

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PARTICIPACIÓN DEL TLR3 DURANTE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL DENGUE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
Q.F.B. SERGIO ISAAC DE LA CRUZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARTHA YOCUPICIO MONROY

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2008

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dra. Martha Yocupicio Monroy
Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Rosa Ma. Del Ángel
Profesora Titular. Departamento de Patología Experimental
CINVESTAV-IPN

Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez
Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Vianney Ortiz Navarrete
Profesora Titular. Departamento de Biomedicina
CINVESTAV-IPN

Dr. Mauricio Castañón Arreola
Profesora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente proyecto de investigación se realizó con el apoyo académico y económico que me otorgó la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, a la cual agradezco.

El trabajo se realizó en el laboratorio 1 del Posgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la dirección de la Dra. Martha Yocupicio Monroy así como en el laboratorio de la Dra. Rosa Ma. Del Ángel del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV-IPN.

Esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento por parte de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), y el Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACyT, proyecto 60282).

DEDICATORIAS

Ante todo a mi Dios, quien me ha dotado de lo necesario para ser mejor, que a través de su sabiduría y su enseñanza me muestra la manera de ser feliz haciendo felices a los demás. Se que cada día le seguiré pidiendo que ilumine nuestras vidas y nos llene de sabiduría.

A mi familia, a mi madre, quien a través de su ejemplo de vida y su actitud incansable me ha mostrado que es necesario trabajar para merecer. A mi esposa, quien con paciencia y comprensión me ha apoyado en nuestros proyectos de vida, que se que tengo mucho que ofrecerle y se que no hay que esperar a que venga el día de la felicidad, pues ese día es hoy. A mi hija, que gracias ati, aprendí a no cansarme y seguiré trabajando para darte lo mejor.

A mis amigos Don Pancho, Doña Mary, Aide y Conchita, pues gracias a ellos estoy aquí.

Al Dr. Esteban Barranco Florido, con quien he contado en los últimos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo académico y económico recibidos, que desde que llegué a la institución fue con la idea de encontrar una familia y se que hasta el momento no me he equivocado.

Agradezco a cada uno de los profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas, Mavil López, Martha Yocupicio, Elizabeth Álvarez, Leobardo Mendoza, José de Jesús Trejo, Minerva Camacho, Elisa Azuara, César López, Máximo Martínez, Rosa Del Carmen, Xochitl Madriz, Humberto Nicolini, Sara Frías, Lorena Orozco, Mónica Sanardi y a la Dra Esther Orozco;; así como al personal técnico administrativo (Caty, Lulú, Lalo.)

Agradezco a cada uno de mis compañeros de generación Itzel, pues indirectamente por ella conocí el posgrado al igual que a una gran amiga; Olga y Jonatan, con quienes hice un agradable ambiente de trabajo y que me inspiraron a ser mejor, pues son de lo mejor; Jorge que me enseñó a que si se puede trabajar sin descansar, Omarcín que me sirvió de costal, Alfredo, Areli y Jackelin que con su personalidad respectiva le dieron color a la generación.

Agradezco a mi tutor, la Dra. Martha Yocupicio Monroy por permitirme trabajar en este maravilloso proyecto de investigación; a la Dra. Rosa Ma. Del Ángel, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar con toda libertad; al Dr. Vianney por sus sabios consejos; Elizabeth por su tiempo dedicado y Mauricio por sus propuestas tan oportunas.

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por las facilidades otorgadas para la elaboración de este trabajo de investigación.

Agradezco a cada uno de mis compañeros del laboratorio de la Dra. Rosa Ma. Del Ángel. Así mismo agradezco al auxiliar de este laboratorio al sr. Fernando Medina y Jaime el técnico del laboratorio quienes siempre estuvieron listos para ayudarme, al Dr. Juan Luder y a cada uno de mis compañeros, Clemente quien siempre creyó en mi, Raúl, Chava, Ivonne, Henry y Josef.

Agradezco a los miembros de aquellos laboratorios que en ningún momento me negaron su ayuda, empezando por sus jefes. Del laboratorio de la Dra. Lorena, del laboratorio del Dr. Vianney, del laboratorio Dra. Esther Orozco, del laboratorio de la Dra. Roxana, del laboratorio de la Dra. Mineko y del laboratorio de la Dra. Carmen Sánchez.

ÍNDICE

Lista de Figuras	i
Lista de Tablas	iii
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
1. Antecedentes Generales Del Tema	1
2. Estado Del Arte	16
3. Antecedentes Particulares Del Proyecto	42
4. Importancia del Estudio	44
OBJETIVOS	45
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	46
METODOLOGÍA	48
1. Obtención de Células Dendríticas a partir de Monocitos de Sangre Periférica	48
2. Síntesis de siRNA no Relacionado conjugado a FITC	49
3. Ensayos de Transfección y Silenciamiento por siRNA	51
4. Ensayo de Citometría de Flujo	52
5. Ensayo de Infección con el Virus del Dengue	53
6. Ensayo de Plaqueo del Virus del Dengue	53
7. Ensayo de Inmunofluorescencia	54
RESULTADOS	55
1. Obtención Monocitos de Sangre Periférica	55
2. Diferenciación de Monocitos a CD1s	56
3. Transfección de siRNA-FITC en Células Vero	59
4. Transfección de siRNA en CD1s	61
5. Análisis de la expresión del TLR3 en condiciones basales	65
6. Silenciamiento del TLR3 en CD1s	67
7. Análisis por Plaqueo de la Eficiencia de la Infección por Dengue en CD1s Tratadas con siRNA para el TLR3	68
8. Análisis de la Expresión de Marcadores de Maduración en las CD1s Tratadas con siRNA	71

9. Análisis por Citometría de Flujo de la Eficiencia de la Infección por Dengue en CDIs Tratadas con siRNA para el TLR3	73
10. Análisis de la Localización Celular del IRF3 en CDIs Tratadas con siRNA e Infectadas con el Virus del Dengue	74
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	88
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	89

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ciclo infeccioso del virus del dengue	3
Figura 2. Distribución de <i>Aedes aegypti</i> y áreas de transmisión de dengue hasta el año 2002	4
Figura 3. Proteínas estructurales de la partícula del virus del dengue	6
Figura 4. Modelo propuesto que muestra los arreglos de las membranas celulares tras la infección por dengue	8
Figura 5. Ciclo Replicativo del virus del dengue	8
Figura 6. Estructura del genoma del virus del dengue	10
Figura 7. Organización del genoma del virus del dengue	12
Figura 8. Inmunopatogénesis en la infección por el virus del dengue	20
Figura 9. Daño en tres sistemas del organismo tras la infección por el virus del dengue	25
Figura 10. Respuesta antiviral del sistema inmune innato	28
Figura 11. Reconocimiento del dsRNA por PRRs	30
Figura 12. Los diferentes tipos de TLRs en humanos y sus ligandos	31
Figura 13. Los dominios de los TLRs y sus proteínas adaptadoras	32
Figura 14. Vías de señalización dependientes e independientes de MyD88	35
Figura 15. Mecanismo de silenciamiento por lRNA	40
Figura 16. Estrategia experimental para determinar la participación del TLR3 en la infección de las células dendríticas por el virus del dengue	47
Figura 17. Obtención de CDIs humanas	49
Figura 18. Representación esquemática de la síntesis de siRNA no relacionado conjugado a FITC	50
Figura 19. Silenciamiento del TLR3 en células dendríticas	51
Figura 20. Citometría de flujo para el análisis de la expresión de proteínas en CDIs	52
Figura 21. Efecto del silenciamiento del TLR3 en las células dendríticas tras la Infección con el Virus del Dengue	53

Figura 22. Ensayo de inmunofluorescencia para el análisis de la localización celular del IRF3	54
Figura 23. Citometría de flujo para el análisis de la expresión del marcador de superficie CD14 en monocitos de sangre periférica	55
Figura 24. Microscopia de luz para analizar la morfología en CDIs	57
Figura 25. Citometría de flujo para el análisis de la expresión de marcadores de superficie en CDIs	58
Figura 26. Citometría de flujo para el análisis de la expresión de marcadores de superficie en macrófagos	59
Figura 27. Estandarización de la transfección de siRNA-FITC en células Vero	61
Figura 28. Estandarización de la transfección de siRNA-FITC en células Dendríticas	63
Figura 29. Incremento en la Eficiencia de transfección del siRNA en células dendríticas	64
Figura 30. Análisis de la expresión del TLR3 por citometría de flujo	65
Figura 31. Análisis de la expresión del TLR3 por microscopia confocal	66
Figura 32. Expresión del TLR3 en CDIs silenciadas	68
Figura 33. Cinética de infección en CDIs y macrófagos	70
Figura 34. Ausencia de unidades formadoras de placas en CDIs tratadas para transfección	70
Figura 35. Análisis de la expresión de marcadores de maduración en las células dendríticas tratadas con siRNA	72
Figura 36. Eficiencia de infección en células dendríticas tratadas con siRNA para el TLR3	74
Figura 37. Análisis de la Intensidad de Fluorescencia Emitida por la Presencia del IRF3 en el Núcleo y en el Citoplasma en CDIs Transfectadas e Infectadas con el Virus del Dengue	75
Figura 38. Análisis de la Localización Celular del IRF3 en las CDIs Transfectadas e Infectadas con el Virus del Dengue	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Casos de dengue clásico y hemorrágico en México	5
Tabla 2. Casos de dengue por entidad federativa, 2007	5

RESUMEN

En el humano, las células dendríticas son los principales blancos del virus del dengue y su infección por este virus es un paso crítico en el establecimiento viral en el organismo. Las células dendríticas juegan un papel relevante tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, siendo los Toll-like receptors (TLRs) moléculas claves en la defensa anti-viral innata por desencadenar una cascada de señalización que implica la participación de los interferones (IFNs) de tipo I. El receptor TLR-3 se ha postulado que tiene un papel importante en la respuesta inmune en la infección por flavivirus. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar la participación del TLR-3 de células dendríticas en la infección por dengue. El cultivo de células dendríticas inmaduras se estandarizó a partir de monocitos de sangre periférica de donadores sanos. Las células mononucleares se purificaron utilizando perlas magnéticas acopladas a anti-CD14 y posteriormente se usó el factor estimulador de colonias monocíticas y granulocíticas (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4) para la diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras. La población de células se evaluó por microscopia de luz y por citometría de flujo. Las células dendríticas obtenidas se utilizaron para inhibir la expresión del TLR-3 mediante siRNA. Para el silenciamiento se probaron distintas condiciones de entre las que se eligió la que nos proveía una mayor eficiencia. Las células silenciadas en TLR3 se infectaron con el virus del dengue para determinar el efecto que ejerce el silenciamiento parcial de esta proteína en la replicación viral. Así, mediante citometría de flujo para la detección de la proteína E del virus se determinó que en las células silenciadas para TLR3 la eficiencia de infección es similar a los controles, sugiriendo que el TLR3 no tiene un papel en la replicación del virus del dengue en las células dendríticas inmaduras humanas. Finalmente, para caracterizar parcialmente la respuesta inmune antiviral se determinó la localización intracelular y el nivel de expresión del IRF3 (Interferon responsive factor) en las células tratadas no infectadas e infectadas, resultando que no existen diferencias en la localización del IRF3, sin embargo se detectó inhibición en la expresión de dicha proteína en las células infectadas con respecto a las no infectadas. Esto último, sugiere el virus propicia la inhibición de la vía de señalización antiviral en la que interviene el IRF3.

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes Generales

1. 1. Características Clínicas de la Infección por el Virus del Dengue

El virus del dengue, causa el síndrome clínico conocido como fiebre del dengue, el cual se caracteriza por fiebre, dolor de cabeza, dolor de músculos y articulaciones, erupciones cutáneas, linfadenopatía (aumento en el tamaño de los folículos linfáticos), leucopenia (disminución del número de leucocitos) y trombocitopenia (reducción del número de plaquetas).

La infección por dengue puede generar también cuadros clínicos mas graves como dengue hemorrágico ó fiebre hemorrágica por dengue; la cual se caracteriza por un incremento de la permeabilidad vascular y anomalías en la hemostasia. Esta entidad clínica puede desencadenar al síndrome de choque por dengue, que es una forma de choque hipovolémico causado por la pérdida de plasma y se asocia clínicamente con hemoconcentración, donde hay un aumento en la concentración de la sangre por disminución de plasma; lo cual podría conducir a la muerte del paciente (Lei y cols., 2001).

En algunos casos se ha reportado que el virus del dengue puede infectar el cerebro causando encefalopatía y encefalitis (Jan y cols., 2000). Las hipótesis que se han formulado para explicar los casos graves de la enfermedad, contemplan factores virales, como son el genotipo, el nivel de carga viral o la concentración de proteínas virales en el torrente sanguíneo; factores del mosquito vector y del humano. Existen diversas evidencias que apuntan a que los diferentes virus del dengue pueden diferir en su eficiencia de infección y replicación. Se han determinado otros factores de riesgo que se relacionan con la severidad como la edad, el fondo genético del hospedero y la activación de los linfocitos T debida a la infección de un gran número de monocitos, lo cual eleva el título de citocinas secretadas al torrente sanguíneo; no obstante, el mayor factor de riesgo es una segunda infección por un serotipo heterólogo, es decir de una especie diferente (Shu y cols., 2000; Suharti y cols., 2002; Bente y cols., 2005; Clyde y cols., 2006).

Así, durante una segunda infección con un serotipo diferente al de la primera, se puede dar un incremento en la entrada viral y en la producción de citocinas que

trae como consecuencia las formas más severas de la enfermedad, el dengue hemorrágico y síndrome de choque por dengue (Chen y Wang, 2002; Lei y cols., 2001).

A pesar de los múltiples avances en el estudio del dengue, hasta el momento no existe una vacuna o tratamiento antiviral eficaz (Bente y cols., 2005).

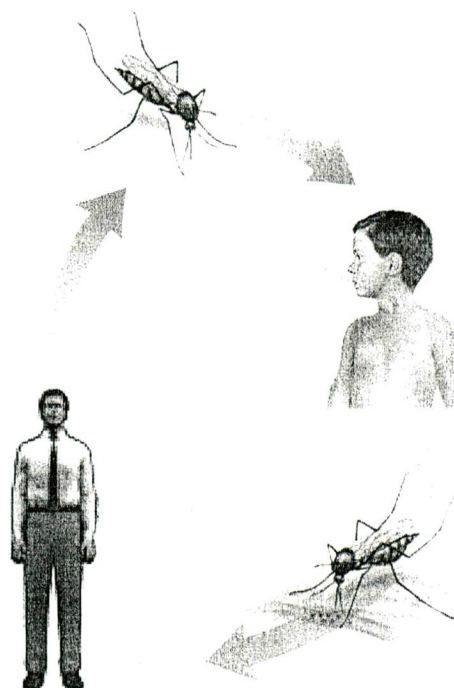
1. 2. Epidemiología

El virus del dengue, clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* y del género *Flavivirus*, es transmitido al humano por la picadura del mosquito del género *Aedes* como: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Aedes Polynesiensis* (figura 1). De entre los virus transmitidos por artrópodos que afectan a humanos, el virus del dengue es el más prevalente, causando más de 50 millones de nuevos casos por año (Muñoz-Jordán y cols., 2003).

El vector del virus del dengue, el mosquito *Aedes aegypti*, vive y se reproduce en las poblaciones humanas, es muy susceptible a ser infectado por el virus, se alimenta preferentemente de la sangre humana, su piquete es prácticamente imperceptible y debido a que interrumpe su alimentación por el movimiento más ligero del individuo al que pica, favorece que continúe alimentándose de la sangre de otros individuos y les transmita el virus (Gibbons y Vaughn, 2002). Así cuando un mosquito pica al humano, le transmite el virus del dengue, el cual se replica en diferentes células del organismo, luego llega al torrente sanguíneo de donde es tomado por otro mosquito que a su vez se infecta, repitiéndose así el ciclo de infección.

El incremento en las interacciones entre mosquitos y humanos, ha incrementado la dispersión del virus entre ambos hospederos y ha contribuido al incremento en la incidencia del dengue hemorrágico (Rothman, 2004).

Figura 1. Ciclo infeccioso del virus del dengue. Cuando el mosquito infectado con el virus del dengue pica al humano, le transmite el virus, que replicará en diferentes células del organismo, para llegar al torrente sanguíneo donde será tomado por otro mosquito que a su vez se infectará, repitiéndose así el ciclo de infección.



Los cuatro serotipos del virus del dengue, pueden desarrollar memoria inmunológica en el huésped humano, pero solo serotipo específica. Hasta donde se sabe, solo en humanos se desarrolla la enfermedad como la conocemos. El mosquito, una vez infectado, es un eficiente vector del virus para toda su vida (Gibbons y Vaughn, 2002). La persistencia y magnitud del dengue hemorrágico lo ubican como una amenaza a nivel mundial. En el sureste de Asia y en la región oeste del Pacífico, donde el dengue hemorrágico fue primeramente reconocido como una entidad clínica, ha sido un problema de salud por casi 50 años. No obstante en los últimos años, el número de casos de dengue hemorrágico, el número de países afectados y la distribución geográfica de la enfermedad se han incrementado constantemente.

El dengue hemorrágico es un nuevo problema en el hemisferio oeste tropical. Así tanto las regiones tropicales como las subtropicales, son las áreas de más alto riesgo para el contacto con el virus del dengue, por su endemicidad en más de 100 ciudades en África, América, el Mediterráneo y Sureste de Asia. Aunque en esencia, el dengue había estado ausente de Latino-América y el Caribe hasta antes de 1981, durante la pasada década se ha convertido en un importante

problema de salud (Rothman, 2004). A nivel mundial, más de una quinta parte de la población vive en áreas de riesgo para dengue hemorrágico, en las cuales se han reportado de 50 a 100 millones de enfermos por dengue cada año, incluyendo de entre 250 a 500 mil casos de dengue hemorrágico con 24 mil muertes por año (Gibbons y Vaughn, 2002).

Las actividades humanas, las malas condiciones sanitarias, el manejo inadecuado de la basura, el mal suministro de agua potable y su mal almacenamiento, han potenciado el entrecruzamiento de las diferentes especies de mosquitos, incrementado la dispersión de los virus y con ello la enfermedad (Rothman, 2004). En muchas áreas, las epidemias por dengue ocurren en estaciones de calor, humedad y lluvia, las cuales favorecen una mayor reproducción del mosquito y tiempos de incubación más cortos (Gibbons y Vaughn, 2002). En los últimos 60 años la incidencia, distribución y severidad clínica del dengue se ha incrementado dramáticamente, ya que las poblaciones en crecimiento en los trópicos proveen muchos hospederos susceptibles. Los viajeros en las líneas aéreas han sido importantes vectores del virus hacia partes del mundo en donde el virus estaba ausente, lo cual ha contribuido al cambio de áreas no endémicas a hipoendémicas, donde solo existe un serotipo del virus ó hiperendémicas, donde existen varios serotipos (Gibbons y Vaughn, 2002) (figura 2).

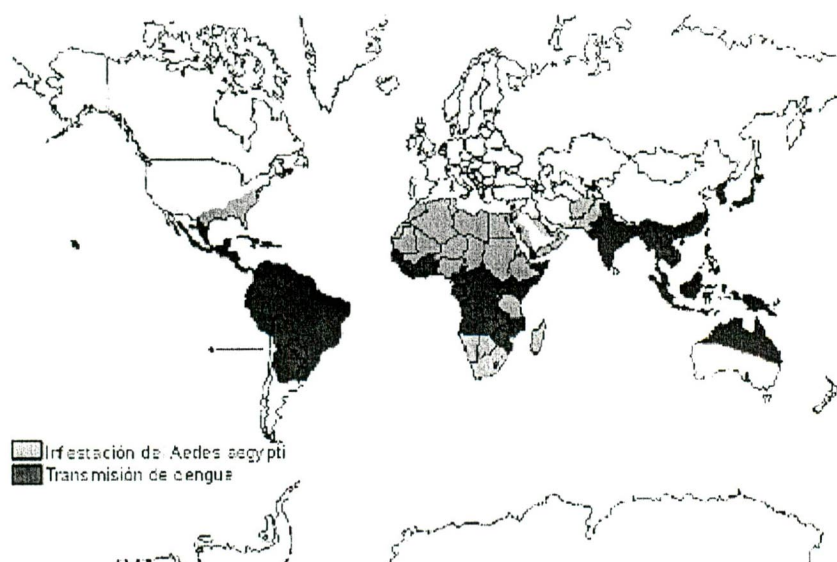


Figura 2. Distribución de *Aedes aegypti* y áreas de transmisión de dengue hasta el año 2002. La distribución del mosquito *Aedes aegypti* en su mayor parte se encuentra en el continente Africano, mientras que la transmisión del virus del dengue es en el sur de América, África y Asia y el norte de Australia. Fuente: Secretaría de Salud en México.

En México, según datos de la Secretaría de Salud, el panorama epidemiológico durante el 2007, fue de 40559 casos de dengue clásico (fiebre del dengue) y 7897 casos de dengue hemorrágico (tabla 1).

Tabla 1. CASOS DE DENGUE CLÁSICO Y HEMORRÁGICO					
2005		2006		2007	
DC	DH	DC	DH	DC	DH
5227	1182	22566	4426	40559	7897
DC: dengue clásico; DH: dengue hemorrágico.					

La presencia del dengue está relacionada a la existencia del vector así los estados de la República que tienen mayor riesgo para la enfermedad son las que se ubican en las costas del Golfo y del Pacífico (tabla 2).

