

Apoptosis por el Virus de la Fiebre Amarilla investigada en células de mamífero crecidas directamente sobre láminas de vidrio

Sergio Yebraíl Gómez¹, Wilfredo Valdivieso²

RESUMEN

Introducción: La muerte celular programada o apoptosis es un evento frecuente en células infectadas por virus. Existen varios procedimientos para investigar apoptosis en experimentos in vitro, para los cuales se requiere subcultivar células que crecen en frascos de 25 o 75 cm², lo que resulta en prolongación del tiempo para obtener el resultado. **Objetivo:** En este estudio se investigó apoptosis en células Vero infectadas con el virus de la fiebre amarilla y crecidas directamente sobre láminas de vidrio usadas en pruebas de inmunofluorescencia. **Resultados:** Se detectó condensación de cromatina usando el colorante Hoescht 33342 en 93,2% de células infectadas versus 2,6% de no infectadas, en las 72 horas siguientes a la infección ($P < 0.01$). En las células infectadas se evidenció pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana por coloración con yoduro de propidio. **Conclusiones:** Estos resultados indican que usando un sistema rápido de cultivo de células puede evaluarse apoptosis durante la replicación in vitro del virus de la fiebre amarilla. *Salud UIS 2008; 40: 7-12.*

Palabras clave: Fiebre amarilla, apoptosis, células Vero

SUMMARY

Introduction: Programmed cell death referred to as apoptosis is a frequent event in animal cells infected by viruses. There are many procedures to investigate apoptosis in vitro, experiments requiring subculture cells growing in flask of 25 – 75 cm² which result in prolonged time to get results. **Objective:** In this study was investigated apoptosis in Vero cells infected with yellow fever virus directly growing on glass slices used in immunofluorescent tests. **Results:** After 72 hours of virus infection, 93,2% of infected cells (in contrast with 2,6% of not infected cells) showed condensation of chromatin, using stain Hoescht 33342. In the same cells, loss of selective permeability was evidenced by stained with propidium iodide. **Conclusion:** This results show that, when we use a rapid culture cell system, it is possible to detect apoptosis during yellow fever virus replication in vitro. *Salud UIS 2008; 40: 7-12.*

Keywords: Yellow fever, apoptosis, Vero cells

1,2 Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP). Universidad Industrial de Santander. Estudiantes del Programa de Maestría en Ciencias Básicas Médicas. UIS. Trabajo realizado en el curso de Biología Celular II.

Correspondencia: Sergio Yebraíl Gómez Rangel. Km 2 vía al Refugio, Sede UIS Guatigua Teléfono: (7)6563971. Fax: (7) 6540177.

E-mail: sergioyebrailm@gmail.com

Recibido: Febrero 8 de 2008 - **Aceptado:** Mayo 30 de 2008

INTRODUCCIÓN

La apoptosis es una respuesta celular a estímulos nocivos ya sea de tipo químico, fisiológico o infeccioso. Este estímulo inicia una cascada de reacciones bioquímicas que resultan en la muerte de la célula como consecuencia de varios eventos¹. La mayoría de los virus que infectan humanos pueden inducir apoptosis durante la replicación in vitro en varias líneas celulares. Este fenómeno se ha reportado con virus de ADN, virus de la Hepatitis C, Virus de la Inmunodeficiencia Humana, Virus de la Influenza, entre otros²⁻⁴. La apoptosis es un evento que se evalúa con frecuencia en estudios sobre mecanismos de la patogénesis viral⁴⁻⁸ y de compuestos con aparente actividad antiviral⁹⁻¹¹.

Diferentes etapas durante el proceso de muerte celular por apoptosis se pueden investigar en el laboratorio^{12, 13}. Entre estos: a) condensación de cromatina, para lo cual las células se tiñen con el colorante de Hoechst 33342 o con 6-diamino-2fenilidol (DAPI); b) fragmentación de ADN que puede ser detectada por lo menos de dos maneras: exponiendo las células a un sistema que transfiere nucleótidos marcados a los extremos de los fragmentos de ADN (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP – TUNEL) o separando esos fragmentos en geles de agarosa; c) cambios en la arquitectura y permeabilidad de la membrana plasmática, que son detectables por tinción con anexina V la cual se liga a residuos de fosfatidilserina o con yoduro de propidio. En ambos casos, las células apoptóticas captan el colorante debido a pérdida de la selectividad de membrana sin cambiar la forma de la célula y d) actividad de caspasas, que puede ser evidenciada usando el inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).

