nervous system. J Biochem. 130(2):169–175.
- 84. Nakamura, Y. Ohmaki, M. Murakami, K. Yoneda, Y. (2003). Involvement of protein kinase C in glutamate release from cultured microglia. Brain Res. 962(1-2):122-8.
- Nimmerjahn, A. Kirchhoff, F. Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. Science. 308(5726):1314–18.
- 86. Orenstein, J. Meltzer, M. Phipps, T. Gendelman, H. (1988). Cytoplasmic assambly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-i-treated human monocytes: an ultrastructural study. J Virol. 62: 2578-86.
- 87. Organización mundial de la salud (OMS). (2009). DENGUE: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control.
- 88. Pawate, S. Shen, Q. Fan, F. Bhat, N. (2004). Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon gamma. J Neurosci Res. 77(44): 540–51.
- 89. Pennell, N. Hurley, S. Streit, W. (1994). Lectin staining of sheep microglia. Histochemistry. 102(6):483-86.
- 90. Perry, V. & Holmes, C. (2014). Microglial priming in neurodegenerative disease. Nat Rev Neurol. 10(4): 217–24.
- 91. Persson, M. Brantefjord, M. Hansson, E. Ronnback, L. (2005) Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-α. Glia. 51: 111– 120.
- 92. Peudenier, S. Hery, C. Montagnier, L. Tardieu, M. (1991). Human microglial cells: characterization in cerebral tissue and in primary culture, and study of their susceptibility to HIV-1 infection. Ann Neurol. 29(2):152-61.
- 93. Ponomarev, E. Novikova, M. Maresz, K. Shriver, L. Dittel, B. (2005). Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. J Immunol Methods. 300(1-2):32–46.
- 94. Prinz, M. Priller, J. Sisodia, S. Ransohoff, R. (2011). Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. Nat Neurosci. 14(10):1227–35.
- 95. Prinz, M. & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. Natu Rev Neurosci. 15(5): 300-12.
- 96. Prow, N. Irani, D. (2008). The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta,

mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute vial encephalomyelitis. J Neurochem. 105:1276–86.

- 97. Qin, L. Liu, Y. Wang, T. Wei, S. Block, M. Wilson, B. et al. (2004). NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. J Biol Chem, 279(2):1415-21.
- 98. Radi, R. Beckman, J. Bush, K. Freeman, B. (1991): Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J Biol Chem 266:4244–50.
- Raivich, G. Bohatschek, M. Kloss, C. Werner, A. Jones, L. Kreutzberg G. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. Brain Res Rev. 30:77–105.
- 100. Ransohoff, R. Perry, V. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu Rev Immunol. 27:119–45.
- 101. Rekling, J. (2003). Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation. Neurosci Lett. 335:167-70.
- Rushil, S. Bhatt, S. Kothari, T, Devanshi G, D'Souza, M. Abhay S. et al. (2015). Novel evidence of microglial immune response in impairment of Dengue infection of CNS. Immunobiol. 220(10):1170-6
- Sahu, R. Verma, R. Jain, A. Garg, R. Singh, M. Malhotra, H. et al. (2014). Neurologic complications in dengue virus infection: a prospective cohort study. Neurology. 83(18):1601-09.
- 104. Santos, N. Azoubel, A. Lopes, A. Costa, G. Bacellar, A. (2004). Guillain- Barré Syndrome in the course of dengue. Case report Arq NeuroPsiquiatr. 62(1):144-46.
- 105. Saura, J. (2007). Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. J neuroinflam. 4: 26-37.
- 106. Shakespear, M. Halili, M. Irvine, K. Fairlie, D. Sweet, M. (2011). Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. Trends Immunol. 32: 335-43.
- 107. Shen, Y. Li, R. Shiosaki, K. (1997). Inhibition of p75 tumor necrosis fact receptor by antisense oligonucleotides increases hypoxic injury and betaamyloid toxicity in human neuronal cell line. J Biol Chem. 272(6):3550–3553.
- 108. Streit, W. Morioka, T. Kalehua, A. (1992). MK-801 prevents microglial reaction in rat hippocampus after forebrain ischemia. Neuroreport. 3(2):146-148.
- 109. Streit, W. Walter, S. Pennel, N. (2000). Reactive microgliosis. Prog Neurobiol. 57:563– 581.
- Streit, W. Hurley, S. McGraw, T. Semple-Rowland, S. (2000). Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. J Neurosci Res. 61:10–20.