Tabla 2. CASOS DE DENGUE POR ENTIDAD FEDERATIVA, 2007					
ESTADO	CONFIRMADOS		ESTADO	CONFIRMADOS	
	DC	DH		DC	DH
VERACRUZ	12137	1962	GUANAJUATO	638	2
OAXACA	4003	896	SINALOA	510	43
GUERRERO	3381	1148	PUEBLA	295	6
QUINTANA ROO	3473	806	DURANGO	289	9
NUEVO LEÓN	2343	821	CAMPECHE	217	2
CHIAPAS	2217	688	SAN LUIS POTOSÍ	75	4
MICHOACAN	2131	22	ZACATACAS	58	2
TAMAULIPAS	1333	456	HIDALGO	37	3
YUCATÁN	1374	377	B. CALIFORNIA SUR	33	5
TABASCO	1634	95	MÉXICO	19	0
MORELOS	1061	238	SONORA	12	1
NAYARIT	985	64	QUERÉTARO	5	0
JALISCO	869	84	CHIHUAHUA	1	0
COLIMA	733	162	RESTO	0	0
COAHUILA	696	1			
TOTAL DC: 40559, DH: 7897, DEFUNCIONES: 10					

1. 3. Biología Molecular del Virus del Dengue

1. 3. 1. Partícula Viral

El tamaño de los flavivirus es de aproximadamente 50 nm, las partículas virales son esféricas y envueltas por una bicapa lipídica. La superficie de las partículas virales contienen dos proteínas: la proteína E (envoltura) y la proteína M (membrana). La proteína E es el principal determinante antigénico del virus y media la unión y fusión durante la entrada viral. La proteína M, producida durante la maduración de los virus nacientes dentro de las vías secretorias, es el producto del procesamiento de la proteína precursora prM que se inserta en la membrana viral. La nucleocápside consiste de la proteína C (cápside) y el RNA genómico (Lindenbach y Rice, 2003) (figura 3).

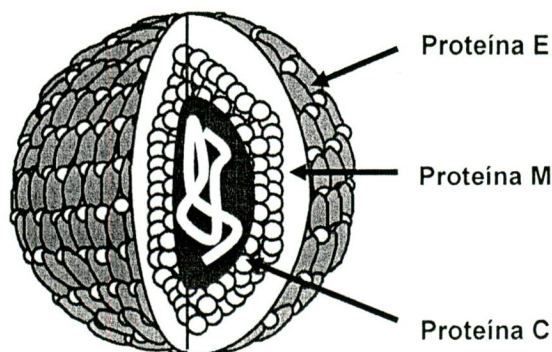


Figura 3. Proteínas estructurales de la partícula del virus del dengue. Se muestra la partícula madura del virus del dengue, en la que se señalan las proteínas estructurales que conforman al virus. Como se puede observar la proteína E es la que está expuesta en la superficie, mientras que la proteína M forma parte de la membrana; y finalmente la proteína C conforma la cápside del virus.

1. 3. 2. Ciclo de Replicación de los Flavivirus

El ciclo replicativo de los flavivirus comienza con la unión de las partículas virales a la célula huésped, a través de la glicoproteína E que se encuentra en la superficie del virus, ésta interacciona con los receptores celulares, de los cuales se han descrito varias moléculas en diferentes tipos celulares entre éstas, el heparan sulfato (Chen y cols., 1997); la molécula DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) (Tassaneeritthep y cols., 2003; Navarro-Sánchez y cols., 2003); la proteína GRP78 (glucose-regulated protein 78) (Jindadamrongwech y cols., 2004); las proteínas HSP90 y HSP70 (heat choque protein) (Reyes y cols., 2005); y la proteína Rab 5 (Krishnan y cols., 2007).

De manera paralela, en los humanos en donde existen anticuerpos heterotípicos anti-dengue persistentes, la opsonización del virus a través de las inmunoglobulinas y su interacción con los receptores para Fc en la superficie celular, facilitan la unión y la infección de las células monocíticas. En el caso del virus West Nile, éste entra a la célula mediante vesículas recubiertas de clatrina, a través de endocitosis mediada por receptor (Chu y Ng, 2004).

Una vez dentro, los viriones son transportados al citoplasma dentro de compartimentos endocíticos prelisosomales, donde el pH bajo induce la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma celular, para liberar la nucleocápside del virus, misma que se desnuda para permitir la liberación del genoma viral. El RNA viral se traduce, produciendo 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales entre las que se encuentran las que realizan la replicación del genoma viral y el ensamble de nuevas partículas vírales.

Poco tiempo después de iniciada la infección, las proteínas virales inducen el rearrreglo de las membranas intracelulares, formando distintas estructuras llamadas paquetes vesiculares, membranas intrincadas y arreglos paracrystalinos. Los paquetes vesiculares son los sitios de la replicación del RNA viral, en donde se realiza la síntesis de una cadena de RNA de polaridad negativa como intermediario, que a su vez, sirve como molde para la síntesis de cadenas de RNA positivas. Por otro lado, las membranas intrincadas y los arreglos paracrystalinos, son los sitios para el procesamiento de la poliproteína (Lindenbach y Rice, 2003; Uchil y Satchidanandam, 2003) (figura 4).

Las partículas virales se ensamblan dentro del retículo endoplásmico, para luego ser transportadas a través de las vías secretorias del huésped, en donde ocurre la maduración de los viriones y su liberación (Lindenbach y Rice, 2003) (figura 5).

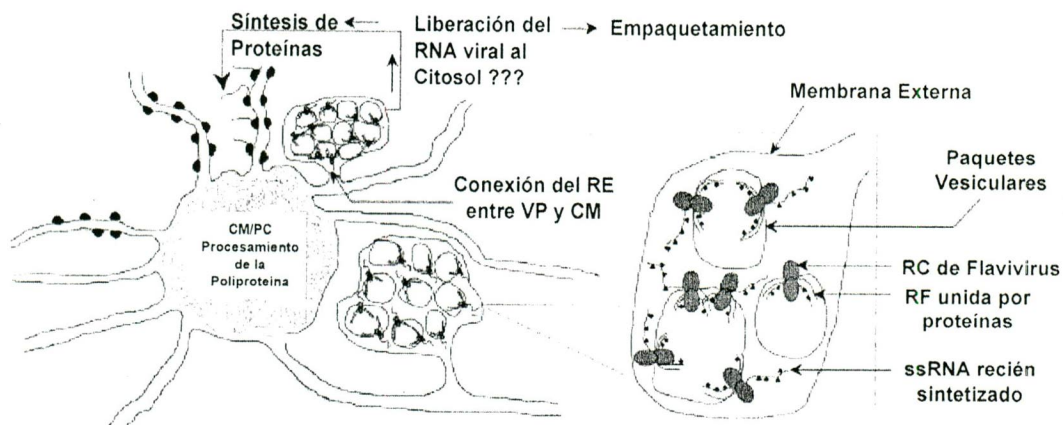


Figura 4. Modelo propuesto que muestra los arreglos de las membranas celulares tras la infección por dengue. El procesamiento de la poliproteína de los Flavivirus se lleva cabo en los arreglos paracristalinos y las membranas intrincadas (CM/PC), mientras que la replicación de su genoma se lleva a cabo en los paquetes vesiculares (VPs) por medio del complejo de replicación (RC). RE: retículo endoplásmico; RF: forma replicativa (Uchil y Satchidanandam, 2003).

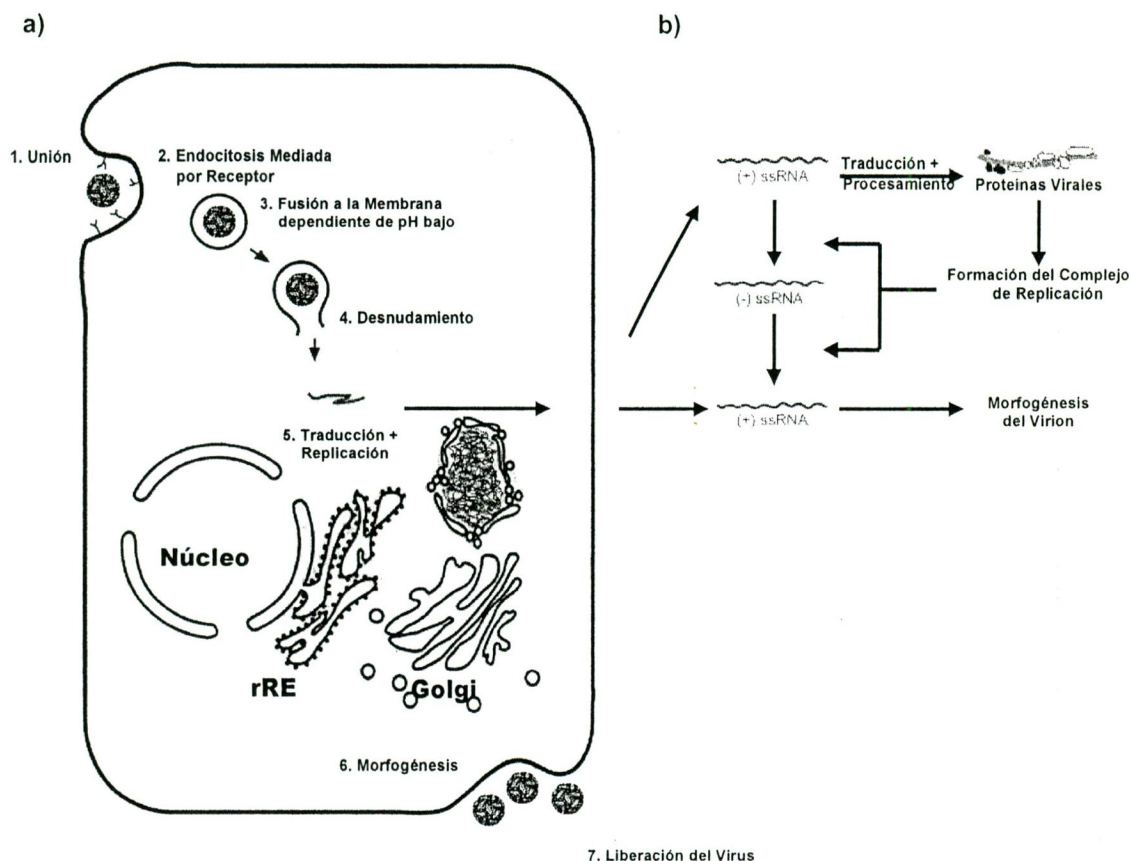


Figura 5. Ciclo Replicativo del virus del dengue. a) Etapas requeridas en el ciclo replicativo del virus del dengue. b) Representación del proceso de replicación y traducción del genoma viral, así como el procesamiento de la poliproteína, de la cual surgirán proteínas estructurales que formarán la partícula viral, así como proteínas no estructurales implicadas en los procesos de replicación, traducción y procesamiento.

1. 3. 3. Estructura del Genoma

Los genomas de los flavivirus consisten de una cadena sencilla de RNA (ssRNA) de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb, con una estructura de cap en el extremo 5' y sin poliadenilación en el extremo 3'. El genoma tiene un solo marco de lectura abierto flanqueado por regiones no traducibles en los extremos 5' y 3' de aproximadamente 100 y 400 a 700 nts, respectivamente (Lindenbach y Rice, 2003).

A) Región no Traducible 5'

La región no traducible 5' (UTR5', del inglés untranslated region 5') de los diferentes flavivirus es de aproximadamente 100 nt, contiene secuencias capaces de formar estructuras secundarias, las cuales parecen ser importantes en la traducción del genoma viral. Esta región contiene un elemento llamado SLA (stem-loop A) el cual sirve como un sitio de unión para la proteína NS5 en el inicio de la síntesis de RNA de polaridad negativa, permitiendo así, la amplificación del RNA viral (Filomatori y cols., 2006). La UTR5' es complementaria a la UTR3' del RNA de la cadena negativa, la cual sirve como sitio de inicio de la síntesis de la cadena positiva durante la replicación del RNA (Lindenbach y Rice, 2003).

B) Región no Traducible 3'

La UTR3' de los genomas de los flavivirus exhibe gran variabilidad en secuencia pero contienen estructuras secundarias conservadas (figura 6), por ejemplo, una estructura de tallo y burbuja denominada 3' SL de 90 a 120 nt que es esencial en la replicación de los flavivirus. Otra estructura, es una región conservada de 25 nucleótidos llamada secuencia complementaria o de ciclización 1 (CS1), la cual tiene la capacidad de aparearse con una secuencia localizada en los primeros nts de la proteína C. Este apareamiento produce la circularización del genoma, lo cual es de suma importancia durante su replicación (Lindenbach y Rice, 2003). Recientemente se ha descrito que la circularización requiere del apareamiento entre las secuencias 3' y 5' UAR (upstream AUG region) localizadas en las UTR 3' y 5' respectivamente, proponiéndose así que la

circularización del RNA es una conformación requerida para la replicación viral y por lo tanto para la viabilidad del virus del dengue (Alvarez y cols., 2005). Otras secuencias conservadas son la CS2 y RCS2 cuya función es modular la replicación viral (Lindenbach y Rice, 2003).

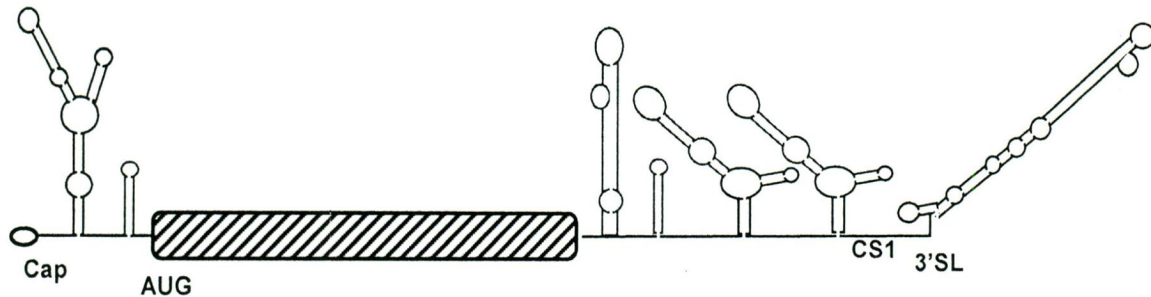


Figura 6. Estructura del genoma del virus del dengue. En las regiones no traducibles 5' y 3', existen estructuras secundarias que pueden influir en la traducción y replicación del genoma viral, como las secuencias de complementariedad (CS), y la estructura de tallo y burbuja 3' SL. El rectángulo con rayas diagonales representa el marco de lectura abierto.

1. 3. 4. Proteínas Virales

A) Traducción y Procesamiento de la Poliproteína

El genoma de los flavivirus funciona como un mRNA que puede ser traducido para dar origen a una poliproteína de aproximadamente 3400 aa, que es procesada por proteasas celulares y virales para dar lugar a 10 proteínas; 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales. En el extremo N-terminal, una cuarta parte de la poliproteína codifica para las proteínas estructurales (C, prM, E), y en el C-terminal, codifica para proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Una peptidasa señal del hospedero es responsable del corte entre C y prM, prM y E, E y NS1, además del corte cerca del C-terminal de NS4A. La serina proteasa codificada por el virus corta entre NS2A y NS2B, NS2B y NS3, NS3 y NS4A, NS4A y NS4B, además de NS4B y NS5 (Lindenbach y Rice, 2003) (figura 7).

B) Proteínas Estructurales

Proteína de la cápside

La proteína C es una molécula altamente básica de aproximadamente 11 kDa. Los residuos cargados que median la interacción con el RNA, están presentes en el N y C terminal separados por un corto dominio interno hidrofóbico que media la asociación con la membrana. La proteína C naciente también contiene un ancla hidrofóbica en el C- terminal, que sirve como un péptido señal para la translocación de prM en el retículo endoplásmico (Lindenbach y Rice, 2003).

Proteína de Membrana

prM es la proteína precursora de la proteína M de aproximadamente 26 kDa que se transloca al retículo endoplásmico por el dominio hidrofóbico C-terminal de la proteína C. prM tiene una actividad semejante a una chaperona, debido a que es necesaria para el plegamiento de la proteína E; donde el segmento pr de prM existente en la proteína precursora prM estabiliza a la proteína E. La conversión de partícula virales inmaduras a viriones maduros ocurre en las vías secretorias y coincide con el corte de prM por una furina residente en el aparato de Golgi para dar lugar a la proteína M y el segmento pr, el cual es secretado (Lindenbach y Rice, 2003). De esta manera se cree que durante el proceso de maduración y secreción de las partículas virales, prM protege a la proteína E de un cambio conformacional inducido por el pH que da lugar a la exposición del dominio de unión al receptor de la proteína E y que puede provocar una fusión prematura a la membrana (Clyde y cols., 2006).

Proteína de Envoltura

La proteína E es de aproximadamente 53 kDa siendo la principal proteína de superficie del virión. Esta proteína media la unión y la fusión a la membrana celular y es sintetizada como una proteína de membrana tipo 1, conteniendo 12 cisteínas conservadas que forman enlaces disulfuro. Cada proteína E esta compuesta de tres dominios: I, forma una estructura de barril β ; II, se proyecta a lo largo de la superficie del virus y contiene el dominio de fusión a la membrana; y III, al cual se

le atribuye la función de unión al receptor celular (Lindenbach y Rice, 2003). La proteína E es el principal blanco de la inmunidad humoral (Clyde y cols., 2006).



Figura 7. Organización del genoma del virus del dengue. En el extremo 5', se encuentran los genes para las proteínas estructurales C, prM y E; mientras que del centro del genoma al extremo 3', se encuentran los genes para las proteínas no estructurales NS1, NS2A y NS2B, NS3, NS4A y NS4B, y NS5. NC: región no codificante (región no traducible).

C) Proteínas No Estructurales

NS1

NS1 es una proteína de aproximadamente 46 kDa que se encuentra en el interior de las células, en la superficie celular o puede ser secretada. Esta proteína es translocada al lumen del retículo endoplásmico y separada de la proteína E por la peptidasa señal del hospedero. NS1 es un glicoproteína que forma homodímeros que son altamente estables y en su mayor parte es hidrofílica. Durante la infección, ésta proteína induce una fuerte respuesta humoral y cuando se encuentra sobre la superficie celular, es reconocida por los anticuerpos para producir lisis de las células infectadas a través de la activación del complemento, jugando así un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. NS1 es importante para la replicación del RNA y colocaliza con los paquetes vesiculares que son los sitios de replicación del RNA (Lindenbach y Rice, 2003).

NS2A

NS2A es una proteína hidrofóbica de aproximadamente 22 kDa. El N-terminal de NS2A es generado por el corte entre NS1 y NS2A por una enzima desconocida residente del retículo endoplásmico; mientras el C-terminal es generado por el corte de la serina proteasa en el citoplasma. Existe una forma truncada en el C-terminal llamada NS2A- α , que puede surgir del corte de una serina proteasa.

NS2A esta probablemente involucrada en los procesos de ensamble del virión y empaquetamiento y replicación del RNA (Lindenbach y Rice, 2003). También se le atribuye un papel en la resistencia del virus del dengue a la acción antiviral del interferón (IFN) (Muñoz-Jordán y cols., 2003; Jones y cols., 2005).

NS2B

NS2B es una proteína asociada a membrana de aproximadamente 14 kDa. Esta proteína forma un complejo con NS3 y es un cofactor necesario para la actividad de serina proteasa en NS3. La actividad de cofactor de NS2B, se encuentra codificada en una región central hidrofílica conservada de 40 residuos, flanqueada por regiones hidrofóbicas que median su asociación a la membrana (Lindenbach y Rice, 2003).

NS3

NS3 es una proteína multifuncional de aproximadamente 70 kDa que contiene varias actividades enzimáticas involucradas en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación del RNA. Esta proteína está asociada con la membrana a través de su interacción con NS2B. La colocalización de NS3 y NS2B ha sugerido que las estructuras conocidas como membranas intrincadas junto con los arreglos paracrystalinos, son los sitios especializados para el procesamiento de la poliproteína. NS3 también se ha localizado en los paquetes vesiculares, sitios de replicación del RNA. El N-terminal de NS3 es una serina proteasa semejante a la tripsina cuya actividad mínima comprende los primeros 167 aminoácidos. En el procesamiento de la poliproteína corta entre NS2A y NS2B, NS2B y NS3, NS3 y NS4A, NS4A y NS4B, NS4B y NS5, además de liberar a la proteína C unida a prM y puede cortar en dominios internos de las proteínas NS2A y NS3.

La proteasa viral corta preferencialmente después de un residuo básico adyacente y antes de un aminoácido que contenga una pequeña cadena lateral no ramificada. La región C-terminal de NS3 ha sido implicada en la replicación del RNA y contiene regiones homólogas a las del super grupo 2 de RNA helicasas. Estas enzimas utilizan la energía liberada a partir de la hidrólisis del ATP para desenrollar el RNA dúplex, eliminando así las estructuras secundarias del RNA,

facilitando la actividad de la polimerasa. Además de la actividad de NTPasa, la región C-terminal de NS3 tiene actividad de RNA trifosfatasa (RTPasa), que desfosforila el extremo 5' del RNA genómico antes de la adición del cap (Lindenbach y Rice, 2003).

NS4A y NS4B

NS4A y NS4B son proteínas hidrofóbicas de 16 y 27 kDa respectivamente. A NS4A se le ha sugerido un papel en la replicación del RNA por su colocalización en los paquetes vesiculares, así como en las membranas intrincadas. El C-terminal de NS4A actúa como una secuencia señal para la translocación de NS4B en el lumen del retículo endoplásmico. NS4B es una proteína transmembranal que se localiza en sitios de replicación viral (Lindenbach y Rice, 2003).

Se ha sugerido, que estas proteínas están involucradas en la resistencia del virus del dengue a la acción antiviral del IFN, a través del bloqueo de la transducción de señales inducida por IFN que da lugar a la respuesta antiviral (Muñoz-Jordán y cols., 2003; Jones y cols., 2005).

NS5

NS5 también es una proteína multifuncional de 103 kDa involucrada en la replicación del RNA. Además, esta proteína contiene en su extremo N-terminal una actividad en el procesamiento del capping del RNA viral ya que esta región tiene homología con metiltransferasas dependientes de S-adenosil-metionina, apoyándose así, la idea de que esta proteína está involucrada en la adición del cap 5' en el RNA viral (Lindenbach y Rice, 2003). De esta manera, NS5 es una proteína con dos dominios, ya que la región C-terminal de NS5, tiene actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) (Koonin, 1993; Rice y cols., 1985). Además forma un complejo con NS3 y estimula la actividad de NTPasa de NS3 (Lindenbach y Rice, 2003).