Los procedimientos empleados para la observación de la apoptosis requieren la realización de un subcultivo celular, el cual es expuesto al estímulo deseado y posteriormente procesado para la medición del marcador escogido. Las células deben ser desprendidas del soporte de cultivo, y finalmente fijadas en láminas de vidrio para su evaluación. El procedimiento completo hasta obtener un resultado puede demorar hasta 6 días^{13, 14} y exige mayor manipulación de las células. En este trabajo se investigó apoptosis en monocapas de células Vero infectadas con el virus vacunal (17 D) de la fiebre amarilla (VFA) crecidas directamente en láminas de vidrio para observación microscópica, como un método útil para evaluación de la alteración o efecto citopático producido por la infección viral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células

Se usaron las líneas epiteliales Vero (riñón de mono verde africano) y HeLa (cáncer cervical humano). Las primeras

fueron mantenidas en medio M-199 (GIBCO-BRL) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y las otras en medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL); SBF 10%. De cada línea celular se hicieron cultivos en láminas de vidrio de 12 pozos (5 mm) usados en la técnica de Inmunofluorescencia (Cel Line). Las células fueron inicialmente crecidas en cajas de 25 cm² hasta monocapa confluyente, posteriormente se adicionó tripsina / EDTA para su desprendimiento y se obtuvo una suspensión luego de varios lavados. A cada pozo de la lámina de vidrio se adicionaron 50 µl de medio con 10% de SBF que contenía 2000 células y las láminas colocadas dentro de cajas de Petri se incubaron a 37°C en atmósfera con 5 % de CO₂. Se hicieron colectas cada 18 h para determinar la concentración celular en cámara de Neubauer.

Virus

Se utilizó la cepa vacunal (17 D) del VFA (Donación de Secretaría de Salud Departamental). El stock de virus se preparó infectando monocapas de células Vero crecidas en cajas de 75 cm². Luego de 3 días de incubación a 37°C con CO₂ al 5% se colectó el sobrenadante y se determinó el título viral por el método de plaqueo. Para esto, se hicieron diluciones base 10, y 100 µl de cada una se adicionaron a monocapas de células Vero en cajas de 24 pozos que se incubaron por 1 h a 37°C. Luego de varios lavados con tampón fosfato (PBS), las monocapas se cubrieron con medio de plaqueo (M-199 62,5%; SBF 6%; carboxi-metil-celulosa 31,5%) y las cajas se incubaron 6 días a 37°C con CO₂ al 5%. Las placas virales se visualizaron al colorear las monocapas con cristal violeta (3%), se contaron y la concentración se expresó en unidades formadoras de placa por ml (UFP / ml).

Detección de apoptosis

Se usaron como indicadores de apoptosis la condensación de la cromatina y la permeabilidad e integridad de la membrana plasmática. Monocapas de células Vero, crecidas en láminas de vidrio para inmunofluorescencia, fueron infectadas con el virus a multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 o 1,0 y la apoptosis se evaluó 24, 48 y 72 h post infección. Se siguió una modificación del protocolo descrito por Chang⁹, que brevemente consistió en: las células infectadas se lavaron con PBS, luego se adicionó una solución que contenía colorante de Hoescht 33342 (2 µM) y yoduro de propidio (4 µM) por 5 min a temperatura ambiente. La solución colorante fue retirada por lavados, las células se fijaron con formol (2% en PBS) y luego las láminas se observaron al microscopio de fluorescencia utilizando filtros Ex 450-490nm (Hoescht 33342) y Ex 580-620nm (yoduro de propidio). Como control negativo se incluyeron células Vero no infectadas con el virus y como positivo monocapas de células HeLa tratadas con etoposide (500 µM. Sigma Co.). En cada observación microscópica, de dos independientes, se calculó el porcentaje de células con cromatina condensada en 1000 contadas y se registró la presencia o ausencia de células coloreadas con yoduro de propidio (rojas). La observación también fue hecha por una persona que no conocía el objetivo del experimento.