- 111. Streit, W. Xue, Q. (2009). Life and death of microglia. J Neuroimmune Pharmacol. 4(4):371-9.
- 112. Sedgwick J, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher G. (1991). Isolation and direct characterisation of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A. 88:7438–42
- 113. Suvannavejh, G. Dal Canto, M. Matis, L. Miller, S. (2000). Fasmediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoinmune encephalomyelitis. J Clin Invest. 105(2):223-231.
- 114. Takeuchi, H. Jin, S. Wang, J. Zhang, G. Kawanokuchi, J.Kuno, R. et al. (2006). Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autfocrine manner. J Biol Chem. 281(30):21362-8.
- 115. Tansey, M. Frank-Cannon, T. McCoy, M. Lee, J. Martinez, T. McAlpine, F., et al. (2008). Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? Front Biosci.13: 709–17.
- 116. Tartaglia, L. Goeddel, D. (1992). Two TNF receptors. Immunol Today. 13(5):151–153.
- 117. Taylor, D. Jones, F. Kubota, E. Pocock, J. (2005). Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor α induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. J Neurosci. 25(11): 2952- 2964.
- 118. Thongtan, T. Cheepsunthorn, P. Chaiworakul, V, Rattanarungsan, C. Wikan, N. Smith, D. (2010). Highly permissive infection of microglial cells by Japanese encephalitis virus: a possible role as a viral reservoir. Microbes Infect. 12(1): 37-47.
- 119. Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. Cell Signal. 16(2):139–144.
- 120. Tolosa, L. Caraballo-Miralles, V. Olmos, G. Llado, J. (2011). TNF- α potentiates glutamate -induced spinal cord motoneuron death via NF- kB. Mol Cell Neurosci. 46:176–86.
- 121. Tsung-Ting, T. Chia-Ling, Ch. Yee-Shin, L. Chih-Peng, Ch. Cheng-Chieh, T. et al. (2016). Microglia retard dengue virus-induced acute viral encephalitis. Sci Rep. 6:27670.
- 122. Turchan-Cholewo, J. Dimayuga, V. Gupta, S. Gorospe, R. Keller, J. Bruce- Keller, A. (2009). NADPH oxidase drives cytokine and neurotoxin release from microglia and macrophages in response to HIV-Tat. Antioxid Redox Signal. 11(2):193-204.
- 123. Valko, M. Leibfritz, D. Moncol, J. Cronin, M. Mazur, M. Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 39(1):44-84.
- 124. Velandia, M. & Castellanos, J. (2011). Dengue virus: structure and viral cycle.Infectio. 15(1): 33-43.
- 125. Velandia, M. & Castellanos, J. (2012). Flavivirus Neurotropism, Neuroinvasion, Neurovirulence and Neurosusceptibility Clues to

Understanding Flavivirus- and Dengue-Induced Encephalitis. En: García ML, Romanowski V, editores. Viral Genomes– Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host- Virus Interactions. Croacia: InTech: 219-40.

- 126. Velandia, M. Acosta, O. Castellanos, J. (2012). In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus J Neurovirol. 18:374–87.
- 127. Verma, R. Sahu, R. Holla, V. (2014). Neurological manifestations of dengue infection: a review. J Neurol Sci. 346(1-2):26-34.
- 128. Vilcek, J. 1998. The cytokines: an overview. In: Thomson A, editor. The cytokine handbook. San Diego: Academic Press. 1–20.
- 129. Walker, D. Whetzel, A. Lue, L. (2015). Expression of suppressor of cytokine signaling genes in human elderly and Alzheimer's disease brains and human microglia. Neuroscience. 302: 121-37.
- 130. Winter, J. Lehmann, T. Krauss, S. Trockenbacher, A. Kijas, Z. Foerster, J. et al. (2004). Regulation of the MID1 protein function is fine-tuned by a complex pattern of alternative splicing. Hum Genet. 114(6):541-52.
- 131. Xuan, A. Pan, X. Wei, P. Ji, W. Zhang, W. Liu, J. et al. (2014). Valproic Acid Alleviates Memory Deficits and Attenuates Amyloid-β Deposition in Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. Mol Neurobiol. 51(1):300-12.
- 132. Yang, C. Lee, H. Lee, J. Kim, J. Lee, S. Shin, D. et al. (2007). Reactive oxygen species and p47phox activation are essential for the Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory response in murine microglia. J Neuroinflam. 4:27.
- 133. Ye, L. Huang, Y.Zhao, L. Li, Y. Sun, L. Zhou, Y. et al. (2013). IL-1beta and TNF-α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. J Neurochem. 125(6): 897–908.

8. ANEXOS

ANEXO No. 1

Anticuerpo Primario o Lectina Marca Referencia	Anticuerpo Secundario Marca Dilución	Fluorocromo
OX2R Santa Cruz Biotechnology, sc-14392	Anti-cabra IgG biotinilado, Vector, AI-5000 (3 μg/ml)	Strepta-avidina acoplada a Alexa Fluor® 594
CD11b eBioscience, 14-0112-81	Ninguno	Strepta-avidina acoplada a Alexa Fluor® 594
Iba-1 Abcam,ab5076	Anti-conejo IgG biotinilado, Vector BA-5000. (3 μg/ml)	Strepta-avidina acoplada a Alexa Fluor® 594
Lectina Griffonia Simplicifolia o Ib4 (biot), Vector, AS-2104	Ninguno	Estreptavidina acoplada a peroxidasa Vector, SA-5014
Anti- NS1 Abcam, ab41623.	Anti-ratón IgG biotinilado, Vector, BA-9200 (1 μg/ml)	Alexa Fluor® 647
Anti-E (Encephalitis St Louis) Chemicon, Mab8744.	Anti-ratón IgG biotinilado, Vector, BA-9200 (1 μg/ml)	Strepta-avidina acoplada a Alexa Fluor® 647