1. 3. 5. Replicación del RNA

La replicación del RNA viral, se lleva a cabo en los paquetes vesiculares, los cuales albergan los complejos de replicación de los flavivirus formados por las

proteínas NS1, NS2A, NS3, NS4A y NS5 (Lindenbach y Rice, 2003; Westaway y cols., 2003; Uchil y Satchidanandam, 2003).

Debido a que la maquinaria de replicación no se empaqueta dentro de la partícula viral, el genoma los flavivirus primero debe experimentar la traducción para generar su RNA polimerasa (Clyde y cols., 2006; Filomatori y cols., 2006).

Una vez que se ha completado la traducción de la cadena de RNA de polaridad positiva, el complejo de replicación se ensambla en la UTR3' a través de la proteína NS2A, la cual se une a la región 3'SL, donde las proteínas NS3 y NS5 también se unen. El complejo, todavía unido a la cadena de RNA positiva, es transportado a la membrana del retículo endoplásmico donde a través de la proteína NS2A el complejo interacciona con el dímero formado por la proteína NS4A, la cual se encuentra atravesando la membrana del retículo endoplásmico y que a su vez interacciona con el dímero formado por la proteína NS1 que se encuentra unida a la membrana del lumen del retículo endoplásmico.

El complejo de replicación completo se une al RNA mediante el dominio RdRp de la proteína NS5; el RNA debe circularizarse a través de las regiones CS localizadas en los extremos 5' y 3' para que el complejo de replicación comience a transcribir la cadena positiva del RNA para generar la cadena negativa del RNA, la cual sirve como molde para la síntesis de la cadena positiva. La síntesis del RNA es asimétrica, debido a que se sintetizan entre 10 a 100 veces más cadenas positivas en relación a las cadenas negativas.

Otras especies de RNA viral generadas durante su replicación e identificadas en base a su solubilidad en 2 M LiCl y su resistencia a las ribonucleasas específicas para una sola cadena son: una doble cadena de RNA (dsRNA) conocida como forma replicativa (RF); y un RNA heterogéneo parcialmente resistente a las nucleasas, con regiones de una cadena y de doble cadena, llamado intermediario replicativo (RI). El RI contiene los RNAs recién sintetizados que han sido desplazados por las cadenas en alargamiento (RF y RI son insolubles en 2 M LiCl).

Una vez liberada la cadena positiva, es procesada para la adición del cap. NS3 a través de su actividad de RNA trifosfatasa, desfosforila el extremo 5' del RNA

genómico preparándolo para la adición del cap; mientras que NS5 a través de su actividad de metiltransferasa, cataliza la reacción de transferencia de la molécula de GMP (guanosina monofosfato), llevando así el capping del RNA viral (Lindenbach y Rice, 2003; Westaway y cols., 2003; Uchil y Satchidanandam, 2003).

2. Estado Del Arte

2. 1. Inmunopatogénesis

Los cuatro serotipos del virus del dengue durante una infección primaria, pueden generar fiebre del dengue y dengue hemorrágico. Sin embargo, en una segunda infección particularmente con el serotipo 2, la posibilidad de desarrollar dengue hemorrágico es mayor (Gibbons y Vaughn, 2002). En la fiebre del dengue, a pesar de que los síntomas pueden ser agudos, se autolimitan después de aproximadamente 7 días. Sin embargo, la fiebre hemorrágica por dengue al ser provocada por un incremento en la permeabilidad vascular, se acompaña por anomalías en la hemostasia que producen la fuga de plasma, tendencia al sangrado y daño hepático.

La fuga de plasma se desarrolla rápidamente en un período de horas antes o al final del periodo febril. La efusión pleural (acumulación de líquido en el espacio que queda entre el revestimiento del pulmón y el tejido pulmonar), la ascitis (exceso de líquido en el espacio que existe entre el revestimiento membranoso del abdomen y los órganos abdominales) y la hemoconcentración, son indicativos de la pérdida de volumen intravascular. Esto puede rápidamente progresar a choque si los pacientes no reciben una resucitación de fluidos intravascular.

Las manifestaciones hemorrágicas van desde un sangrado nasal, hasta un sangrado del tracto gastrointestinal. La trombocitopenia y la hemoconcentración, son las principales características del dengue hemorrágico y del síndrome de choque por dengue. El daño hepático, es común en la infección por el virus del dengue con una elevación de las transaminasas del suero (Lei y cols., 2001). La elevación de los niveles de ciertas citocinas tienen un papel importante en la patogénesis de la infección por dengue (Chen y Wang, 2002).

Se puede decir que tres sistemas del organismo como son el hematológico, vascular y hepático, están involucrados en los cambios patológicos del dengue hemorrágico y del síndrome de choque por dengue (Lei y cols., 2001).

2. 2. Respuesta del Sistema Inmune a la Infección por Dengue

La defensa del hospedero contra los microorganismos patógenos invasores se lleva a cabo por el sistema inmune y puede ser de dos tipos: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Ambos componentes de la inmunidad reconocen los microorganismos invasores como no propios, lo cual provoca su eliminación (Takeda y Akira, 2005). La inmunidad innata juega un papel primordial en la defensa del hospedero, ya que contribuye a la destrucción del patógeno, determinando la localización y extensión de la infección para dar lugar a la respuesta inmune adaptativa. La inmunidad innata o primera línea de defensa del hospedero, restringe la infección durante el período requerido para que la inmunidad adaptativa se desarrolle (Hallman y cols., 2001).

La inmunidad innata mediada por proteínas como las de la fase aguda, citocinas y complemento y por células como son las NK (natural killer), fagocitos y granulocitos, provee una rápida respuesta que inhibe la progresión de la infección. La inmunidad adaptativa, en contraste, conduce a la eliminación del virus y a la generación de memoria inmunológica a través de la generación de linfocitos T y B específicos (López y cols., 2006).

2. 2. 1. Células Dendríticas

Las células dendríticas son un sistema heterogéneo de leucocitos altamente especializado en la respuesta inmune dependiente de células T. Entre las características de las células dendríticas están su habilidad para capturar patógenos y antígenos de varios orígenes, procesar y presentar los antígenos peptídicos y migrar a través de los tejidos hasta alcanzar los órganos linfoides secundarios, donde se lleva a cabo la estimulación de los linfocitos T vírgenes

(Muzio y cols., 2000). Las células dendríticas juegan un papel importante como eslabón entre la inmunidad innata y la adaptativa (Osterlund y cols., 2005).

Localizadas en los tejidos en un estado inmaduro, las células dendríticas sirven como centinelas y se encargan de identificar patógenos invasores. Una vez que los han reconocido, expresan citocinas, quimiocinas y moléculas coestimuladoras que contribuyen a su maduración y con ello al inicio de la repuesta inmune adaptativa, donde la señalización a través de los TLRs (Toll-like receptors o receptores tipo Toll) contribuye al inicio de la respuesta inmune adaptativa antiviral

El papel fundamental de los TLRs en la eliminación de los virus se da por los efectos de la inmunidad innata a través de los IFNs de tipo I, los cuales son sintetizados por la mayoría de la células nucleadas. A su vez los IFNs pueden contribuir a la maduración de las células dendríticas después de la infección viral, ya que inducen la expresión de moléculas coestimuladoras y de los complejos principales de histocompatibilidad (MHC) (López y cols., 2006).

La actividad funcional de las células dendríticas, requiere la combinación de la actividad fagocítica y de la presencia de receptores para el complemento, quimiocinas y TLRs. El sinergismo entre todas estas moléculas permite a las células dendríticas fagocitar antígenos extraños, reconocer señales de peligro y migrar a los nódulos linfoides donde activan a los linfocitos T vírgenes. La maduración completa de las células dendríticas a células presentadoras de antígeno competentes, se lleva a cabo durante tal migración.

La quimiocinas y sus receptores así como la señalización a través de los TLRs juegan un papel importante en la maduración de las células dendríticas (López y cols., 2006; Douagi y cols., 2007). Los cambios en la expresión del receptor para quimiocina durante la maduración de las células dendríticas, promueven el tráfico de las células dendríticas del tejido periférico a los órganos linfoides secundarios (Fischer y cols., 2001).

Las dos poblaciones de células dendríticas que participan en el desarrollo de la respuesta inmune antiviral son las células dendríticas convencionales (cDCs) esto es las células dendríticas mieloides (mDCs), así como las células dendríticas plasmacitoides (pDCs). Las cDCs se encuentran en los tejidos periféricos y en los órganos linfoides secundarios, maduran en la presencia de virus y procesan eficientemente y presentan los antígenos en los nódulos linfoides para iniciar la respuesta inmune adaptativa. Las pDCs se encuentran principalmente en la sangre y en los órganos linfoides secundarios, tienen una pobre representación antigénica, sin embargo tienen un papel muy importante en la inmunidad antiviral, ya que producen altos niveles de IFNs de tipo I a través de la unión de los componentes virales a los TLRs; además interactúan con las cDCs circundantes para inducir la inmunidad innata antiviral (Matsumoto y cols., 2003; Osterlund y cols., 2005; Wang y cols., 2006).

También existen las células dendríticas derivadas de monocitos o células dendríticas inmaduras (CDIs). Estos tipos de células dendríticas existen en dos estados como inmaduras y maduras; como inmaduras fagocitan y procesan los antígenos extraños, mientras que como maduras son mejores presentadoras de antígeno, debido a la expresión de moléculas de superficie (Ho y cols., 2001; Cuellar y cols., 2004).

Así, debido a su presencia en las mucosas, piel y sangre, así como su habilidad de tomar antígenos en estos sitios y a su expresión de moléculas de superficie, las células dendríticas tienen una mayor susceptibilidad a la infección por el virus del dengue en comparación a los monocitos o macrófagos. Por esta razón se considera que la infección de las células dendríticas por el virus del dengue, es un paso crucial en el establecimiento de la infección (Navarro-Sánchez y cols., 2003; Tassaneetrithep y cols., 2003; Kwan y cols., 2005).

Se ha reportado que la infección de las células dendríticas por el virus del dengue deteriora su maduración, la expresión de moléculas coestimuladoras, moléculas MHC y otras moléculas de superficie. Así, el virus del dengue deteriora su presentación antigénica, induce apoptosis y la secreción de IL-10, cuyos efectos son: la disminución de la proliferación de linfocitos T y el deterioro de la

respuesta inmune inflamatoria, suprimiendo así la respuesta inmune (Palmer y cols., 2005).

Sin embargo, existe información controversial al respecto pues también se ha reportado una sobrerregulación de las moléculas de MHC clase I, posiblemente para evadir el ataque de las NK o para generar un número masivo de células T de baja afinidad (Shresta y cols., 2005).

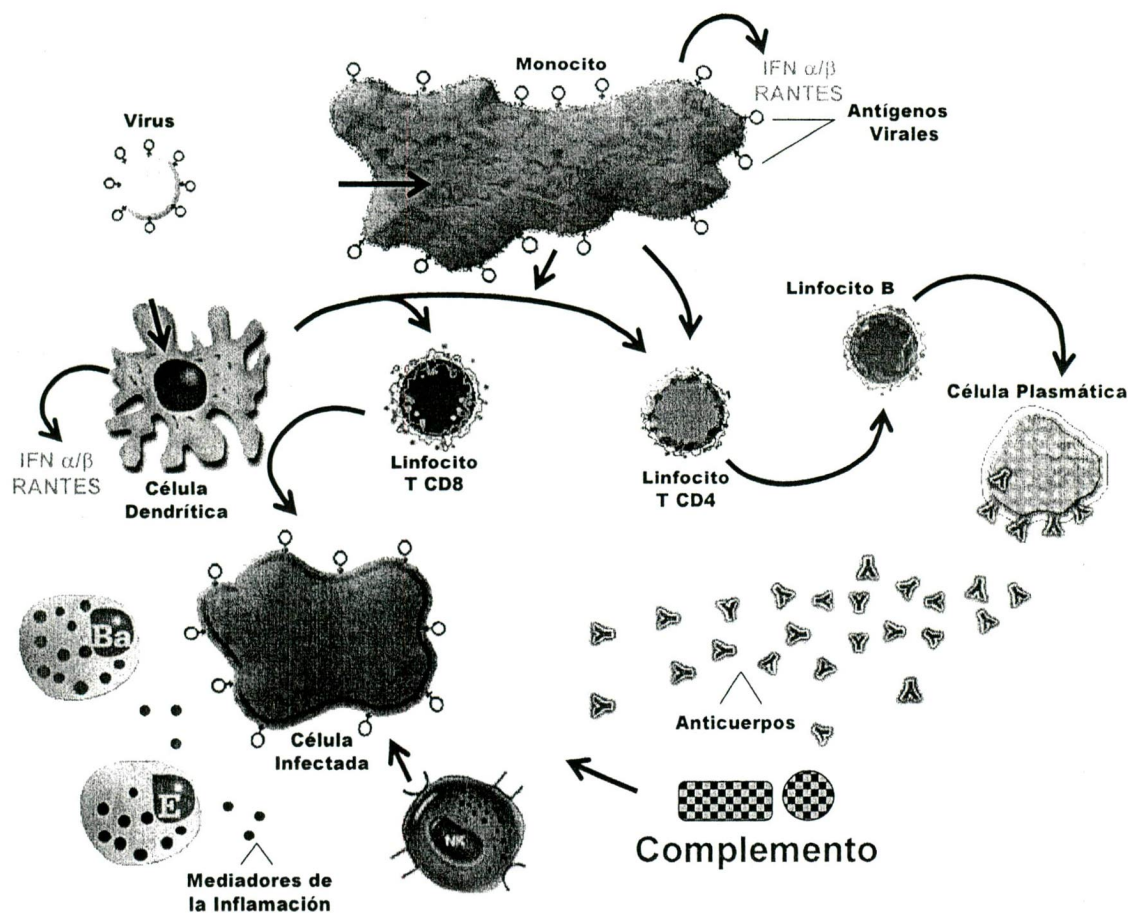


Figura 8. Inmunopatogénesis en la infección por el virus del dengue. Cuando el virus del dengue entra a las células del organismo por endocitosis, las células dendríticas y los monocitos presentan los antígenos virales a los linfocitos T CD8 y T CD4. Por un lado, los linfocitos T CD8 eliminan a las células infectadas por el virus, entre las que pueden encontrarse además de células endoteliales y hepáticas, células dendríticas y monocitos/macrófagos. Por otro lado, los linfocitos T CD4 secretan citocinas que contribuyen a la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas secretoras de anticuerpos dirigidos contra los antígenos virales, que pueden encontrarse en la superficie de las células infectadas. Esto último puede llevar a la disfunción del sistema hematológico, endotelio o hígado, ya que las células infectadas pueden ser lisadas a través de la activación del complemento o de la acción citotóxica de las células NK (natural killer). También las células dendríticas y monocitos/macrófagos secretan los IFNs α/β que se encargarán de restringir la replicación viral y también secretan quimiocinas como RANTES, que atraen a más células T, monocitos, células dendríticas, células NK y células granulares proinflamatorias como basófilos (Ba) y eosinófilos (E), que liberan su contenido granular favoreciendo la inflamación y la permeabilidad vascular.

Después de la transmisión del mosquito al humano, el virus del dengue encuentra en las células dendríticas, los monocitos y macrófagos, los principales blancos celulares para la infección y replicación viral (Bente y cols., 2005).

Las células dendríticas de la piel que han endocitado las partículas virales, viajan hacia los ganglios linfáticos donde presentan los antígenos virales a los linfocitos T CD8 y T CD4. Por un lado, los linfocitos T CD8 se encargan de la lisis de las células infectadas y por otro lado, los linfocitos T CD4 secretan citocinas, contribuyendo a la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas secretoras de anticuerpos que reconocerán los antígenos virales sobre la superficie de las células infectadas; estos eventos en conjunto, desencadenan la respuesta inmune adaptativa (Ho, 2001) (figura 8).

Sin embargo, tras la primera infección con un serotipo determinado, se generan células de memoria que responden a ese serotipo específico y tras la segunda infección con un serotipo diferente, estas células de memoria no son específicas para el nuevo serotipo; por lo tanto la respuesta celular y humoral carece de especificidad. Así, los anticuerpos secretados opsonizan al virus pero no tienen la capacidad de neutralizarlo, por lo que los receptores para Fc en la superficie celular interaccionan con los anticuerpos alrededor del virus, facilitando su entrada a la célula por fagocitosis, dándose así un potenciamiento de la infección dependiente de anticuerpo (ADE, antibody-dependent enhancement).

Propuesto en 1977 por Halstead y O'Rourke, el potenciamiento de la infección dependiente de anticuerpos, se debe a la presencia de anticuerpos no neutralizantes que son captados a través de su dominio FC, por células que cuentan con el receptor para FC como monocitos y macrófagos. Como resultado, se produce un incremento en: 1) el número de monocitos infectados con el virus, 2) la presentación antigénica, 3) el nivel de activación de las células T y 4) la proliferación de las células T de memoria. Los linfocitos T CD4 y T CD8 reactivos al virus del dengue, producen niveles altos de citocinas tales como IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α , TNF- β , Molécula-1 de Adhesión Intracelular (ICAM-1) y quimiocinas incluyendo RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted) y la proteína 1- β inflamatoria de macrófagos (MIP-1 β); también existe una

inversión en la relación de linfocitos T CD4/CD8, lo cual deteriora la eliminación del virus (Avirutnan y cols., 1998; Lei y cols., 2001; Lin y cols., 2003; Rothman, 2004) (figura 8).

2. 3. Relación Entre la Respuesta Inmune y la Patogénesis en la Infección por Dengue

Después de la infección, las células dendríticas migran de los tejidos periféricos a los nódulos linfoides donde activan a los linfocitos T CD4 y CD8; este paso de migración es crucial para la patogénesis viral. Por lo tanto, las células dendríticas podrían jugar un papel en la patogénesis de la infección por el virus del dengue a través de un incremento en la carga viral y en la activación celular (Ho y cols., 2001). Por otro lado, los monocitos, como precursores sanguíneos de los macrófagos en el tejido, pueden experimentar diferenciación y migrar a través de las paredes de los vasos sanguíneos a varios tejidos, donde maduran y se diferencian a macrófagos (Chen y Wang, 2002). El incremento en el número de monocitos infectados con el virus del dengue, permite que éste pueda diseminarse a diferentes sistemas, como el hematológico, vascular y hepático (Lei y cols., 2001) (figura 9).

Durante la infección por el virus del dengue, se ha reportado una fuerte inducción de RANTES, una quimiocina del sistema inmune innato también conocida como CCL5 (chemokine (C-C motif) ligand 5), que pertenece a la superfamilia de IL-8 y que es secretada por monocitos/macrófagos y células dendríticas (Chen y Wang, 2002; Lei y cols., 2001; Zhu y cols., 2000). Para su expresión, RANTES, requiere de los factores de transcripción NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) y el IRF3 (interferon regulatory factor 3) y depende de la presencia de un genoma viral funcional (Malmgaard y cols., 2004).

El IRF3 se une a los ISRE (Interferon-Stimulated Response Element) en el promotor de RANTES para llevar a cabo su inducción (Wagoner y cols., 2007). Las células dendríticas expresan tanto la quimiocina RANTES como su receptor y migran en respuesta a RANTES de los tejidos periféricos hacia el sitio de

inflamación o hacia los nódulos linfoides, donde presentan los antígenos capturados a los linfocitos T (Zhu y cols., 2000; Osterlund y cols, 2005).

RANTES atrae a otras células al sitio de infección como las células NK, células dendríticas, monocitos, linfocitos T efectoras, sobre las que induce la activación de sus moléculas de adhesión. También atrae células proinflamatorias como las células cebadas, basófilos, eosinófilos y neutrófilos que llegan al sitio de infección y secretan su contenido granular, induciendo un aumento de la permeabilidad capilar para facilitar la migración leucocitaria al sitio de infección por diapedesis, redundándose así el papel quimiotáctico de RANTES (Janeway, 2001).

2. 3. 1. Daño en el Sistema Vascular

Desafortunadamente, este incremento en la permeabilidad vascular es entre otras cosas, la causa de las hemorragias presentadas durante la infección por el virus del dengue. Una de las teorías que explican el incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos, es el incremento en la producción de metaloproteinasas por parte de las células dendríticas infectadas por el virus del dengue. La migración de las células dendríticas a través del endotelio ocurre normalmente durante el proceso inflamatorio, lo cual involucra cambios en la permeabilidad vascular regulada por la producción de metaloproteinasas lo que conduce a un deterioro en la integridad del endotelio (Luplerdlop y cols., 2006).

Otra explicación al deterioro del endotelio que lleva a la fuga de plasma después de la infección por el virus del dengue es la apoptosis de las células del endotelio vascular. La activación de las caspasas y la apoptosis parecen ser características de la infección celular por flavivirus (Samuel y cols., 2007). Sin embargo, la corta duración de la fuga de plasma, la carencia de un daño estructural y la recuperación rápida de los pacientes con DSS parecen indicar que la alterada permeabilidad se debe a un mediador soluble (Avirutnan y cols., 1998; Lin y cols., 2003).

En la patogénesis del endotelio también están involucrados además de la apoptosis, factores como la activación del complemento y la producción de citocinas y quimiocinas inducidas por el virus. Además el virus del dengue provoca la generación de autoanticuerpos dirigidos contra el endotelio, lo que conduce a apoptosis de las células endoteliales a través de la producción de óxido nítrico. Este fenómeno se da porque los anticuerpos dirigidos contra la proteína NS1 tienen una reacción cruzada contra las proteínas de superficie del endotelio y de las plaquetas, como las adhesinas e integrinas, lo cual provoca la disfunción del endotelio y la disminución del número de plaquetas (Shu y cols., 2000; Lin y cols., 2003; Lin y cols., 2005).

Durante una segunda infección por dengue, la permeabilidad vascular también se ve afectada por los efectos sinérgicos del IFN- α , TNF- α y proteínas del complemento como C3a y C5a provocando la fuga de plasma en las células endoteliales (Navarro-Sánchez y cols., 2005).