RESULTADOS

Cultivo celular

Ambas líneas se replicaron en la lámina de vidrio y diferencias de crecimiento entre ellas no fueron aparentes. En las primeras 18 h, el número de células Vero o HeLa se duplicó obteniéndose la máxima concentración a las 48 h (± 10.000 células por pozo dependiendo de la línea), con variaciones incrementales menores hasta las 72 h. De acuerdo a estos resultados, se decidió infectar con el virus (VFA) 24 h después de la siembra asumiendo este periodo como el de la fase de mayor crecimiento celular. (Figura 1).

Apoptosis inducida por el virus 17 D

En monocapas celulares se observó el efecto citopático característico del virus (agrupamiento con apariencia de sincitios y desprendimiento de células) a partir de las 48h de infección. En las primeras 24h de infección a MOI de 0,1 o 1,0 el porcentaje de células con cromatina condensada fue $< 1\%$, igual que en los cultivos no infectados. A las 48 h se observó incremento mayor en las infectadas y a las 72 h la diferencia fue ampliamente significativa: $> 90\%$ vs $< 3\%$. ($P < 0.01$). Los resultados se muestran en la (Tabla 1 y Figura 2).

Con respecto a selectividad de membrana plasmática, en células infectadas 24 y 48 h a cualquier MOI no se observó coloración con yoduro de propidio, indicando que la selectividad no fue modificada. A las 72 h y con cualquier MOI, 80% o más de las células captaron el colorante. En las células no infectadas no se observó coloración con yoduro de propidio. (Figura 2).

Los resultados mostrados en la figura 2 permiten concluir que en células Vero la infección con el virus de la fiebre amarilla pudo haber inducido el proceso de apoptosis, al evidenciarse dos eventos característicos: condensación de cromatina y disminución de la selectividad de permeabilidad de la membrana plasmática (Figura 2 A).

DISCUSIÓN

La detección de apoptosis en células ha llegado a ser de suma importancia en muchos campos de la biología moderna, incluyendo estudios de desarrollo embrionario, biología y tratamiento del cáncer y procesos ligados a enfermedades infecciosas. La apoptosis ha sido reconocida como mecanismo de defensa de la célula hospedera contra la infección viral^{7, 8}. Las células infectadas que entran en apoptosis son rápidamente fagocitadas por células vecinas antes que el virus las abandone^{15, 16} y de esta manera se evita su diseminación a células adyacentes. En este estudio se demostraron dos de las alteraciones ocurridas durante el proceso de apoptosis como consecuencia de la replicación del VFA, esto último demostrado por la aparición del efecto citopático característico (Figura 2).

El proceso de apoptosis inducido en la célula hospedera ha sido reportado con el VFA. En monocapas crecidas en frascos de poliestireno, Lefeuvre¹⁷ observó que la infección de hepatocitos humanos (línea HepG2) con el virus usado en este estudio (VFA cepa vacunal 17 D) a MOI de 0,1 resultó en muerte celular por apoptosis. En 1,5% y 16,5% de las células se evidenció fragmentación del DNA (TUNEL positivo) y pérdida de la selectividad de membrana plasmática (Yoduro de propidio positivo), 48 h y 72 h post infección, respectivamente. Utilizando los mismos marcadores y la misma línea celular, Marianneau¹⁸ encontró resultados similares con MOI de 1, 10 y 20.

En nuestro estudio no observamos diferencia en la inducción de apoptosis entre los MOI evaluados, similar a lo encontrado en los estudios mencionados anteriormente. Las diferencias encontradas en los porcentajes de células apoptóticas pueden deberse a la susceptibilidad de cada línea celular a la infección viral, como se ha reportado con virus dengue¹⁹ y a que los marcadores de apoptosis que se evaluaron fueron diferentes.