ANEXO No. 2

Tipo de molécula	Transcrito	Sentido	Primer (5´3´)	Amplicón (pb)
Celular/ Activación	lba-1	forward	ACC TAG AGC TGA AGA GAT TA	134
Celular/ Activación	F4/80	forward	CTG TAA CCG GAT GGC AAA CT	103

		reverse	ATG GCC AAG GCA AGA CAT AC	
) (incl	Qánaida	forward	CAA TAT GCT GAA ACG CGA GA	405
Virai	Cápside	reverse	TGC TGT TGG TGG GAT TGT TA	125
		Forward (1 ^a ronda)	GTT GTG TGG TGT CAT GGA	
	NS1	Reverse (1ª ronda)	ATG AGC ATC TGT CTT TCC AGC AC	500
Viral		NS1	Forward (2ª ronda)	GGA TGA AAT TCC GAG AAG GA
		Reverse (2ª ronda)	ATG AGC ATC TGT CTT TCC AGC AC	200
Dro inflomatorio		forward	TGA AGG GAA TGG GTG TTC AT	142
Pro-Inflamatorio	ΠΝΕ-α	reverse	GAG TTG GAC CCT GAC CCA TA	142
Dro inflomatoria		forward	CTG ATG CTG GTG ACA ACC AC	142
	IL-0	reverse	TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC	140
Pro-inflamatorio	MCP-1	forward	AGC ACC AGC CAA	136

			CTC TCA CT			
		reverse	CGT TAA CTG CAT CTG GCT GA			
Molécula de	ICAM	forward	CCA AGG AGA TCA CAT TCA CG	115		
adhesión	ICANI	reverse	CCT CGG AGA CAT TAG AGA AC	115		
Pro-inflamatorio		forward	GCA GCT GAA TGG AAA GAT CA	98		
Pro-inflamatorio	ιειν-γ	reverse	TGG CAA AGG CAG TGT AAC TC	96		
Pro inflamatorio	IL-10	forward	CAT GGG TCT TGG GAA GAG AA	143		
Pro-Inflamatorio		reverse	AAC TGG CCA CAG TTT TCA GG	145		
Citatovisidad	iNOS	forward	AAA CCC CTT GTG CTG TTC TC	242		
Citotoxicidad	INUS	reverse	CCT TGT GGT GAA GAG TGT CA	213		
Colular	Gen de	forward	ATC CTC TTC CTC CCT GGA GA	222		
Ceiulai	reierencia β- actina	β- actina	β- actina	reverse	TGC CTG GGT ACA TGG TGG TA	233

ANEXO 3.

Transcrito	Programa de amplificación	Número de
lba 1	50^{9} C 15 min 05 ⁹ C 5 min 04 ⁹ C 20 and 60 ⁹ C	20
Iba-I	50°C- 15 mm, 95°C- 5 mm, 94°C- 50 seg, 60°C-	30
	$30 \text{ seg}, 40^{\circ}\text{C}-1 \text{ min.}$ Meiting curve $65^{\circ}\text{C}-95^{\circ}\text{C}.$	
F4/80	95°C- 5 min, 94°C- 2 min, 94°C- 30 seg, 50°C- 30	30
	seg. 72°C- 30 seg, 72°C- 30 seg.	
Cápside	95°C- 5 min, 94°C- 2 min, 94°C- 30 seg, 50°C- 30	30
	seg. 72°C- 30 seg, 72°C- 30 seg.	
NS1	95°C- 5 min, 94°C- 2 min, 94°C- 30 seg, 50°C-	30
	30 seg. 72°C- 30 seg, 72°C- 30 seg.	
TNF-α	50°C- 15 min, 95°C- 5 min, 94°C- 30 seg, 60°C-	30
	30 seg, 40°C- 1 min. Melting curve 65°C-95°C.	
IL-6	50°C- 15 min, 95°C- 5 min, 94°C- 30 seg, 60°C-	30
	30 seg, 40°C- 1 min. Melting curve 65°C-95°C.	
MCP-1	50°C- 15 min, 95°C- 5 min, 94°C- 30 seg, 60°C-	30
	30 seg, 40°C- 1 min. Melting curve 65°C-95°C.	
ICAM	95°C- 5 min, 94°C- 2 min, 94°C- 30 seg, 55°C- 30	30
	seg. 72°C- 30 seg, 72°C- 30 seg.	

IFN-γ	95°C- 5 min, 94°C- 2 min, 94°C- 30 seg, 55°C- 30	40
·	seg. 72°C- 30 seg, 72°C- 30 seg.40	
IL-10	95°C- 5 min, 94°C- 2 min, 94°C- 30 seg, 50°C- 30	40
	seg. 72°C- 30 seg, 72°C- 30 seg.	
iNOS	50°C- 15 min, 95°C- 5 min, 94°C- 30 seg, 60°C-	30
	30 seg, 40°C- 1 min. Melting curve 65°C-95°C.	
β- actina	50°C- 15 min, 95°C- 5 min, 94°C- 30 seg, 60°C-	30
-	30 seg, 40°C- 1 min. Melting curve 65°C-95°C.	