En resumen, la destrucción de la barrera endotelial que conduce a la fuga transitoria de plasma, se debe en parte al daño directo del virus mediante la apoptosis de las células endoteliales, con una producción de quimiocinas (IL-8 y RANTES en el reclutamiento y activación de neutrófilos) y la activación del complemento (Avirutnan y cols., 1998; Lin y cols., 2003).

Otro elemento importante que contribuye a las hemorragias presentadas durante la infección por el virus del dengue es el desequilibrio en la hemostasia (Lei y cols., 2001). La hemostasia es mantenida por un balance entre la activación de la coagulación y la fibrinólisis. El grado de coagulación y la activación de la fibrinólisis inducida por el virus del dengue está asociada con la severidad de la enfermedad (Huang y cols., 2001).

Además de IL-6, se ha reportado que en monocitos/macrófagos tras su infección con el virus del dengue, secretan otras citocinas, por ejemplo TNF- α , IFN- α , IL-1 β , IL-8, IL-12, MIP-1 α y RANTES y que su acumulación regional en varios tejidos en donde el virus del dengue se ha diseminado, puede resultar en una inflamación local que se ve favorecida por reclutamiento de células

proinflamatorias al sitio de infección, las cuales secretan su contenido granular, incrementando la permeabilidad vascular (Chen y Wang, 2002).

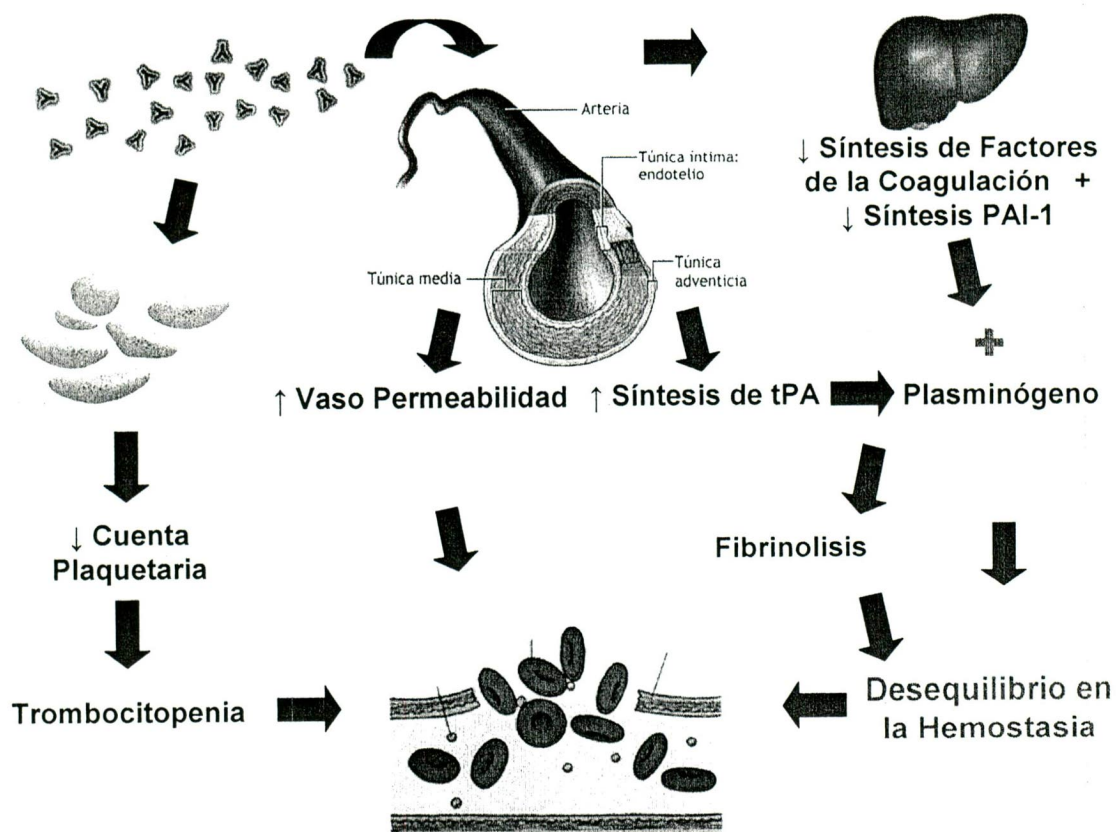


Figura 9. Daño en tres sistemas del organismo tras la infección por el virus del dengue. Las células plasmáticas secretan anticuerpos dirigidos contra los antígenos virales presentes en la superficie de las células infectadas; lo que puede llevar a la disfunción de los sistemas hematológico, endotelial y hepático, que en conjunto conducen a la hemorragia, mientras que la pérdida de plasma conduce a su vez al síndrome de choque por dengue.

2. 4. Mecanismos de Defensa Molecular contra el Virus

2. 4. 1. Respuesta Antiviral del Sistema Inmune Innato

Durante la infección viral, antes de la activación de los mecanismos de defensa antígeno específicos de la inmunidad adaptativa, los mecanismos antivirales

celulares innatos mediados por los IFNs- α/β , son las vías más importantes de la defensa del hospedero para limitar la replicación viral. La infección con virus, clásicamente induce la secreción de IFNs- α/β ; el IFN- α , se une a los receptores para IFN- α (IFNAR, el cual comprende de dos subunidades IFNAR1, IFNAR2) en la superficie de la célula infectada o en la superficie de células cercanas (Jones y cols., 2005).

La unión del IFN a su receptor, provoca la activación de una tirosina cinasa que forma parte de la cadena de señalización del receptor de citosina llamada Janus cinasa (Jak), la cual fosforila al receptor IFNAR a través de sus residuos de tirosina para reclutar, fosforilar y dimerizar al transductor de señales y activador transcripcional (STAT, signal transducer and activator of transcription). Los heterodímeros STAT1 y STAT2 se asocian con p48/IRF-9 para formar complejos ISGF3 (interferon-stimulated gene factor 3); el cual se transloca al núcleo para inducir la transcripción de los genes estimulados por el IFN (ISGs, interferon stimulated genes), a través de sus promotores que contienen elementos regulatorios estimulados por el IFN (ISRE, IFN-stimulated regulatory elements). Aproximadamente 100 genes son inducidos por los IFNs- α/β , los cuales codifican proteínas que son mediadoras de los efectos antivirales del IFN como la PKR (RNA-dependent protein kinase) (Muñoz-Jordán y cols., 2003; Jones y cols., 2005) (figura 10). Otra de estas proteínas, es la enzima oligoadenilato sintasa, la cual polimeriza ATP, que a su vez activa a la endoribonucleasa (RNasa L) que degrada al RNA viral. También, es la cinasa serina-treonina P1; que fosforila al factor de inicio de la traducción eIF-2, inhibiendo así la traducción, contribuyendo también a la inhibición de la replicación viral (Janeway, 2001). Esta función también se lleva a cabo por PKR (Samuel, 2001). Otros genes inducidos por la acción de este tipo de IFNs, son las citocinas (Elco y cols., 2005).

Para la expresión de IFN- β , se requiere de una activación coordinada de los factores de transcripción c-JUN/ATF-2, IRF3/IRF7 y NF- $\kappa\beta$ (p50/p65) (Kim y cols., 2000; Falvo y cols., 2000; Fredericksen y cols., 2004; Matsumoto y cols., 2004; Honda y cols., 2005; Li y cols., 2005b; Peng y cols., 2006; Wagoner y cols., 2007). El IFN- α y el IFN- β son producidos principalmente por leucocitos y fibroblastos,

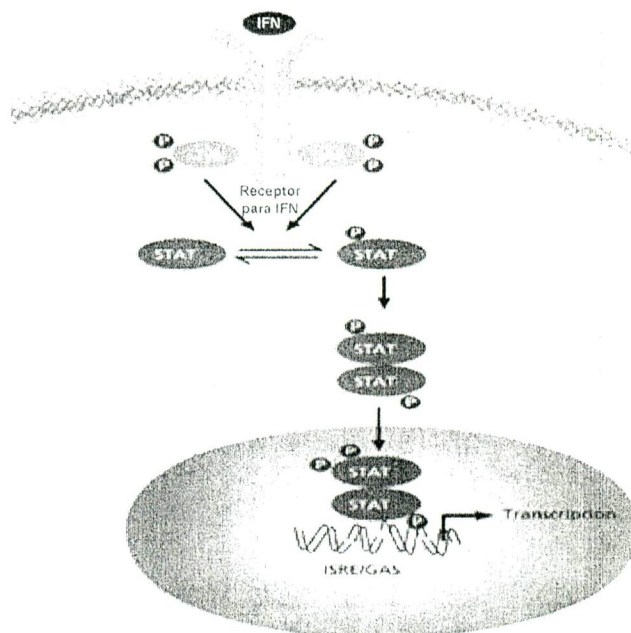
células dendríticas y macrófagos (Hidmark y cols., 2005; Osterlund y cols., 2005). Estos IFNs tienen tres funciones principales. Primero, inducen la resistencia a la replicación viral en las células adyacentes no infectadas, a través de la activación de genes que causan la destrucción de los mRNA, inhibiendo la traducción de proteínas virales y algunas proteínas del hospedero necesarias para el ciclo replicativo del virus. Segundo, la inducción de la expresión de moléculas de MHC clase I en la mayoría de los tipos celulares del cuerpo, incluyendo aquellas células infectadas con el virus, lo cual conduce a su eliminación por la acción citotóxica de los linfocitos T CD8. Tercero, la activación de las células NK, que eliminan selectivamente a las células infectadas con el virus. La síntesis de IFNs se da en respuesta al dsRNA, presente en el genoma de algunos virus (Janeway, 2001) como la forma replicativa en el virus del dengue (Lindenbach y Rice, 2003).

Sin embargo, se ha observado, que algunos virus pueden inhibir la expresión del IFN (Williams y Sen, 2003). El virus del dengue presenta mecanismos de evasión de la respuesta inmune, donde el virus inhibe la fosforilación de STAT1, STAT3 y Tyk2 mediada por IFN- α , pero incrementa la fosforilación de STAT1 y STAT3 mediada por IFN- γ (Ho y cols., 2005). También se ha reportado que las proteínas del virus inhiben la transducción de señales mediada por IFN- α a través de la disminución de la fosforilación de STAT1 y de la expresión de STAT2 (Jones y cols., 2005); además se ha observado que NS4B reduce la fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- β ó IFN- γ (Muñoz-Jordan y cols., 2003).

Por otro lado, también se ha descrito una vía independiente de IFN para la activación de ISGs (Interferon stimulated gen), algunos de los cuales pueden ser inducidos por IRF3 en la ausencia de la producción de IFN (Shresta y cols., 2005).

Figura 10. Respuesta antiviral del sistema inmune innato.

Cuando el IFN se une a su receptor (IFNR), provoca la activación de las tirosina cinasas TyK y Jak, las cuales fosforilan los residuos de tirosina del IFNR, provocando la activación, dimerización y translocación al núcleo del transductor de señales y activador transcripcional (STAT). Este estímulo induce la transcripción de los genes estimulados por IFN (ISGs), a través de sus promotores que contienen elementos regulatorios estimulados por IFN (ISRE) o de los genes que contienen en sus regiones regulatorias los elementos potenciadores GAS (factor de activación gama).



Los IFNs de tipo I, son la señal para el establecimiento de un estado antiviral en las células no infectadas, permitiendo el control del hospedero de la replicación viral. También juegan un papel importante en la generación de la respuesta inmune adaptativa, en donde la función de las células dendríticas es muy importante (Douagi y cols., 2007).

En las células dendríticas existen dos vías para la inducción de IFN: 1) a través del reconocimiento del RNA viral por receptores del citosol tales como RIG-1 (retinoic acid-induced gene 1) y MDA5 (Melanoma differentiation associated protein 5), las cuales señalan a través de IPS-1 (también conocido como MAVS, CARDIF, o VISA) para activar a IRF3 y $\text{NF-}\kappa\beta$, mediante los cuales se transcribe el IFN; y 2) a través del reconocimiento de los virus por TLR's y la posterior inducción de IFNs de tipo I (Douagi y cols., 2007). Todos estos receptores forman parte de una familia conocida como PRRs (pattern recognition receptors) (Hallman y cols., 2001; Malmgaard y cols., 2004).

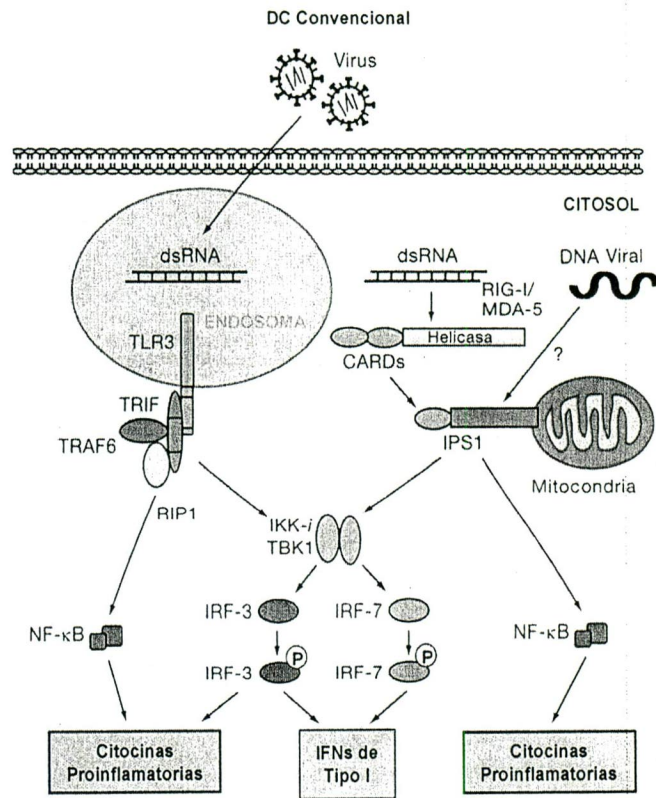
El sistema inmune innato detecta los microorganismos patógenos a través de receptores que reconocen estructuras altamente conservadas en éstos (Hallman y cols., 2001).

Cuando los microorganismos entran en el cuerpo, su reconocimiento inicial está basado en los PRRs, que selectivamente unen componentes esenciales de los patógenos llamados, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) (Hallman y cols., 2001; Malmgaard y cols., 2004).

Las interacciones PRR-PAMP activan vías de señalización intracelular que conducen a la expresión de moléculas proinflamatorias. La expresión de los PRRs se da preferentemente en monocitos y macrófagos, pero también en células dendríticas y linfocitos T y B. Funcionalmente, este tipo de receptores, puede ser dividido en tres clases. La primera clase, son aquellos que son secretados, como la lectina de unión a manosa (MBL); que se une a carbohidratos en bacterias, levaduras y otros microorganismos, activando el complemento. La segunda clase, son endocíticos como los receptores para manosa que reconocen a los PAMPs para que después de un proceso de endocitosis del microorganismo, éste sea destruido por medio de las enzimas lisosomales. La tercera clase, incluye a los que están involucrados en la señalización e inducen la expresión de productos de reacción de la fase aguda, como las citocinas inflamatorias. A esta clase de receptores pertenecen los receptores tipo RIG-1, los RLRs como RIG-1 y MDA5 y los TLRs (Hallman y cols., 2001; Malmgaard y cols., 2004).

RIG-I y MDA5, son dos proteínas que comparten similaridad de secuencia dentro del dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) y un dominio de RNA helicasa DExD/H box. Estas proteínas se consideran como sensores del dsRNA y transmiten la señal al adaptador mitocondrial IPS-1, vía interacción CARD. IPS-1 coordina la actividad de las proteínas cinasas que activan los factores de transcripción IRF3, IRF7 y NF- κ B que son necesarios para inducir la transcripción del gen del IFN- β (Kawai y cols., 2005) (figura 11).

Figura 11. Señalización mediante RIG-1 y MDA5. Durante la infección viral, el dsRNA es reconocido por RIG-1 y MDA5 que inducen IFN que a su vez induce a RIG-1 y MDA5 con lo que se amplifica la respuesta inmune innata antiviral hasta que la molécula de dsRNA (que provocó esta respuesta) se elimina y/o se induce el inhibidor LGP2 (Yoneyama y cols., 2005; Akira y cols., 2006).



2. 4. 2. TLRs

El descubrimiento de la familia TLR comenzó con la identificación de Toll, un receptor expresado por los insectos (*Drosophila*) y que es esencial para el establecimiento de la polaridad dorsoventral durante la embriogénesis. Estudios subsecuentes, revelaron que Toll también tiene un papel en la respuesta inmune innata contra la infección por hongos. A través de análisis en las bases de datos, se encontró que Toll tiene homólogos en distintos organismos y hasta la fecha, se han identificado 11 miembros de la familia TLR en humanos (Akira y Takeda, 2004).

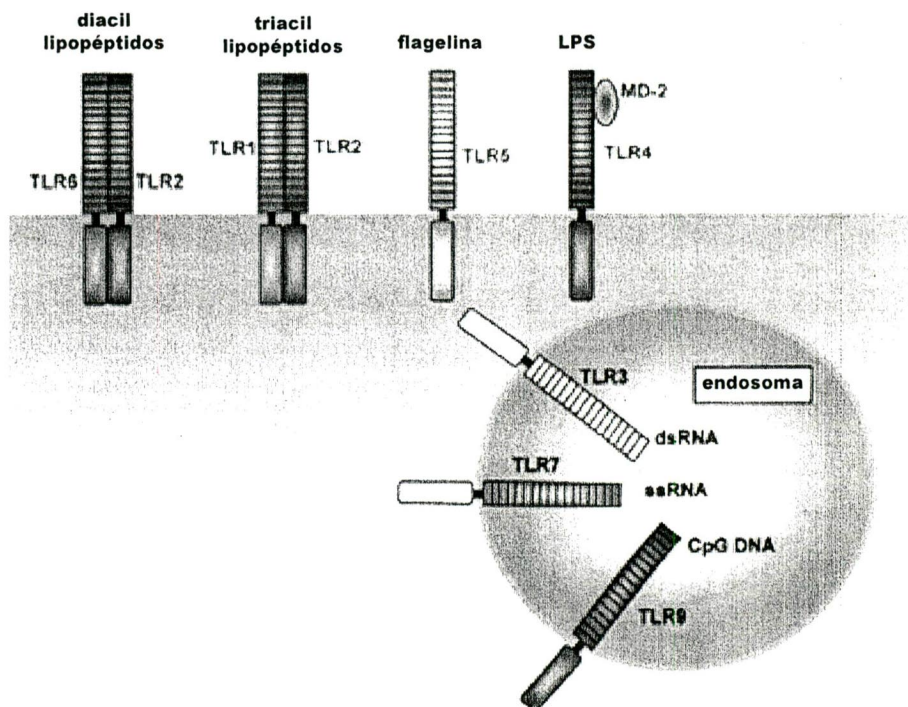
Los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 son expresados en la superficie celular, mientras que los TLRs 3, 7, 8 y 9 son expresados intracelularmente en endosomas. Sin embargo, TLR10 no está totalmente caracterizado pero se presume que es funcional y

TLR11 no es funcional debido a la presencia de un codón de paro en el gen *TLR11* (Takeda y Akira, 2005).

A) Ligandos de los TLRs

TLR2 puede reconocer bacterias Gram positivas y levaduras y formar heterodímeros con los TLRs 1 y 6. Cuando se asocia con TLR1, puede reconocer triacil-lipopéptidos, mientras que con TLR6 puede reconocer diacil-lipopéptidos. TLR4 puede reconocer lipopolisacárido, el cual está presente en bacterias Gram negativas y TLR5 reconoce la flagelina en las bacterias. TLR3 reconoce moléculas de dsRNA y los TLRs 7 y 8 reconocen moléculas de ssRNA. Como ya se sabe, tanto el dsRNA como el ssRNA forman parte de los genomas virales, por lo tanto estos tres TLRs están involucrados en la respuesta contra los virus. Por último, TLR9 tiene como ligando al CpG DNA no metilado, el cual forma parte del DNA bacteriano (Hallman y cols., 2001; Takeda y Akira, 2005) (figura 12).

Figura 12. Los diferentes tipos de TLRs en humanos y sus ligandos. Los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 se encuentran en la superficie celular; mientras que los TLRs 3, 7 y 9, son intracelulares y participan en el reconocimiento de los genomas virales (Takeda y Akira, 2005).

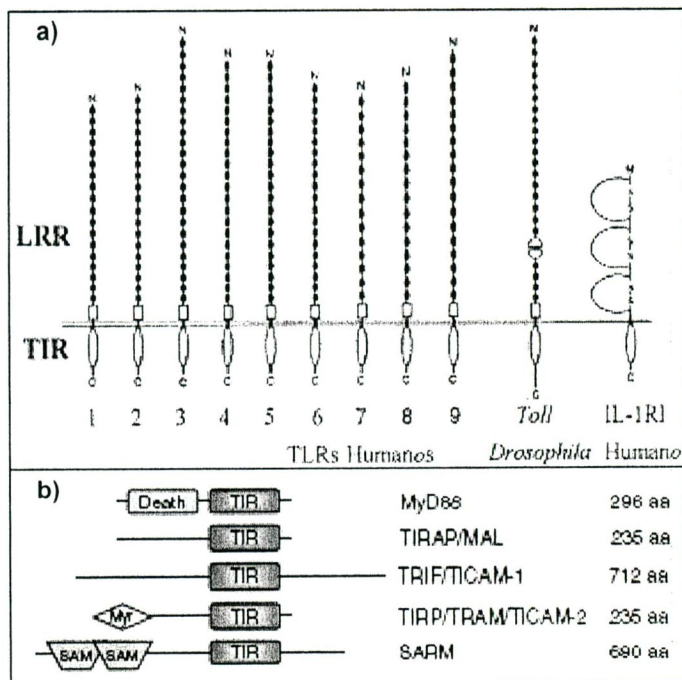


B) Estructura y Moléculas Adaptadoras

Los TLRs son proteínas de membrana tipo 1. El dominio extracelular de TLR contiene repetidos ricos en leucina (LRR) que están involucrados directamente en el reconocimiento de varios patógenos (Akira y Takeda, 2004). Todos los TLRs contienen un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico, el cual está involucrado en la transducción de la señal y se le conoce como dominio TIR (dominio receptor IL-1-Toll) en base a su homología con el receptor tipo 1 para IL-1 (IL-1R1) (Hallman y cols., 2001). La transducción de la señal, depende de la asociación constitutiva y/o reclutamiento de moléculas adaptadoras específicas al dominio TIR de TLR. Estas moléculas también contienen un dominio TIR, por lo que la interacción entre TLR y su molécula adaptadora es a través de sus dominios TIR. Básicamente existen cuatro tipos de moléculas adaptadoras. MyD88 (myeloid differentiation factor 88); TIRAP (TIR domain-containing adapter protein), también llamada Mal (MyD88 adapter-like); TRIF (TIR domain-containing adapter inducing IFN- β), también llamado TICAM-1 (TIR domain-containing adapter molecule-1); y TIRP (TIR-containing protein), también referida como TRAM (TRIF-related adapter molecule) o TICAM-2 (Vogel y cols., 2003).