A diferencia de las técnicas utilizadas comúnmente para la evaluación de apoptosis por tinciones (Hoechst 33342, yoduro de propidio, anexina V), nuestra técnica

Tabla. 1. Porcentaje de células Vero infectadas con el virus de la fiebre amarilla (17 D) con cromatina condensada en relación con tiempo y multiplicidad de infección (MOI)

Tiempo (horas)	Infectadas / MOI		Control	
	0.1	1	Positivo	Negativo
24	0,72 \pm 0,12	0,66 \pm 0,37	43,7 \pm 6,51	0,46 \pm 0,05
48	3,86 \pm 0,85	5,06 \pm 0,75	91,6 \pm 8,06	1,93 \pm 0,25
72	91,53 \pm 4,81	93,2 \pm 1,17	NC	2,66 \pm 0,51

Promedios de dos experimentos independientes por triplicado.
 $P < 0.01$ (*student*) comparado con los otros en el mismo tiempo.
 NC: No cuantificado, 100 % de muerte celular

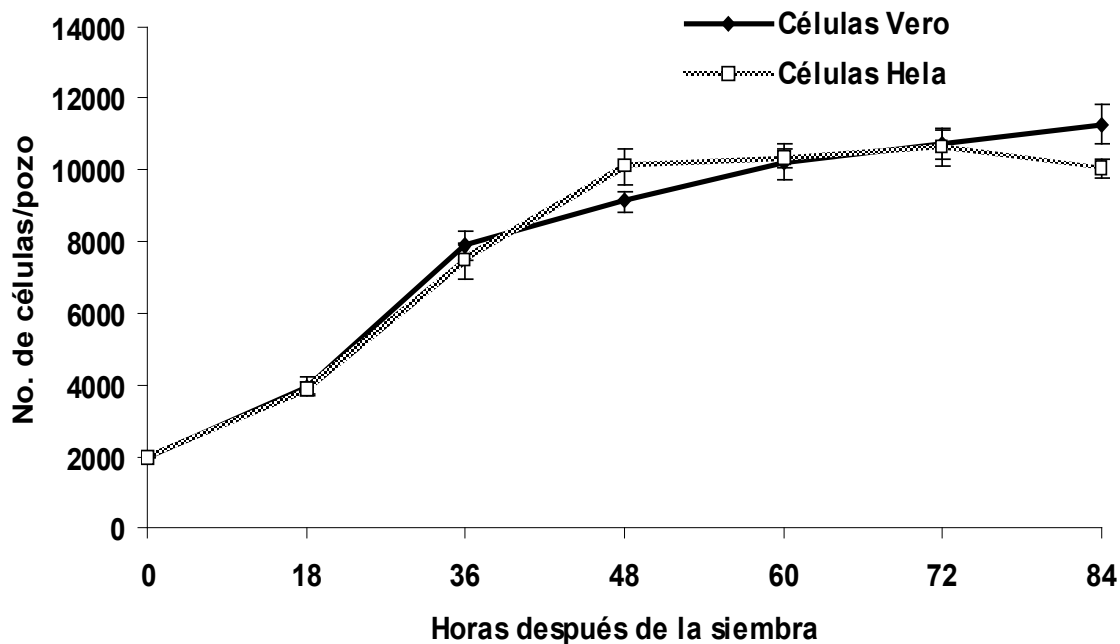


Figura 1. Crecimiento de células Vero y HeLa en láminas de vidrio de 12 pozos usadas en la técnica de Inmunofluorescencia.

no requiere el desprendimiento de las células del soporte de cultivo para su evaluación posterior. Esto minimiza la manipulación de las células, y permite la evaluación de sus caracteres morfológicos (condensación del citoplasma, pérdida de adherencia, pérdida de uniones con otras células, formación de sincitios); además, hace posible la evaluación de otros marcadores como la condensación de la cromatina, evitando la realización de ensayos independientes para medir estas variables. Adicionalmente, con esta técnica podrían evaluarse otros marcadores, como la expresión de fosfatidilserina, marcados con conjugados diferentes para su visualización en la misma célula.