Existe una quinta molécula adaptadora llamada SARM (sterile-alpha and HEAT/Armadillo motif protein), cuya función no ha sido bien definida (Vogel y cols., 2003; Beutler, 2004) (figura 13).

Figura 13. Los dominios de los TLRs y sus proteínas adaptadoras. a) Los TLRs contienen un dominio extracelular de repetidos ricos en leucina LRR, y un dominio TIR (dominio receptor IL-1-Toll). Ambos dominios presentan homología con el receptor Toll en *Drosophila*; mientras que solo el dominio TIR presenta homología con el receptor tipo 1 para IL-1 (IL-1R1) (Hallman y cols., 2001). b) Las moléculas adaptadoras también contienen dominios TIR que interactúan con los dominios TIR en los TLRs. Se puede observar la longitud en aminoácidos de cada adaptador (Vogel y cols., 2003).



C) Vía de Señalización Dependiente de MyD88

Este tipo de señalización involucra a los TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, donde MyD88 se une directamente a los TLRs 7, 8 y 9. TLR2 forma heterodímeros con los TLRs 1 y 6 y requiere de la interacción directa del adaptador TIRAP, el cual se une a TLR2 y sobre TIRAP se une MyD88. Esta interacción entre TIRAP y MyD88 también se presenta en TLR4, donde TIRAP se une directamente a TLR4. MyD88 recluta a IRAK4 (IL-1R-associated kinase 4), sobre el cual se asocia IRAK1. IRAK4 induce la fosforilación de IRAK1, sobre el cual se asocia TRAF6 (TNF-receptor-associated factor 6).

IRAK1 y TRAF6 se disocian del receptor y forman un complejo con TAK1 (transforming growth factor- β -activated kinase-), TAB1 (TAK1-binding protein 1) y TAB2 en la membrana plasmática, lo cual induce la fosforilación de TAB2 y TAK1. IRAK1 es degradada en la membrana plasmática, y el complejo remanente se transloca al citosol, donde este se asocia a través de TRAF6 con las ubiquitina-ligasas UBC13 (ubiquitin-conjugating enzyme 13) y UEV1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1).

Lo anterior conduce a la ubiquitinación de TRAF6, lo cual induce la activación de TAK1. TAK1 puede fosforilar para dar inicio a las MAPKs, lo que a su vez conduce a la activación del factor de transcripción AP-1 (activator protein-1) para la inducción de citocinas. TAK1 también puede fosforilar al complejo IKK (inhibitor of nuclear factor- $\kappa\beta$ ($I\kappa\beta$)-kinase complex), el cual consiste de dos subunidades catalíticas IKK- α e IKK- β y la subunidad regulatoria IKK- γ (Akira y Takeda, 2004). Como $I\kappa\beta$ mantiene secuestrado a NF- $\kappa\beta$ en el citoplasma, el complejo IKK fosforila a $I\kappa\beta$, lo cual conduce a su ubiquitinación y subsiguiente degradación. Esto permite la activación de NF- $\kappa\beta$ en fase temprana, que se transloca al núcleo e induce la expresión de sus genes blanco, cuyos productos son citocinas inflamatorias tales como TNF- α e IL-6, además de la expresión de IFNs; sin embargo se ha demostrado que el IFN- β se expresa preferentemente a través de una vía independiente de MyD88 (Akira y Takeda, 2004; Akira, 2003) (figura 14).

D) Vía de Señalización Independiente de MyD88

Este tipo de señalización involucra a los TLRs 3 y 4. Cuando se involucra a TLR4, el adaptador TRAM se une directamente a TLR4 y sobre TRAM se une el adaptador TRIF. Cuando se involucra a TLR3, el adaptador TRIF se une directamente a TLR3. El adaptador TRIF va a estar involucrado en dos vías para la activación de dos factores de transcripción, una que conduce a la activación en fase tardía de NF- κ B y otra que conduce a la activación de IRF3, este último es central en el establecimiento de la respuesta antiviral del hospedero. Ambos factores pueden activarse a través de los TLRs 3 ó 4.

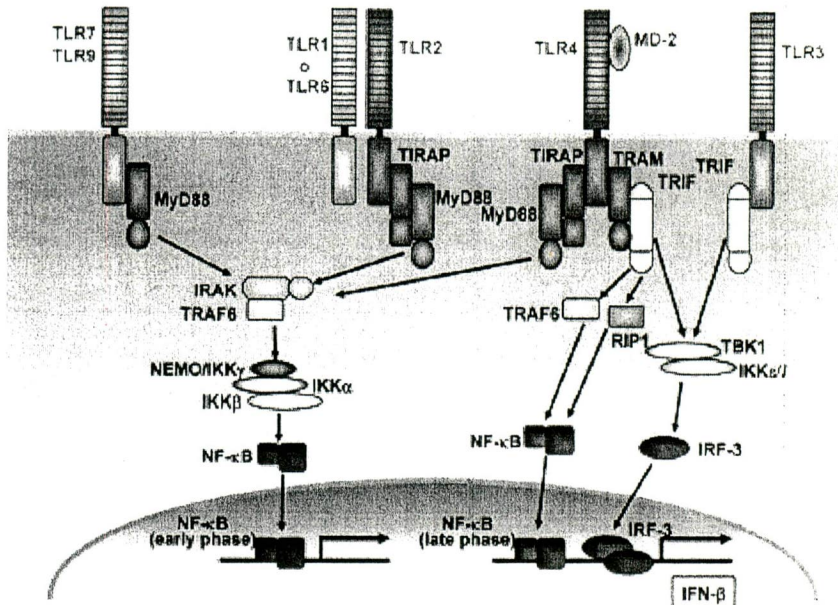
Para activar a NF- κ B en fase tardía, TRAF6 se asocia a TRIF, donde TRAF6 directamente regula la activación de NF- κ B. Una alternativa a esta activación a través de TRAF6, es a través de la proteína RIP-1 (kinases receptor interacting protein-1), la cual puede activar a NF- κ B. En ambos casos NF- κ B se transloca al núcleo e induce la expresión de sus genes blanco que llevan a la producción de IFN- β .

Para activar a IRF-3, TRIF se asocia con un complejo proteico compuesto por las proteínas IKK α /IKK β (IkappaB kinase) y TBK1 (TANK, TRAF family member associated NF- κ B activator)-binding kinase 1), dicho complejo fosforila a IRF3, que a su vez se dimeriza y se transloca al núcleo para la inducción de los genes del IFN- β (Takeda y Akira, 2005; Honda y cols., 2005; Fredericksen y Gale, 2006) (figura 14). También se ha descrito la participación de TRIF en la activación de las MAP cinasas, que a su vez activan a AP-1 (Sasai y cols., 2006).

E) Los TLRs en la Respuesta Inmune Antiviral

Cuando hay una infección viral, los tanto los macrófagos como las células dendríticas, toman a las células apoptóticas infectadas con virus, los RNA virales pueden ser liberados de estas células apoptóticas en los compartimientos ácidos intracelulares tales como los fagosomas, que contienen enzimas lisosomales.

Figura 14. Vías de señalización dependientes e independientes de MyD88. La vía dependiente de MyD88 involucra los TLRs 1, 2, 4, 6, 7 y 9; y los adaptadores Myd88 y TIRAP que conducen a la transcripción de los genes inducidos por NF- κ B. Por otra parte, la vía independiente de Myd88 involucra los TLRs 3 y 4 y los adaptadores TRAM y TRIF para la transcripción de los genes inducidos por NF- κ B e IRF3 (Takeda y Akira, 2005).



Se ha observado que los TLRs 3 y 7, que son receptores para los RNAs virales y son indispensables en la respuesta inmune innata antiviral por inducción de los IFNs tipo 1, están localizados en los mismos compartimentos intracelulares, que contienen células apoptóticas, donde estos TLRs pueden acceder a sus ligandos (Nishiya y cols., 2005).

Además de la fagocitosis de las células infectadas o de la partícula viral a través de los receptores para Fc que interactúan con los anticuerpos unidos a la partícula viral, otra manera en que los TLRs 3 y 7 acceden a sus ligandos en los endosomas, es durante el proceso de infección. Cuando los viriones se unen al receptor celular y entran a la célula por el proceso de endocitosis mediada por receptor, el ambiente ácido del endosoma permite la fusión de la membrana viral con la del endosoma, liberándose así la nucleocápside al citosol. Sin embargo, este proceso de fusión no es completamente eficiente y suele ocurrir la degradación de los viriones dentro de los endosomas, permitiendo que el TLR3 o el TLR7 accedan ya sea al dsRNA o al ssRNA respectivamente y con ello activen a las células dendríticas (Lund y cols., 2004).

Una manera adicional en que los TLRs 3 y 7 pueden acceder al RNA viral, es durante el proceso de replicación viral, el cual se lleva a cabo intracelularmente. Después del reconocimiento del RNA viral, TLR7 por ejemplo, induce la activación de NF- κ B, a través de una vía de señalización dependiente de MyD88, que al final conduce a la activación de los genes para la producción de citocinas inflamatorias (Akira y Takeda, 2004). Por otro lado, el dsRNA que es reconocido por TLR3, puede formar parte de algunos genomas virales o ser generado durante su replicación (Lund y cols., 2004).

Los diferentes tipos de células dendríticas exhiben un gran repertorio de TLRs, como los 2, 3, 4, 5, 7 y 9 reflejando el papel único de éstas células en el reconocimiento de patógenos y en la transición de la inmunidad innata a la adaptativa (Muzio y cols., 2000; Re y Strominger, 2004). Aunque no hay respuesta al CpG DNA, un agonista de TLR9 (Re y Strominger, 2004)

Se ha observado durante la infección de las células dendríticas por el virus del dengue, que además del retículo endoplásmico, existen partículas virales en compartimientos vesiculares, donde podría encontrarse el dsRNA, que se genera durante su replicación (Ho y cols., 2001). En este caso el TLR3 podría reconocer al dsRNA en los compartimientos vesiculares. También el dsRNA proveniente de una célula que fue infectada y lisada, puede ser endocitado por las células dendríticas por medio de un receptor desconocido, para luego ser reconocido por el TLR3 endosomal e inducir así la expresión del IFN- β (Matsumoto y cols., 2004; Alexopoulou y cols., 2001).

La participación del TLR7 ya ha sido demostrada durante la infección de las células dendríticas plasmacitoides por el virus del dengue (Wang y cols., 2006). Sin embargo, no se ha demostrado la participación del TLR3 en la infección por el virus del dengue. Pero además, si se toma en cuenta que las células dendríticas son preferencialmente infectadas por el virus del dengue y no los monocitos o macrófagos (Tassaneeritthep y cols., 2003); que la infección de las CDIs por el virus del dengue, es un paso crítico en el establecimiento de la infección (Navarro-Sánchez y cols., 2003); y que a diferencia de las células dendríticas plasmacitoides, las CDIs junto con las células dendríticas mieloides son el único

tipo celular del sistema inmune que expresa TLR3 (Matsumoto y cols., 2003; Muzio y cols., 2000); por lo tanto el estudiar la participación del TLR3 en CDIs tendría mucho mayor relevancia que el estudio de la participación del TLR7 en células dendríticas plasmacitoides.

La acción antiviral a través de TLR3, puede inducirse activando a IRF3, por medio de una vía independiente de MyD88, que conduce a la expresión de IFN- β y RANTES (Takeda y Akira, 2005; Malmgaard y cols., 2004).

F) Características Moleculares del TLR3

El TLR3 es una proteína de 904 aminoácidos con un peso molecular de 125 kDa, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 4q35 y es codificado por 4 exones. Consta de un dominio extracelular compuesto por 25 repetidos ricos en leucina (LRRs); una región transmembranal y una cola citoplásmica que es el dominio TIR homólogo al receptor Toll/IL-1 (Matsumoto y cols., 2003; Matsumoto y cols., 2004; Okahira y cols., 2005). Además presenta una homología del 79% con el TLR3 de ratón (Alexopoulou y cols., 2001).

La distribución en el espacio y la organización estérica del dsRNA hacen posible su reconocimiento por los receptores de la célula. Por lo tanto se podría decir que al igual que RIG-1 y PKR, el TLR3 reconoce al dsRNA por su estructura tridimensional y no por su secuencia de aminoácidos (Matsumoto y cols., 2004; Okahira y cols., 2005). El resultado de la señalización a través de TLR3 es la expresión de citocinas principalmente IFN- β y la maduración de las células dendríticas (Matsumoto y cols., 2004).

Aunque en teoría el TLR3 reconoce el dsRNA viral como el del virus West Nile (Wang y cols., 2004), también puede reconocer el RNA de parásitos como el de helmintos (Aksoy y cols., 2005), e incluso el RNA mensajeros del hospedero (Karikó y cols., 2004b).

2. 4. 3. RNA de Interferencia en Mamíferos

Cuando los virus infectan las células eucariontes o cuando los transposones y transgenes se integran en el genoma del hospedero, el dsRNA es producido a partir de los genes invasores, ya sea durante la replicación viral o por la transcripción aberrante de los promotores localizados cerca de los sitios de inserción de los transgenes o transposones, causando inestabilidad genómica.

Los eucariontes como plantas, protistas, hongos, invertebrados y vertebrados han desarrollado un sistema de defensa celular que responde al dsRNA y protege su genoma contra estos elementos invasores extraños. El dsRNA es rápidamente procesado por una enzima celular para generar fragmentos pequeños de dsRNA llamados siRNAs (small interfering RNAs), los cuales dirigen la degradación de una secuencia específica de un mRNA (Tuschl, 2003). Así por ejemplo, los virus pueden ser a la vez la fuente y el blanco del silenciamiento (Agrawal y cols., 2003).

El proceso de silenciamiento genético postranscripcional (PTGS, posttranscriptional gene silencing) dependiente de dsRNA, es comúnmente referido como RNA de interferencia (iRNA). En algunos casos, el PTGS está también ligado al silenciamiento transcripcional del gen (TGS, transcriptional gene silencing). En plantas el TGS causa modificaciones en la cromatina del locus silenciado; por ejemplo, incrementando la metilación del DNA, y esto requiere que las secuencias promotoras sean blanco de PTGS (Tuschl, 2003). A su vez el PTGS ha sido asociado con los mecanismos de resistencia al RNA viral en plantas, ya que el dsRNA en general es un intermediario en la replicación viral, actuando como un eficiente iniciador. Otro papel del PTGS es el de detectar e inactivar secuencias de DNA repetitivo, controlando así la expansión de los elementos repetitivos incluyendo genes endógenos (Agrawal y cols., 2003).

El silenciamiento del RNA es un potente medio de defensa antiviral en plantas y animales (Itaya y cols., 2007) y es una poderosa herramienta usada para manipular la expresión del gen o determinar su función (Sledz y cols., 2003).

El mecanismo de silenciamiento secuencia-específica del gen se inicia por la presencia de un dsRNA, originado de varias fuentes, por ejemplo, genomas

celulares, intermediarios de replicación viral, RNAs celulares aberrantes, transgenes sobreexpresados y transposones (Karikó y cols., 2004; Itaya y cols., 2007). La respuesta en células de mamíferos al dsRNA de gran longitud es un incremento en la degradación del RNA y la inhibición de la síntesis de proteínas. Ambas respuestas son mediadas por la activación de la PKR, la cual fosforila al eIF2 α y la generación de 2'-5'-oligoadenilato, la cual activa a la RNasa L.

Los estudios iniciales del iRNA en células de mamíferos fueron complicados, debido a que el dsRNA de gran longitud usado para activar el sistema de silenciamiento, activaba la supresión de manera secuencia-no específica. Un gran descubrimiento ocurrió cuando se tuvo la hipótesis que los dsRNAs de al menos 30 pb son requeridos para activar este sistema de supresión secuencia-no específica. Así el uso de siRNAs de 21 pb con un tamaño similar a los productos de la DICER podrían no activar la inhibición de la síntesis de proteínas (independientemente de la secuencia) o la degradación del mRNA (Karikó y cols., 2004). Sin embargo, se ha demostrado que 17 pb de dsRNA son suficientes para activar a la PKR (Karikó y cols., 2004) al igual que los siRNAs de 21 pb provocando la inducción de IFN- β (Sledz y cols., 2003).

Se ha reportado que tanto el siRNA como el shRNA inducen a través de TLR3 y la producción de IFNs de tipo 1, la activación celular y la inhibición de la expresión del gen independiente de la secuencia en células dendríticas derivadas de monocitos (Karikó y cols., 2004). También se ha reportado que los vectores plasmídicos y lentivirales que contienen shRNAs, pueden inducir a la 2'-5'-oligoadenilato sintasa, un gen blanco del IFN (Bridge y cols., 2003).

La maquinaria de silenciamiento a través del siRNA, puede ser utilizada para el estudio de la función de los genes, donde el primer paso es la selección de la secuencia de siRNA en el gen blanco; esta secuencia se usa para la síntesis del siRNA o construcción de los plásmidos que contienen la secuencia de DNA que codifica para el siRNA, o bien puede emplearse dsRNA, el cual dará origen a los siRNAs (Agrawal y cols., 2003).

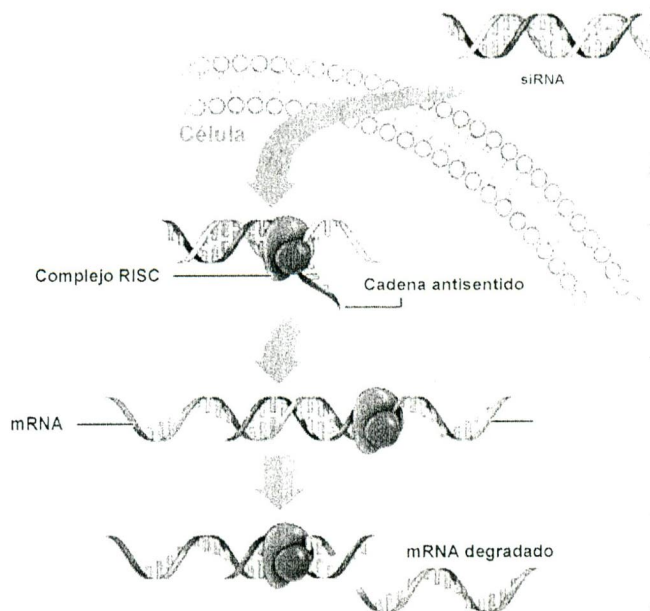
Posteriormente se realiza la transfección ya sea de los dsRNA o los siRNAs o de los plásmidos que expresen los siRNAs en la células blanco; y al final se realiza

un monitoreo de la eficacia del silenciamiento (Agrawal y cols., 2003). La maquinaria de iRNA como herramienta de investigación, podría ser de utilidad para determinar la participación de TLR3 en la infección por el virus del dengue.

A) Mecanismo de Acción

Los dsRNAs son primeramente procesados por la Dicer, una enzima tipo ribonucleasa III (RNasa III) que genera los siRNAs en el citoplasma, los cuales tienen un tamaño medio de 21 a 25 pb. Los siRNAs generados o transfectados, tienen en sus extremos 3' dos o tres nucleótidos que sobresalen del dúplex; un fosfato en el extremo 5' y un hidroxilo terminal libre en el 3'. Posteriormente, los siRNAs se ensamblan en un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, RNA-induced silencing complex), el cual elimina la cadena sentido y usa la antisentido del siRNA para encontrar al mRNA homólogo para su degradación (Tuschl, 2003; Agrawal y cols., 2003) (figura 15). Dentro de la maquinaria de silenciamiento, existen proteínas llamadas argonautas, las cuales se encargan de estabilizar los siRNAs, median la formación del complejo RISC y/o localizar al mRNA blanco (Tuschl, 2003). En plantas se ha observado la amplificación de los siRNAs a través de una RdRP, la cual a partir de los siRNAs e hibridación con el mRNA, genera dsRNA que son procesados por la Dicer para generar nuevamente siRNAs (Kim, 2005).

Figura 15. Mecanismo de silenciamiento por iRNA. Los siRNAs generados a partir de dsRNA ó de origen externo, se unen al complejo RISC, el cual elimina la cadena sentido y usa la cadena antisentido, para encontrar al mRNA homólogo para su degradación.



B) Parámetros en el manejo de siRNA

El silenciamiento de genes mediante siRNA, se ha convertido en una herramienta de investigación, ya que facilita los estudios que pretenden analizar la función de los genes en una amplia variedad de organismos de una manera rápida y económica, comparado con otras metodologías como tecnologías antisentido, blanqueo de genes por recombinación homóloga, ó ribozimas. Este sistema también puede facilitar los estudios de fármacos a través de la identificación de genes que pueden conferir resistencia o genes cuyos mutantes fenotípicos son mejorados por el tratamiento con fármacos.

El iRNA puede jugar un papel importante en aplicaciones terapéuticas, por ejemplo reduciendo la expresión de algunos oncogenes o reduciendo la infección de algunos virus (Agrawal y cols., 2003). Sin embargo, el silenciamiento requiere de la presencia de los siRNAs, por lo tanto, el efecto es generalmente pasajero, ya que el siRNA se diluye durante los ciclos de división celular. Por esto, se han implementado estrategias de expresión que aseguren la presencia constante de siRNA en la célula, y por lo tanto, un efecto duradero (Tuschl, 2003).

Por otro lado, el dsRNA en células de mamíferos provoca reacciones fisiológicas que conducen a la inducción de la síntesis de IFN (Janeway, 2001). Se sabe que la síntesis de IFN requiere de dsRNAs de un tamaño mayor a 30 pb que activan a la proteína cinasa PKR y a la 2',5'-oligoadenilato sintasa (2',5'-AS). El PKR activado evita la traducción debido a la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2- α . El 2',5'-AS activado causa la degradación del mRNA por la RNasa L activada por la 2',5'-AS. Estas respuestas no son secuencia específica con respecto al dsRNA (Tuschl, 2003).

Con base en los efectos descritos, se han implementado estrategias alternas en el uso de siRNA que evitan la inducción de la síntesis de IFN. La primera, implica el uso de líneas celulares que preserven las características de los estados embrionarios, en donde sus sistemas de IFN no hayan sido aún desarrollados. La segunda, usar siRNA con la estructura o el tamaño que les permita escapar de la detección del sistema del IFN para no activar a PKR y a 2',5'-AS (Tuschl, 2003).

3. Antecedentes Particulares

La participación del TLR3 ya ha sido demostrada en otras infecciones virales como durante la infección de las células epiteliales bronquiales por rinovirus (Hewson y cols., 2005), en donde para poder analizar la participación del TLR3, se utilizó un anticuerpo dirigido contra esta proteína para bloquear su función; después de infectar las células epiteliales bronquiales con rinovirus, se observó un incremento en la producción de citocinas cuando lo que se esperaba era una disminución. Este incremento en la producción de citocinas se debió a un incremento en la replicación viral, tras el bloqueo del TLR3, demostrando así su función en restringir la replicación viral; sin embargo el incremento en la producción de citocinas solo podía deberse a la participación de otra vía independiente de TLR3.

A pesar de que el virus del dengue tiene un genoma de ssRNA y TLR3 tiene como ligando el dsRNA, cabe recordar que durante su replicación, el virus del dengue presenta dsRNA (Lindenbach y Rice, 2003). Así, tanto las células apoptóticas infectadas con el virus como los restos celulares, pueden contener no solo antígenos virales sino también dsRNA, el cual puede ser endocitado por las células dendríticas y reconocido por el TLR3 endosomal (Sasai y cols., 2006; Fredericksen y Gale, 2006).

En otros trabajos donde se ha estudiado la participación de TLR3 en la infección viral, se han utilizado también virus de ssRNA, los cuales producen dsRNA como intermediario como por ejemplo, el virus de la estomatitis vesicular (Edelmann y cols., 2004) y el virus West Nile (Wang y cols., 2004; Diamond y Klein, 2004). En el trabajo de Wang y cols. (2004), utilizando ratones "knock out" para *tlr3*, se demostró que a nivel sistémico, estos ratones eran más susceptibles a la infección por el virus West Nile, pero fueron más resistentes a la encefalitis provocada por el virus; mientras que la presencia del TLR3 favoreció la entrada del virus de la sangre al cerebro a través de la permeabilización de la "barrera sanguínea cerebral", lo cual condujo a la encefalitis y muerte de los ratones infectados por el virus West Nile; observándose así, un papel contradictorio del TLR3.

Como se mencionó antes, en el trabajo de Wang y cols. (2006), se demostró la participación de TLR7 que conduce a la producción del IFN- α durante la infección de las células dendríticas plasmacitoides por el virus del dengue; la producción del IFN- α durante la infección de estas células por el virus del dengue, fue claramente disminuida al utilizar un inhibidor del TLR7. Por último, también se ha demostrado que la inducción de RANTES, es dependiente de TLR3 tras la interacción de este con dsRNA sintético en células epiteliales (Hewson y cols., 2005) y que también es fuertemente inducido en monocitos/macrófagos tras su infección por el virus del dengue (Chen y Wang, 2002).

4. Importancia del Estudio

Las células dendríticas son uno de los principales blancos del virus del dengue en el humano y su infección es un paso crucial en el establecimiento del virus en el organismo así mismo, las células dendríticas derivadas de monocitos junto con las células dendríticas mieloides y las células Natural Killer son los únicos tipos celulares del sistema inmune que expresan el TLR3; por lo tanto, el estudiar en las dendríticas inmaduras la participación del TLR3 en la cascada de señalización que conduce a un proceso de eliminación viral, después de la infección por el virus del dengue, permitirá entender el papel que juega la respuesta inmune innata en la patogenia de la enfermedad.

Tomando en cuenta la situación mundial y nacional con respecto al dengue, se hace necesario el desarrollo de estrategias alternas para su erradicación; por lo que el entender como el sistema inmune innato a través TLR3, contribuye en el desarrollo de un estado antiviral en el organismo, podrá ser de utilidad para el desarrollo de una estrategia que podría conferir protección contra la infección por dengue en humanos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación del TLR3 en la infección de las células dendríticas por el virus del dengue.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Obtener un cultivo primario de células dendríticas inmaduras humanas y estandarizar en éste las condiciones de transfección.
- II. Silenciar mediante siRNA la expresión del TLR3 en las células dendríticas inmaduras.
- III. Analizar el efecto de la inhibición de la expresión del TLR3 en las células dendríticas, después de su infección por el virus del dengue.
- IV. Analizar la localización del IRF3 en las células dendríticas tratadas con siRNA e infectadas por el virus del dengue.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el presente proyecto se contemplaron a las células dendríticas derivadas de monocitos humanos, como modelo para la infección por dengue en humanos y en éstas células se llevó a cabo la transfección de los siRNAs específicos para el TLR3 con la finalidad de inhibir la expresión de ésta molécula. El efecto del silenciamiento del TLR3, se determinó mediante ensayos de plaqueo y citometría de flujo para determinar la eficiencia de la replicación viral en las células tratadas con siRNA e infectadas con el virus del dengue (figura 16).

Como ya se describió, cuando el TLR3 reconoce el dsRNA viral, se inicia la respuesta inmune antiviral con la translocación al núcleo del factor de transcripción IRF3 que induce la expresión del IFN- β , que a su vez, inducirá la expresión de genes cuyos productos proteicos mediarán los efectos antivirales del IFN. De la misma manera se inducirá la expresión de la quimiocina RANTES, encargada de atraer más leucocitos al sitio de infección.

Por lo tanto, si el TLR3 participa en la vía de señalización para conducir a la activación de la respuesta inmune antiviral después de la infección de las células dendríticas por el virus del dengue, al inhibir la expresión de éste, podría inhibirse la translocación al núcleo del IRF3 y evitar la producción de IFN- β y RANTES, lo que conduciría a un incremento en la replicación viral. A este respecto en el presente proyecto se analizó parte de la respuesta inmune antiviral monitoreando la translocación al núcleo del IRF3.

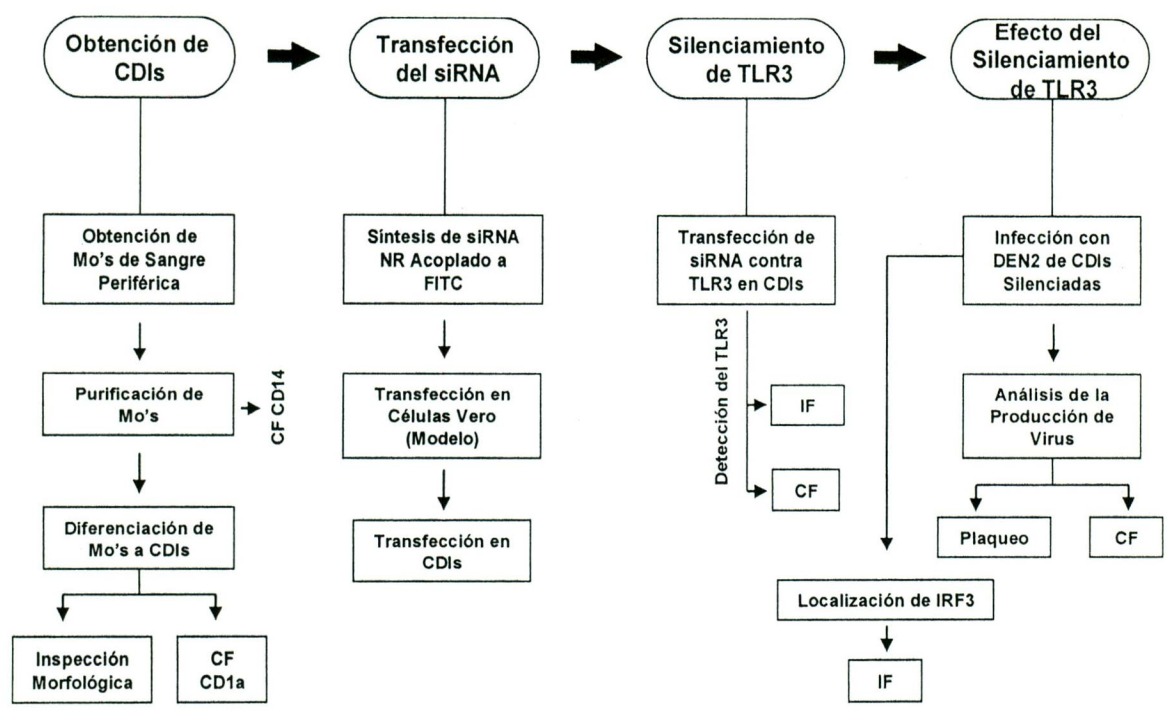


Figura 16. Estrategia experimental para determinar la participación del TLR3 en la infección de las células dendríticas por el virus del dengue. Las células se obtuvieron a partir de monocitos (Mo's) humanos purificados y estimulados con citocinas que se caracterizaron mediante la detección de moléculas de superficie por citometría de flujo (CF). La estandarización de la transfección de siRNA en células dendríticas inmaduras (CDIs) se realizó utilizando un siRNA no relacionado (NR) conjugado a FITC y las condiciones de transfección efectivas se utilizaron para llevar a cabo el silenciamiento del TLR3, cuya expresión se analizó por citometría de flujo. Por último, se hicieron ensayos de plaqueo y citometría de flujo para determinar la eficiencia de la infección del virus del dengue en las células dendríticas tratadas con siRNA; mientras que la respuesta inmune se analizó parcialmente mediante ensayos de inmunofluorescencia (IF) para la localización celular del IRF3.

METODOLOGÍA

1. Obtención de Células Dendríticas a partir de Monocitos de Sangre Periférica

Las células dendríticas inmaduras (CDIs) se obtuvieron a partir de monocitos CD14⁺ de sangre periférica de donantes sanos. Los paquetes sanguíneos equivalentes a 500 ml de sangre total proporcionados por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, se mezclaron con PBS [(amortiguador salino de fosfatos) (1 mM de fosfato y 15 mM de cloruro de sodio pH 7.2)], se trataron con Ficoll-Paque, y se centrifugaron a 2200 rpm durante 25 min. Se recuperó la fase rica en células mononucleares que se lavó con PBS y se incubó con anticuerpos monoclonales anti-CD14 conjugados a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) durante 15 min a 4 °C. Después de lavar con PBS, las células CD14⁺ se separaron usando una columna de purificación MACS (Miltenyi Biotec). La pureza de los monocitos se determinó por citometría de flujo analizando la expresión del marcador de superficie CD14.

Los monocitos obtenidos se cultivaron en placas de 24 pozos con medio RPMI 1640 Advanced (Gibco-BRL) [suplementado con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, 10% de suero fetal bovino certificado (SFB), penicilina estreptomycin (Gibco) y 2 mM de glutamina (pH 7)/ml] a una densidad de 8×10^5 /ml en presencia de 300 U/ml de GM-CSF y 150 U/ml de IL-4 (Peprotech) para obtener CDIs. El medio de cultivo se cambió cada tercer día con medio completo conteniendo la concentración de citocinas ya mencionada. Las células se utilizaron para los ensayos después de 10 días de cultivo.

La pureza de las CDIs se determinó por citometría de flujo analizando la expresión de los marcadores CD11c y CD1a. Por otro lado la morfología de las CDIs se verificó por microscopia de luz (figura 17).

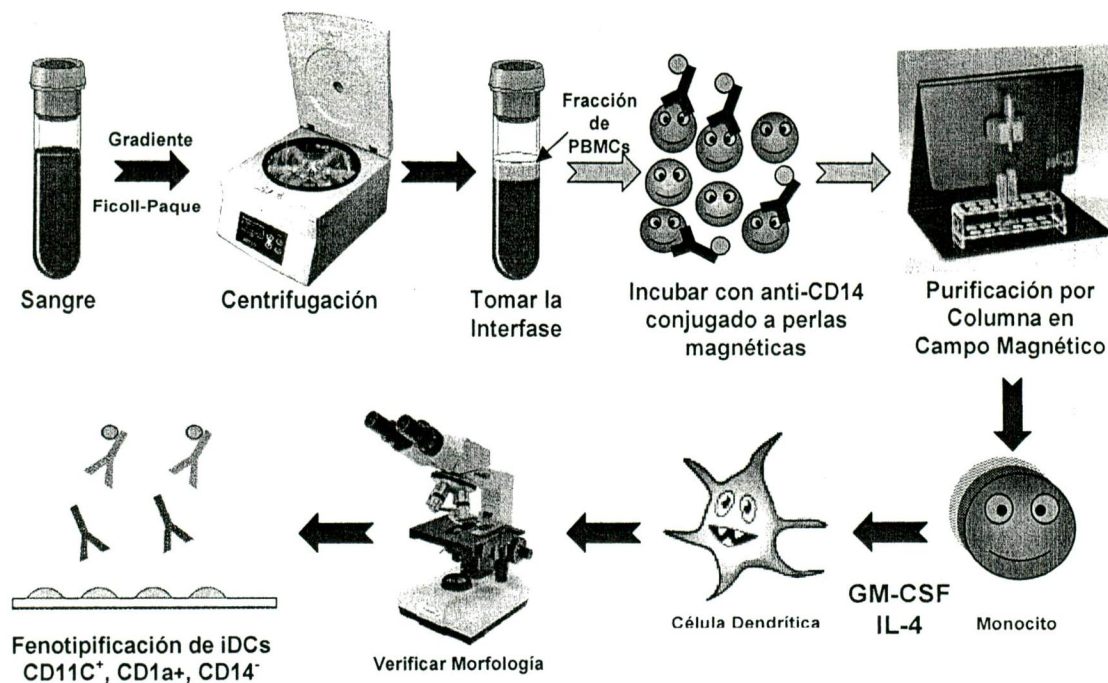


Figura 17. Obtención de CDIs humanas. Los monocitos CD14⁺ se separaron a partir de sangre periférica diluida en PBS y tratada con Ficoll, después se centrifugó y se tomó la fracción de células mononucleares que se incubaron con anticuerpos anti-CD14 conjugados a perlas magnéticas y se separaron a través de una columna de purificación. Los monocitos obtenidos se cultivaron en placas de 24 pozos con medio RPMI en presencia de IL-4 y GM-CSF durante 10 días para diferenciarlos a CDIs en las que se verificó su morfología por microscopía de luz y se analizó la presencia de marcadores de superficie por citometría de flujo.

2. Síntesis de siRNA no Relacionado conjugado a FITC

La síntesis de un siRNA no relacionado conjugado a FITC para su uso en la estandarización de los ensayos de transfección en CDIs, se realizó mediante el kit "Silencer siRNA Construction kit" (Ambion).

En reacciones separadas los dos oligonucleótidos templados fueron alineados al primer promotor de T7, la mezcla se incubó por 5 minutos a 70 °C en el termociclador y luego 5 minutos a temperatura ambiente (t.a.) Posteriormente se llevó a cabo la reacción de la Klenow DNA polimerasa en presencia de 2 µl de una mezcla de dNTPs para crear los templados de transcripción de siRNA, la reacción se incubó 30 minutos a 37 °C.

Los oligonucleótidos sentido y antisentido diseñados para un siRNA no relacionado (que no tiene secuencia blanco en células de mamífero) se hibridaron con un oligonucleótido incluido en el kit que permite reacción de transcripción por la T7 RNA polimerasa en presencia de 2.5 μ l de dNTP conjugado a FITC y 10 μ l de una mezcla de dNTPs, la reacción se incubó por 2 h a 37 °C para crear los transcritos, los cuales se hibridaron incubándose la reacción toda la noche a 37 °C para crear el dsRNA. Posteriormente las secuencias líder fueron removidas con 3 μ l de RNase y los templados de DNA fueron removidas con 2.5 μ l de DNase, la mezcla se incubó por 2 h a 37 °C. El siRNA obtenido fue purificado para remover el exceso de nucleótidos, proteínas y sales de la reacción. Por último el siRNA fue cuantificado a una absorbancia de 260 nm (figura 18).

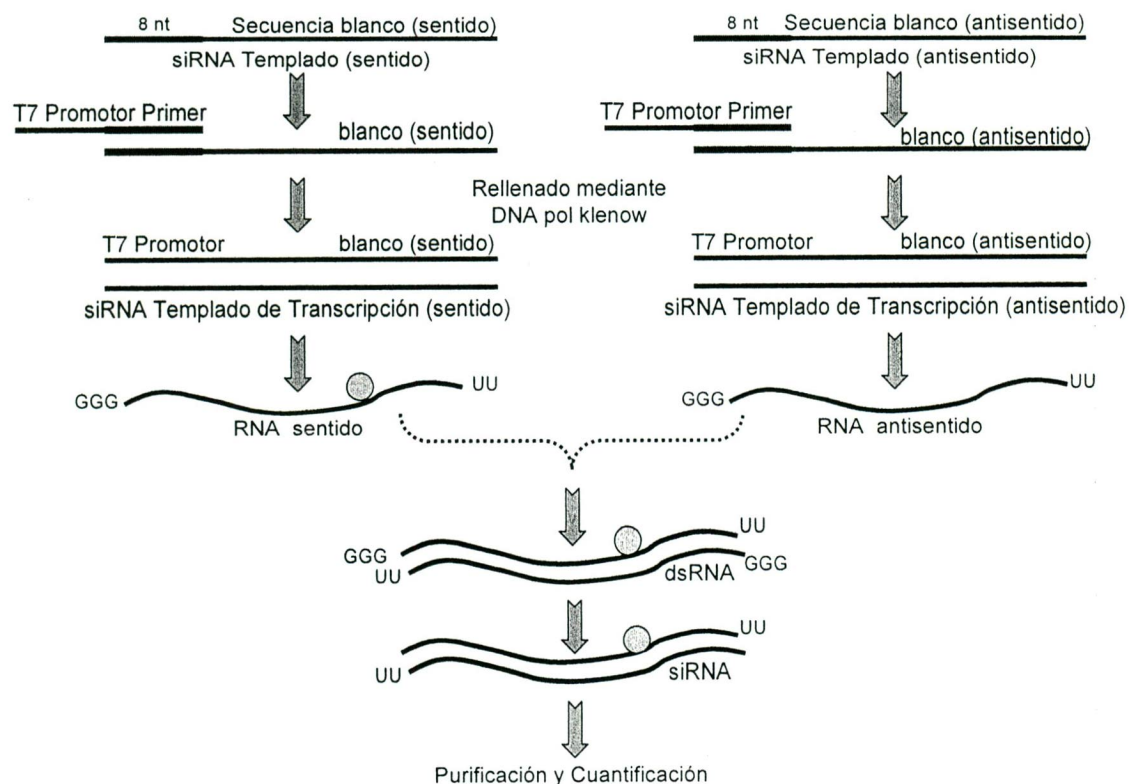


Figura 18. Representación esquemática de la síntesis de siRNA no relacionado conjugado a FITC. El proceso se inicia con el alineamiento de los templados sentido y antisentido con el primer promotor T7, posteriormente la secuencia complementaria es sintetizada por la Klenow DNA polimerasa y luego el transcrito es sintetizado por la T7 RNA polimerasa. Después de hibridar la cadena sentido y la cadena antisentido, las secuencias líderes son removidas mediante una RNasa. El siRNA obtenido es purificado y posteriormente cuantificado.

3. Ensayos de Transfección y Silenciamiento por siRNA

Los ensayos de transfección de siRNA en las CDIs se llevaron a cabo en 160,000 cels por pozo en placas de 24 pozos en las que se añadió una mezcla conteniendo el siRNA específico para TLR3 o un siRNA no relacionado y el reactivo de transfección Dharmafect (Dharmacon) en medio de transfección {RPMI Advanced (Gibco-BRL) [suplementado con 2 mM de glutamina (pH 7)/ml]} lo cual se incubó por 6 h. Posteriormente se retiró el medio de transfección y se añadió medio completo sin antibióticos {Advanced (Gibco-BRL) [suplementado con 2 mM de glutamina (pH 7)/ml y SFB 10%]}. Después de 48 h de transfección las células se fijaron y permeabilizaron para analizar la expresión de TLR3 mediante citometría de flujo.

En el caso de los ensayos de control de transfección en donde se utilizó un siRNA no relacionado conjugado a FITC, después de 6 h de transfección, las CDIs o células Vero previamente sembradas en laminillas, se fijaron con paraformaldehído al 2% y montadas en cubreobjetos para su análisis mediante microscopia confocal. Como controles se utilizaron el siRNA específico para TLR3 (Santa Cruz) como siRNA no relacionado a la misma concentración. (figura 19).