El crecimiento de células Vero o HeLa en láminas de vidrio fue evidente como se muestra en la figura 1. Las células mostraron un comportamiento similar en el soporte utilizado al que se observa en cajas de cultivo estándar, en términos de adaptación, crecimiento y viabilidad celular; además, los volúmenes manejados en nuestro modelo son bajos (un volumen máximo de 50µl por pozo) lo que repercute en una mínima utilización de reactivos para obtener los mismos resultados.

La integridad de la monocapa de células Vero fue alterada como consecuencia de la infección con el virus luego de 48 h de infección (dato no mostrado). La alteración o efecto citopático fue igual al que se observa en monocapas crecidas en cajas de poliestireno en los experimentos que se

desarrollan de rutina en nuestro laboratorio. La diferencia es que en el último caso, el efecto citopático se hace más evidente 72 h después de la infección con el virus. Estos resultados sugieren que las monocapas en láminas de vidrio podrían ser útiles para confirmar, en menos tiempo, la presencia del virus en una preparación.

La detección de apoptosis en monocapas crecidas directamente en láminas de vidrio presentó varias ventajas en relación con el procedimiento que requiere subcultivo en frascos. Entre estas, a) rapidez: el resultado final se pudo obtener en un solo paso comparado con el cultivo en masa que requiere el desprendimiento de las células, lavados, y montaje posteriores para la observación. b) costos: se utiliza una menor cantidad de células, medio de cultivo y marcador para evidenciar la apoptosis. c) evaluación de diferentes marcadores en un mismo experimento determinado por el número de pozos en la lámina. d) mínima manipulación de las células, que permite observar cambios morfológicos y evita daño en las estructuras.

El modelo aquí propuesto permite la observación rápida y económica de diferentes parámetros de apoptosis y de caracteres morfológicos derivados del proceso de infección viral en una misma célula; igualmente, puede ser una valiosa herramienta en procesos donde sea necesario evaluar el efecto citopático producido no solo por microorganismos, sino también por compuestos químicos o efectos físicos.