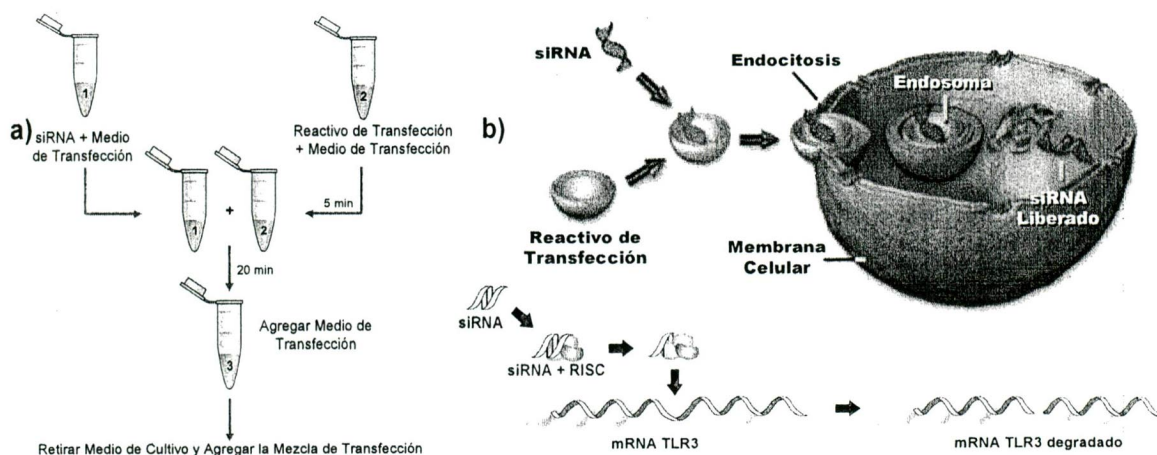
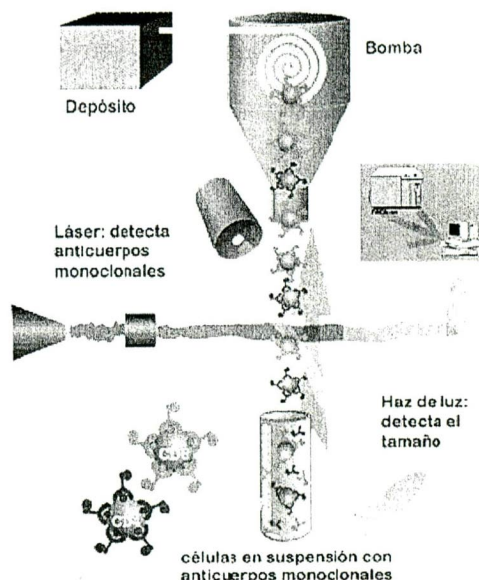


Figura 19. Silenciamiento del TLR3 en células dendríticas. a) Representación esquemática del protocolo de transfección. b) Representación esquemática de la transfección del siRNA en la célula (arriba) y mecanismo molecular del RNA de interferencia (abajo). El complejo siRNA-reactivo de transfección es internalizado en la célula y el siRNA es liberado en su interior. El Mecanismo de silenciamiento por siRNA inicia con su unión al complejo RISC, el cual elimina la cadena sentido y usa la antisentido, para encontrar al mRNA homólogo para su degradación.

4. Ensayo de Citometría de Flujo

Para la determinación de la expresión de marcadores de superficie CD14, CD11c, CD1a, CD40, CD83 y CD86 las células se colectaron y resuspendieron en 50 μ l de FACS buffer (PBS, 0.5% de albúmina sérica bovina y 0.01% azida de sodio). Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 2%, se bloquearon con SFB al 10% y se incubaron con el anticuerpo primario [anti-CD14 (Chemicon) ó anti-CD11c (Santa Cruz Biotechnology) ambos conjugados con FITC] por 30 min a 4°C. Para la determinación de la expresión de los marcadores de superficie CD1a, CD40, CD83 y CD86 se incubaron con el anticuerpo primario [anti-CD1a, anti-CD40, anti-CD83 ó anti-CD86 (BD PharMingen)] por 30 min a 4°C, seguido por una incubación con un anti-ratón conjugado a FITC (Zymed) por 30 min a 4°C. Para la determinación de la expresión del TLR3, las células fijadas con paraformaldehído al 2% se permeabilizaron con acetona fría por 7 min a 4°C, se bloquearon con SFB al 10% y se incubaron con anti-TLR3 (Santa Cruz Biotechnology) por 1 h a 4°C. Posteriormente, las células se incubaron con un anti-chivo conjugado a Alexa 555 (Invitrogen) por 30 min a 4°C. Para la determinación de la presencia de la proteína E viral, las células fijadas, bloqueadas y permeabilizadas como ya mencionado se incubaron con anti-E (Chemicon) por 1 h a 4°C. Posteriormente, las células se incubaron con un anti-ratón conjugado a FITC por 30 min a 4°C. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (Calibur) tomando 10,000 eventos (figura 20).

Figura 20. Citometría de flujo para el análisis de la expresión de proteínas en CDIs. Las células dendríticas resuspendidas e incubadas con anticuerpos, pasan a través de un tubo muy fino en una sola fila de células, se registraron por láser y un haz de luz; el primero identifica los anticuerpos marcados y por lo tanto analiza la expresión de la proteína; y el segundo identifica el tamaño de las células para determinar la pureza de la población celular.



5. Ensayo de Infección con el Virus del Dengue

Las células se infectaron con el virus del dengue serotipo 2 (DEN2) a MOI (del inglés multiplicity of infection) de 3, 5 y 7 por 2 h a 37°C. Posteriormente se lavó la monocapa con medio de cultivo y se tomaron alícuotas de los sobrenadantes a las 24 y 36 h postinfección. La cantidad de virus producido se determinó por medio de ensayos de plaqueo (figura 21).

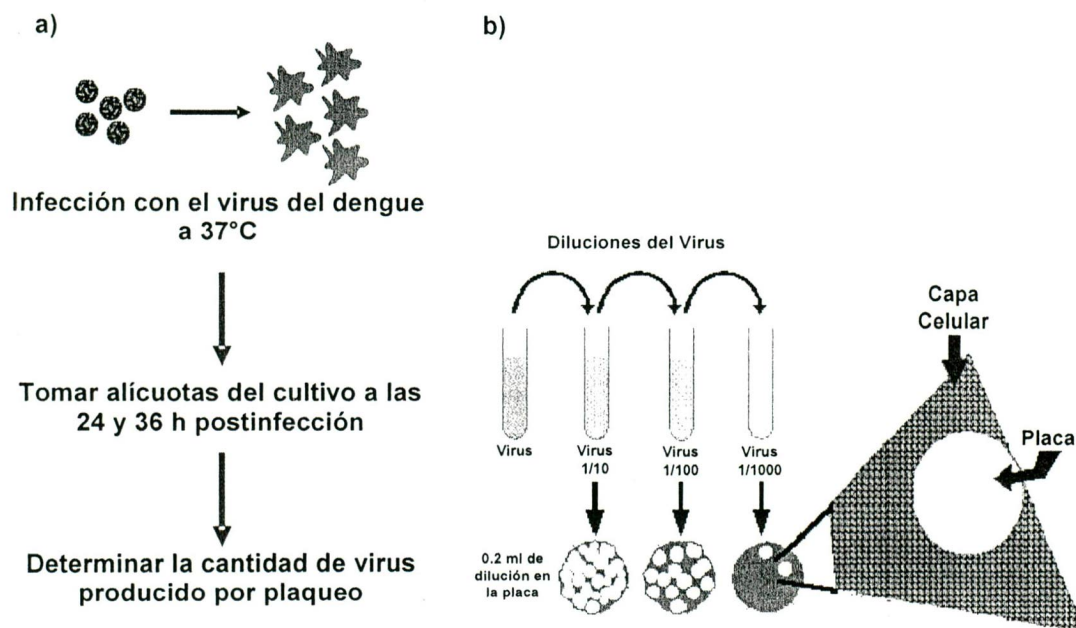


Figura 21. Efecto del silenciamiento del TLR3 en las células dendríticas tras la infección con el Virus del Dengue. a) Las CDIs transfectadas con el siRNA, se infectaron con el virus del dengue a 37 °C y se tomaron alícuotas del cultivo a las 24 y 36 h postinfección. b) Para determinar la cantidad de virus producido, se realizaron ensayos de plaqueo en células BHK-21.

6. Ensayo de Plaqueo del Virus del Dengue

Para realizar los ensayos de plaqueo, se sembraron células BHK-21 en placas de 24 pozos el día anterior al ensayo. Los sobrenadantes de las células infectadas a titular se diluyeron en 500 µl de medio Hanks (Gibco-BRL) [suplementado con 0.5% de SFB y antibióticos (penicilina y estreptomycin)] y se incubaron 15 min a 37°C. Posteriormente, se retiró el medio de las células BHK-21 y se añadieron 200 µl de la dilución viral incubándose por 1 h a 37°C. Las diluciones virales se titularon por duplicado.

Después se agregó 1 ml de carboximetilcelulosa completa [1x de medio MEM (Gibco-BRL), 5% de suero fetal bovino, antibióticos (penicilina estreptomicina), 1x de glutamina y 0.8% de carboximetilcelulosa] y se incubó por 5 días a 37°C. Transcurrido este tiempo, se descartó el medio y se tiñó con NBB [1 g de Naphtol Blue Black, 13.6g de acetona de sodio, 60 ml de ácido acético glacial y H₂O] por 20 min a t.a. Después de lavar los pozos se contó el número de placas producidas en cada dilución para obtener las PFUs/ml (del inglés, plaques forming units) (figura 21).

7. Ensayo de Inmunofluorescencia

Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% por 20 min a t.a., se permeabilizaron con acetona fría por 7 min a 4°C y se bloquearon con SFB al 10%. Luego, se incubaron con el anticuerpo primario [anti-TLR3 ó anti-IRF3 (Santa Cruz Biotechnology)] por 1 h a 37°C. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo secundario [anti-chivo conjugado a FITC (Invitrogen), anti-chivo conjugado a Alexa 555 (Invitrogen) ó anti-conejo conjugado a Alexa 555 (Invitrogen)] por 1 h a 37°C. Después de lavar con PBS-NH₄Cl 50 mM, las muestras se montaron en portaobjetos con 4 µl de vectashield DAPI (Vector Laboratories) para su análisis por microscopía confocal (Leica TCS SP2) (figura 22).

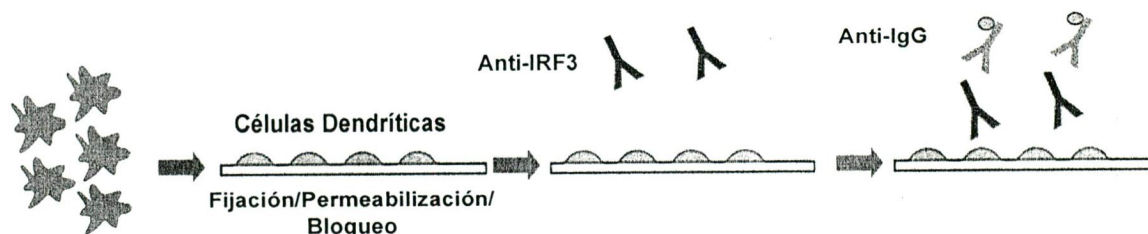


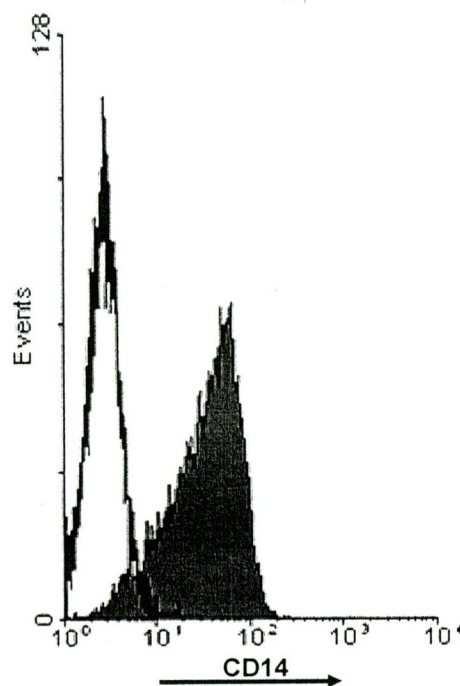
Figura 22. Ensayo de inmunofluorescencia para el análisis de la localización celular del IRF3. Las células dendríticas tratadas con siRNA e infectadas, se fijaron con paraformaldehído al 2%, se permeabilizaron con acetona fría y se bloquearon. Posteriormente las células se incubaron con anti-IRF3 seguidas de un anti-conejo conjugado a Alexa 555 para analizar la localización celular del IRF3 por microscopía confocal.

RESULTADOS

1. Obtención Monocitos de Sangre Periférica

El cultivo primario de CDIs humanas, se obtuvo a partir de sangre de donadores sanos. La sangre se proceso mediante un gradiente de ficoll, del cual se recuperó la fracción rica en células mononucleares, que se incubó con anticuerpos anti-CD14 conjugados a perlas magnéticas para la purificación de la fracción monocítica mediante una columna que permite la separación al colocarse en un campo magnético. La pureza de las células obtenidas se determinó mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-CD14 con la finalidad de detectar el porcentaje de células CD14⁺ en el cultivo. En general los cultivos de monocitos obtenidos tuvieron aproximadamente alrededor del 90% de la población celular con el marcador CD14⁺, lo cual indica una pureza adecuada para proceder a la diferenciación del cultivo (figura 23).

Figura 23. Citometría de flujo para el análisis de la expresión del marcador de superficie CD14 en monocitos de sangre periférica. Los monocitos obtenidos mediante anticuerpos anti-CD14 conjugados a perlas magnéticas, se incubaron con anticuerpos anti-CD14 conjugado a FITC para analizar la expresión de este marcador de superficie CD14 y así verificar la pureza del cultivo de monocitos. El gráfico sin fondo representa el control de autofluorescencia, que corresponden a células sin tratar. El gráfico con fondo corresponde a células incubadas con el anticuerpo. En el eje "x" se graficó la expresión del marcador CD14 y en el eje "y" se representa el número de eventos, donde cada evento representa una célula.



2. Diferenciación de Monocitos a CDIs

Los monocitos obtenidos se trataron con GM-CSF e IL-4 para su diferenciación a CDIs y después de 10 días de tratamiento, se verificó su morfología mediante microscopia de luz (figura 24) y por citometría de flujo se verificó la presencia de los marcadores de superficie CD11c y CD1a (figura 26).

Para la obtención de CDIs, se probaron diferentes concentraciones de las citocinas mencionadas, tomando como base las metodologías reportadas por varios autores (Zhu y cols., 2000; Tassaneetrithep y cols., 2003; Cuellar y cols., 2004; Karikó y cols., 2004; Re y Strominger, 2004; Ho y cols., 2001 y 2005; Osterlund y cols., 2005; y Palmer y cols., 2005); así, se probaron las concentraciones de citocinas desde 100 U/ml hasta 800 U/ml de GM-CSF y de 100 U/ml hasta 1000 U/ml de IL-4. Mediante el análisis de la morfología celular se observó que a mayor concentración de citocinas, las células no adquirían morfología dendrítica y morían a los pocos días del tratamiento; mientras que a menores concentraciones de citocinas aparecía la morfología dendrítica y se extendía la viabilidad celular hasta por 15 días. La concentración que nos dio mejores resultados en morfología y viabilidad celular fue de 300 U/ml de GM-CSF y de 150 U/ml de IL-4. La morfología de las CDIs obtenidas con el tratamiento mencionado, es similar a las reportadas para este tipo celular (Wöfl y cols., 2002) como se muestra en las imágenes de la figura 24b. Una característica que se observó en las CDIs obtenidas, es su baja adherencia a las placas de cultivo, lo cual también ha sido reportado en trabajos como los de Santini y cols., 2000; Wöfl y cols., 2002; Michiels y cols., 2005; y en el de Ramakrishna y cols., 2007.

En cambio los macrófagos mostrados en la figura 24a, tienen forma redonda, se adhieren fuertemente a las placas de cultivo y su diferenciación a partir de monocitos es más rápida.

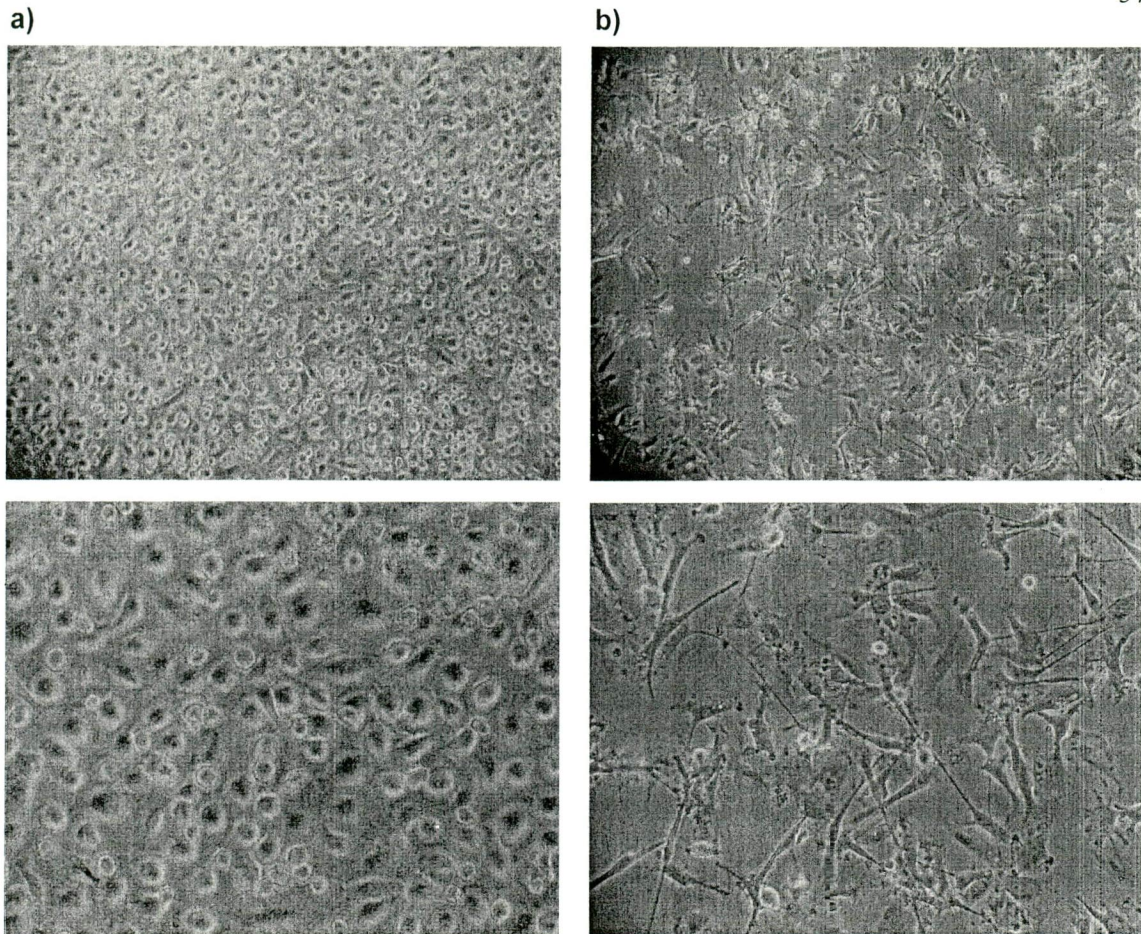


Figura 24. Microscopía de luz para analizar la morfología en CDIs. Parte superior, vista panorámica del cultivo celular. Parte inferior, acercamiento del cultivo celular utilizando un objetivo 60X. Macrófagos (a) y CDIs (b).

Después del análisis morfológico de los cultivos celulares, se llevó a cabo la fenotipificación a través de anticuerpos en la cual se determinó la expresión de los marcadores de superficie CD14, CD11c y CD1a mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura 25, alrededor del 90% de las CDIs, expresan los marcadores CD11c (figura 25b) y CD1a (figura 25c) indicando el estado de diferenciación de estas células que además, pierden el marcador de superficie CD14 (figura 25a) como se reporta en trabajos como el de Cuellar y cols. (2004) y los de Ho y cols., (2001 y 2005).

Por lo tanto, las CDIs obtenidas, muestran los marcadores de diferenciación comúnmente presentes en este tipo celular tal y como se reporta en trabajos como los de Ho y cols., (2001 y 2005), ya antes mencionados.

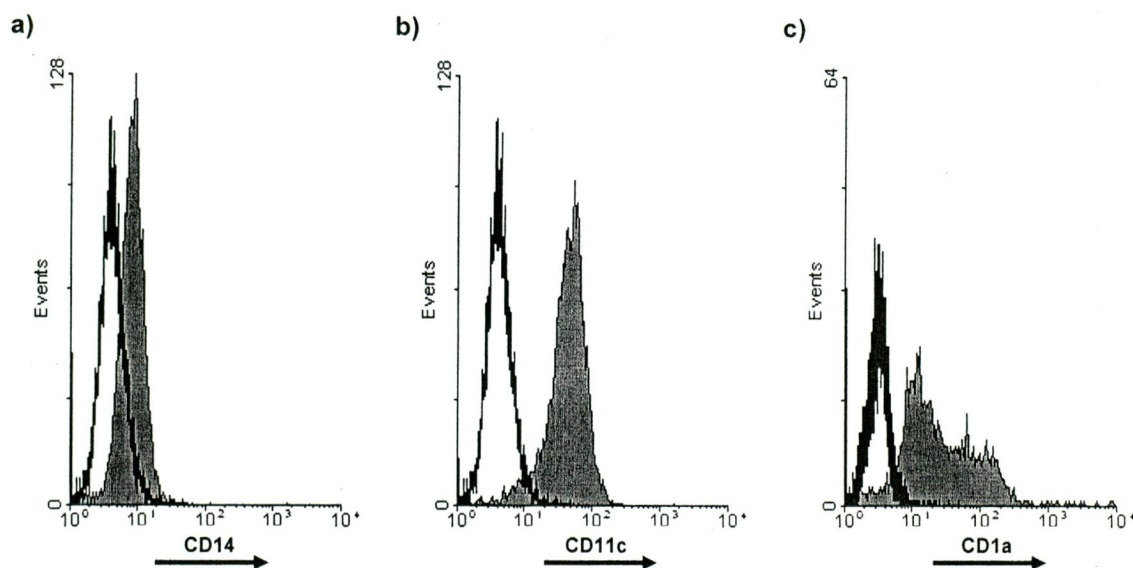


Figura 25. Citometría de flujo para el análisis de la expresión de marcadores de superficie en CDIs. Los monocitos fueron tratados con GM-CSF e IL-4 por 10 días hasta su diferenciación a CDIs cuya pureza se analizó por citometría de flujo; para esto las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se incubaron en ausencia (gráfico sin fondo) o presencia (gráfico con fondo) de los anticuerpos. (a) CD14, (b) CD11c y (c) CD1a. En el eje "x", se graficó la expresión del marcador de superficie y en el eje "y" se representan el número de eventos.