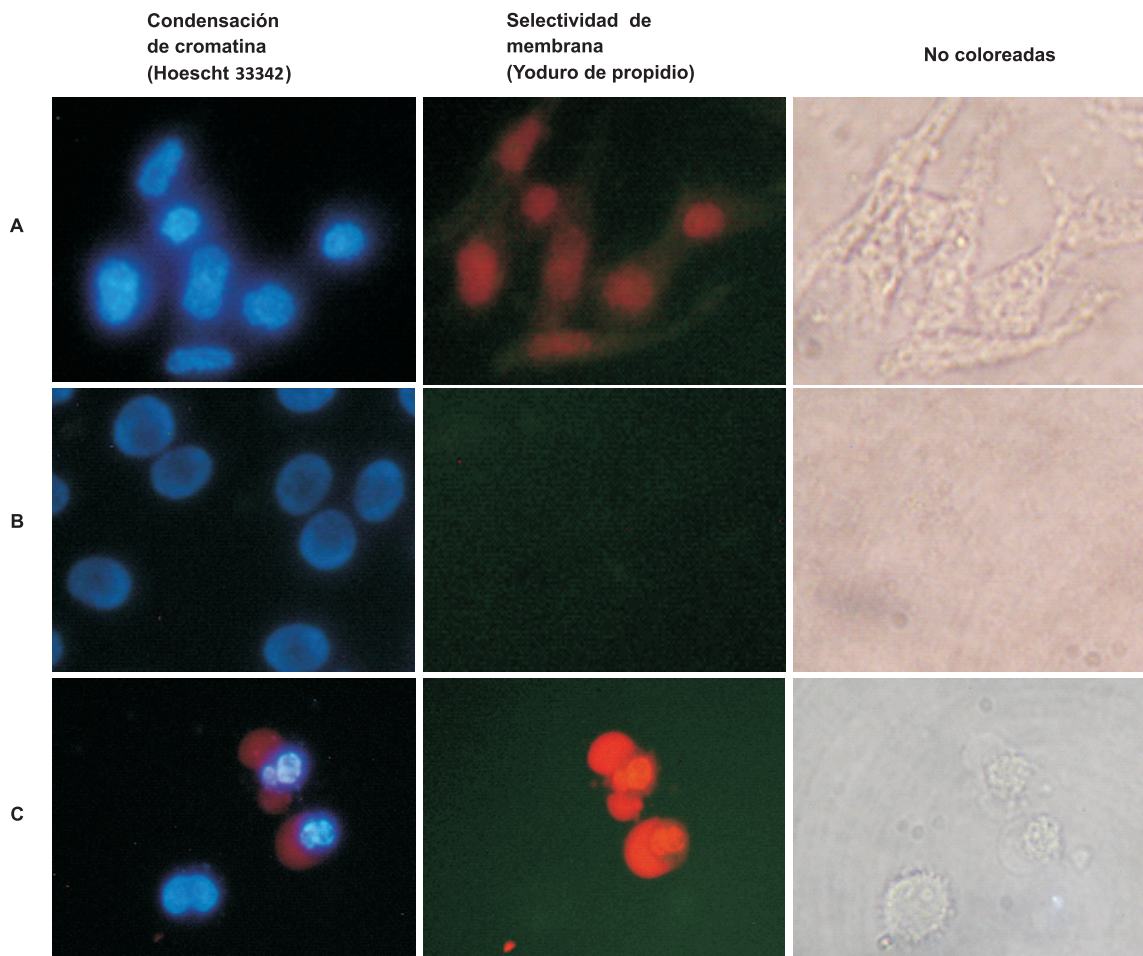


Figura 2. Indicadores de apoptosis en células Vero infectadas con el virus de la fiebre amarilla (17 D) crecidas en laminas de vidrio para inmunofluorescencia. El registro corresponde a las 72 h post infección. A: células Vero infectadas. B: células Vero no infectadas (control negativo). C: células Hela tratadas con etoposide (control positivo).

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Raquel E. Ocazonez, directora del laboratorio de Arbovirus CINTROP/UIS, por la orientación recibida.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores manifiestan que no tienen conflictos de interés en el trabajo realizado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG. Viruses and apoptosis. *Br Med Bull* 1997;53:509-21.
2. Barry M, McFadden G. Apoptosis regulators from DNA viruses. *Curr Opin Immunol* 1998;10:422-30.
3. Hay S, Kannourakis G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* 2002;83:1547-64.
4. Fischer R, Baumert T, Blum HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2007;13:4865-72.
5. Afonso PV, Zamborlini A, Saib A, Mahieux R. Centrosome and retroviruses: the dangerous liaisons. *Retrovirology* 2007;4:27.
6. White E. Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2006;13:1371-7.
7. Hilleman MR. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101 Suppl 2:14560-6.
8. Hasnain SE, Begum R, Ramaiah KV, et al. Host-pathogen interactions during apoptosis. *J Biosci* 2003;28:349-58.
9. Chang CC, Ou YC, Raung SL, Chen CJ. Antiviral effect of dehydroepiandrosterone on Japanese encephalitis virus infection. *J Gen Virol* 2005;86:2513-23.
10. Stevens M, Pannecouque C, De Clercq E, Balzarini J. Pyridine N-oxide derivatives inhibit viral transactivation by interfering with NF-kappaB binding. *Biochem Pharmacol* 2006;71:1122-35.

11. Muthumani K, Wadsworth SA, Dayes NS, et al. Suppression of HIV-1 viral replication and cellular pathogenesis by a novel p38/JNK kinase inhibitor. *AIDS* 2004;18:739-48.
12. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996;183:1797-806.
13. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepe S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007;139:143-56.
14. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1101-10.
15. Marianneau P, Flamand M, Deubel V, Despres P. Induction of programmed cell death (apoptosis) by dengue virus in vitro and in vivo. *Acta Cient Venez* 1998;49 Suppl 1:13-7.
16. Guchelaar HJ, Vermes A, Vermes I, Haanen C. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharm World Sci* 1997;19:119-25.
17. Lefeuvre A, Contamin H, Decelle T, et al. Host-cell interaction of attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of hepatocyte infection. *Microbes Infect* 2006;8:1530-8.
18. Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Kim A, Deubel V. Differing infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line. *J Infect Dis* 1998;178:1270-8.
19. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* 2000;74:7814-23.