Para corroborar estos resultados, cada uno de los marcadores mencionados fue evaluado en la población de macrófagos, los cuales deben expresar marcadores como CD14 y CD11c, pero no CD1a. Los resultados de este análisis indican que los macrófagos fueron positivos a la detección del marcador CD14 (figura 26a) y al CD11c (figura 26b); sin embargo, no emitieron fluorescencia después de su incubación con un anti-CD1a (figura 26c). Por lo tanto, en ambos casos, esto es en CDIs y macrófagos que obtuvimos, presentaron los marcadores de superficie reportados como típicos en cada una de estas poblaciones celulares.

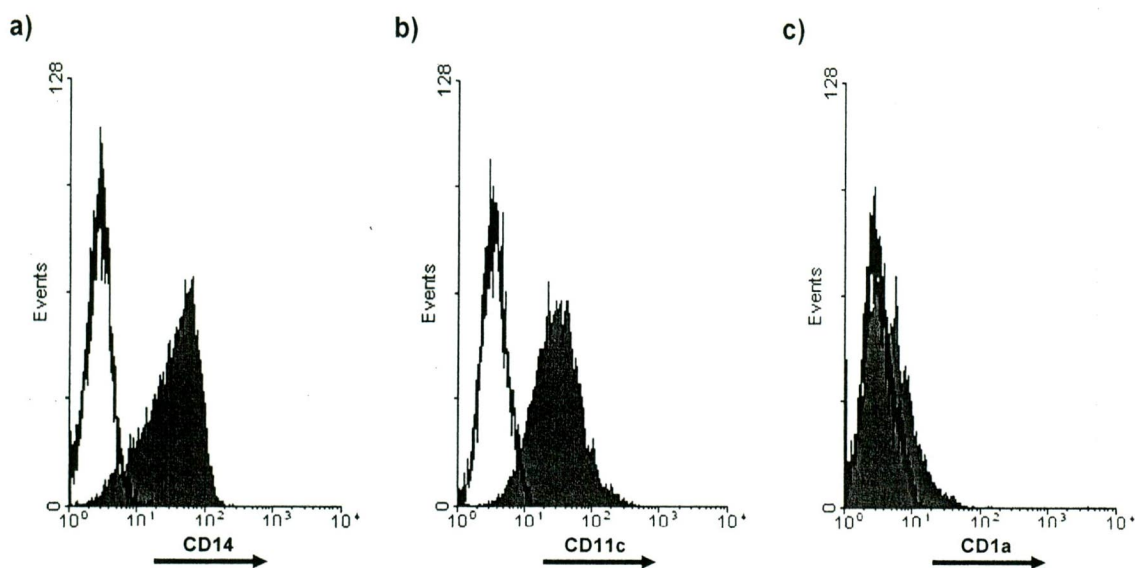


Figura 26. Citometría de flujo para el análisis de la expresión de marcadores de superficie en macrófagos. Los macrófago fijados se incubaron con en ausencia (gráfico sin fondo) ó en presencia (gráfico con fondo) de los anticuerpos anti-CD14 (a), anti-CD11c (b) y anti-CD1a (c) y posteriormente con anticuerpos secundarios conjugados a FITC, para someter a análisis por citometría de flujo. En el eje "x", se graficó la expresión del marcador de superficie y en el eje "y" se representan el número de eventos.

3. Transfección de siRNA-FITC en Células Vero

Las CDIs son un modelo muy interesante para conocer la función de las moléculas del huésped en respuesta a la infección por el virus del dengue; por lo tanto, se procedió a estandarizar el silenciamiento de la expresión genética mediante siRNA, que por su utilidad en determinar la función de la proteína del huésped es una herramienta con una aplicación basta en el área de la virología.

En la estandarización de las condiciones de transfección, se utilizaron primeramente las células Vero, de las que ya conocíamos las condiciones de transfección de otros siRNAs; por lo tanto, se utilizaron para conocer la concentración de siRNA suficiente para visualizar éstas moléculas en el interior de las células. Para dicho propósito se sintetizaron siRNAs conjugados a FITC para poder visualizar su internalización en las células y detectarlos mediante microscopia confocal.

El siRNA conjugado a FITC consiste de una secuencia que carece de blanco en los mRNAs de mamífero. La fluorescencia de este siRNA, se obtuvo por la adición de un UTP conjugado a FITC en la reacción en la que se sintetizó.

Para la transfección de células Vero, se emplearon concentraciones de siRNA-FITC de 122 mM, 244 mM, 366 mM, 488 mM, 610 mM, 732 mM y 854 mM. El tiempo de interacción del siRNA con la célula huésped es de 6 h, pues es el que mejores resultados ha demostrado en células Vero, ya que da una buena eficiencia de transfección con una viabilidad celular mayor al 85%.

Posteriormente las células se lavaron y se fijaron para su observación por microscopia confocal, mediante el cual se pudo determinar la concentración del siRNA en el interior de la célula. Para calcular la eficiencia de transfección, se contaron 100 células de campos representativos y de éstas se contaron las que emitían fluorescencia.

La concentración de siRNA-FITC que tuvo la mayor eficiencia de transfección fue la de 488 mM, ya que a mayores concentraciones de siRNA no se aumentó la eficiencia de transfección, la cual fue del 66% (figura 27); por lo que se utilizó esta cantidad de siRNA-FITC, como un parámetro fijo para la transfección de las CDIs.

Para la transfección de las CDIs, se probaron diferentes condiciones entre las que se encuentran la concentración del reactivo de transfección así como la composición del medio de cultivo, esto es presencia o ausencia de suero y/o citocinas durante y después de la transfección; esto se debe a que la lipotransfección ha sido reportada como poco eficiente en los cultivos primarios de CDIs (Stewart y cols., 2003).

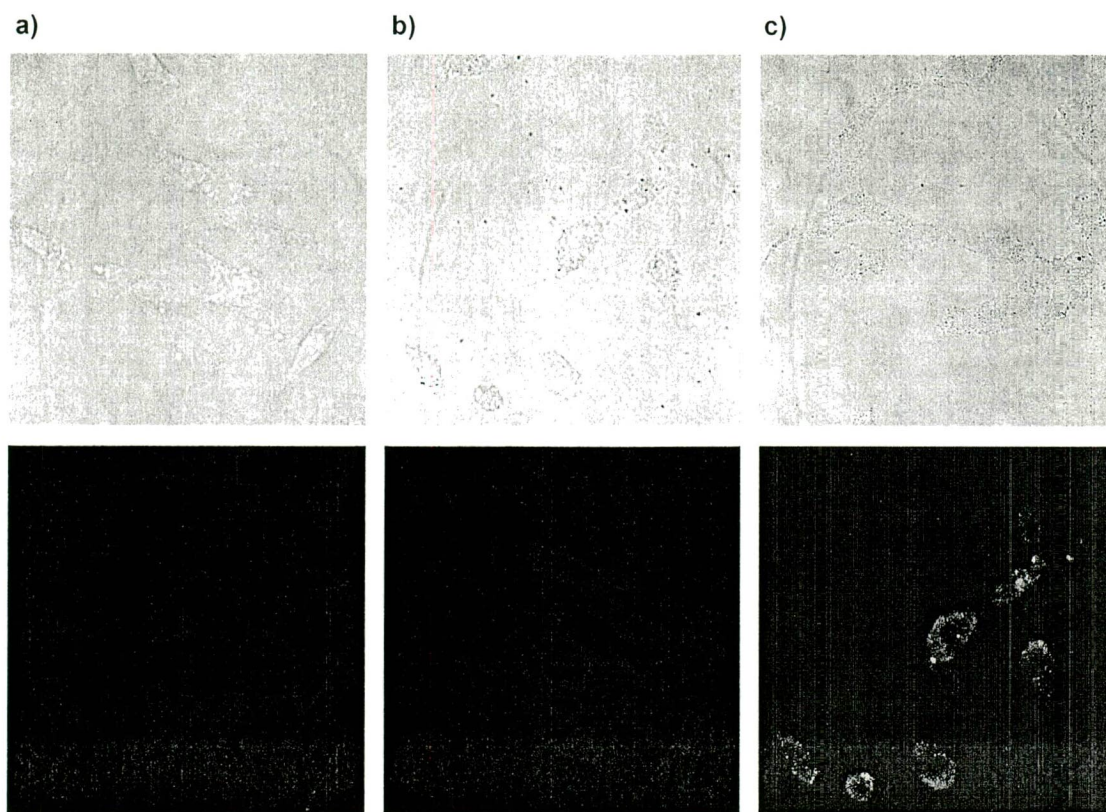


Figura 27. Estandarización de la transfección de siRNA-FITC en células Vero. Las células se transfectaron con un siRNA no relacionado conjugado a FITC [488 mM] y lipofectamina como reactivo de transfección. A las 6 horas de transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se prepararon para su análisis por microscopía confocal. **a)** células sin transfectar; **b)** células tratadas con lipofectamina y **c)** células transfectadas con siRNA-FITC. El panel superior corresponde a una imagen de campo claro y el inferior corresponde a la imagen de la fluorescencia emitida por la excitación con láser a una longitud de de 488 nm; ambas imágenes fueron obtenidas utilizando el objetivo 60X de un microscopio confocal Leica TCS SP2.

4. Transfección de siRNA en CDIs

Para la estandarización de la técnica, se emplearon diferentes concentraciones de reactivo de transfección y se observó que el empleo de 2 μ l de reactivo provee una eficiencia de aproximadamente 60% (figura 28). Sin embargo, al aumentar la cantidad de reactivo de transfección a 3 μ l, la eficiencia se incrementa a un 85% (figura 29), por lo que se eligió ésta condición para llevar a cabo los experimentos posteriores. Por otro lado, para mantener la viabilidad celular del cultivo de CDIs transfectadas, se probaron medios de transfección en ausencia o con diferentes porcentajes de suero durante el tiempo de transfección.

De estos experimentos resultó que el tratamiento que mantenía la viabilidad celular en un 80% fue utilizando una concentración de suero del 5% en el medio de transfección en presencia de GM-CSF e IL-4. La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de exclusión del colorante azul tripano.

Para llevar a cabo los ensayos de transfección en CDIs, se sembraron en una placa de 24 pozos aproximadamente 160,000 CDIs diferenciadas a partir de monocitos utilizando el tratamiento ya mencionado; posteriormente se llevó a cabo la transfección en presencia de medio RPMI sin suero con 488 mM de siRNA-FITC por 6 h. Sin retirar el medio de transfección, se agrega un volumen similar de medio RPMI con suero conteniendo GM-CSF e IL-4 a las concentraciones descritas. Este manejo de medios primero sin suero y luego con suero, fue el que mejores resultados nos dio en cuanto a eficiencia de transfección y viabilidad celular.

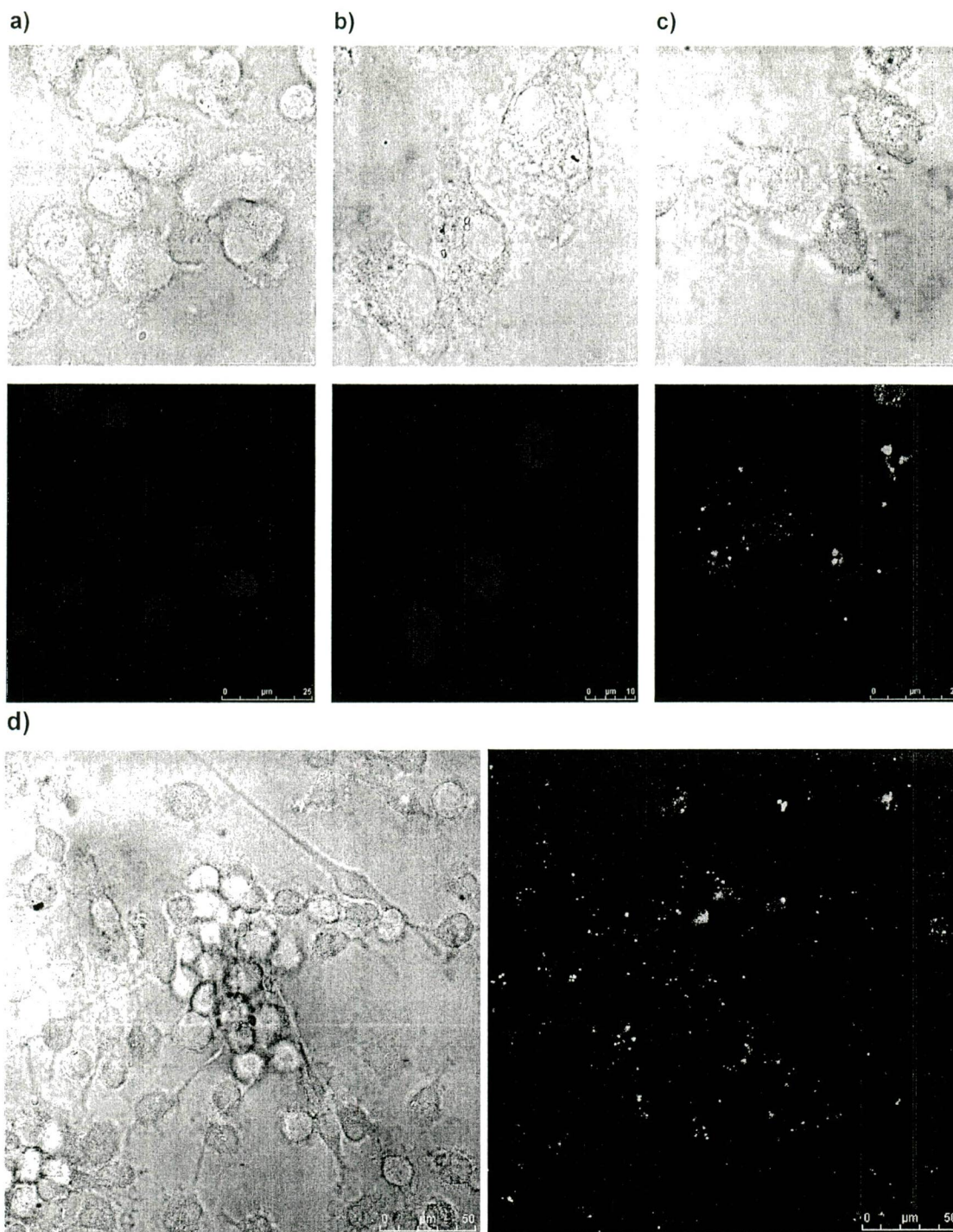


Figura 28. Estandarización de la transfección de siRNA-FITC en células dendríticas. Las células se transfectaron con un siRNA-FITC [488 mM] y 2 μ l de Dharmafect como reactivo de transfección. A las 6 horas de transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se prepararon para su análisis por microscopía confocal. **a)** células no tratadas; **b)** células tratadas con Dharmafect y **c)** células transfectadas con siRNA-FITC; **d)** la eficiencia de transfección se obtuvo a partir de un corte en el microscopio confocal se contó el número de células donde se observó y se obtuvo el porcentaje con respecto al número total de células. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

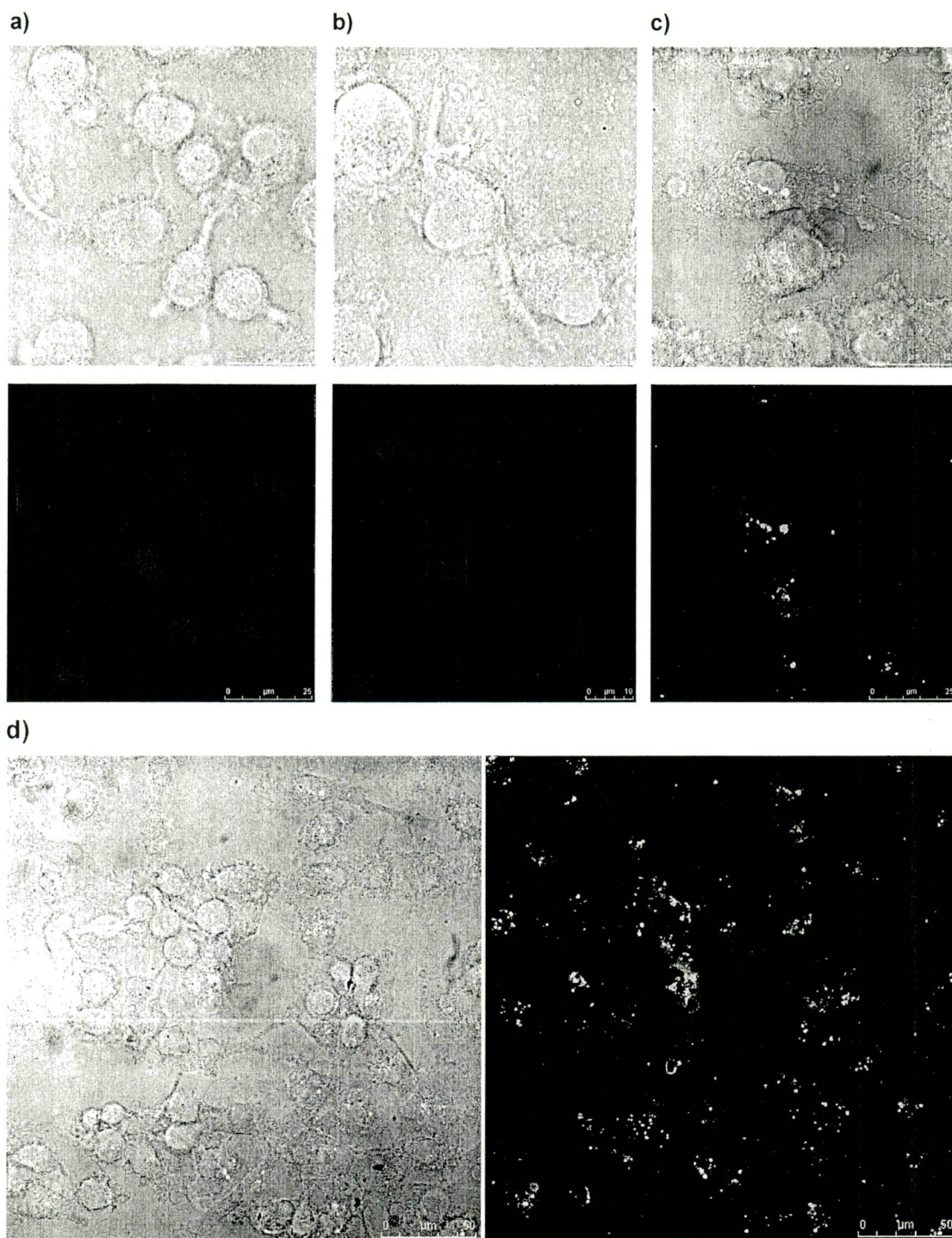


Figura 29. Incremento en la Eficiencia de transfección del siRNA en células dendríticas. Las células fueron transfectadas con un siRNA no relacionado conjugado a FITC [488 mM] y 3 μ l de Dharmafect como reactivo de transfección. A las 6 horas de transfección, las células se prepararon como antes señalado para su análisis por microscopía confocal. **a)** células no tratadas; **b)** células tratadas con Dharmafect y **c)** células transfectadas con siRNA no relacionado conjugado a FITC; **d)** la eficiencia de transfección se obtuvo como antes señalado.

5. Análisis de la expresión del TLR3 en condiciones basales

Los ensayos de silenciamiento del TLR3, tienen como propósito disminuir su expresión en CDIs; por lo que se requería realizar ensayos que permitieran la detección del TLR3 en estas células. Inicialmente se intentó detectar el TLR3 mediante ensayos de western blot, sin embargo, la banda obtenida siempre fue muy tenue, aún cuando las cantidades de extracto celular total fuesen altas, por lo que se optó por otra estrategia que nos permitiera la detección de manera más sensible y mediante la cual se pudiera cuantificar el nivel de expresión. Así, se utilizó la citometría de flujo, cuya sensibilidad nos permitió detectar y cuantificar la señal del TLR3 después de incubar las células con un anti-TLR3 (figura 30). Así mismo se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en donde también se pudo detectar al TLR3 (figura 31). Sin embargo la cuantificación mediante esta técnica es complicada. Por ello se eligió la citometría de flujo para determinar el nivel de expresión del TLR3 en las CDIs.

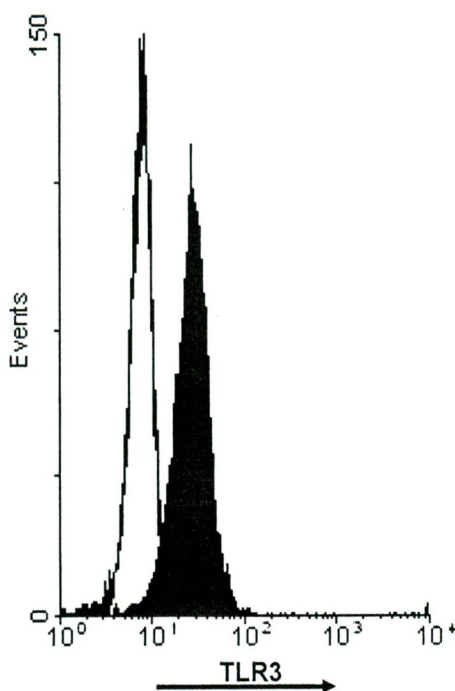


Figura 30. Análisis de la expresión del TLR3 por citometría de flujo. Las CDIs fueron incubadas con un anti-TLR3 y posteriormente tratadas con un anti-chivo conjugado a FITC. El gráfico sin fondo corresponde al control autofluorescencia, es decir células incubadas solo con el anticuerpo secundario; mientras que el gráfico con fondo corresponde a células incubadas con el anticuerpo primario y el secundario. En el eje "x", se graficó la expresión del TLR3 y en el eje "y" se representan el número de eventos.

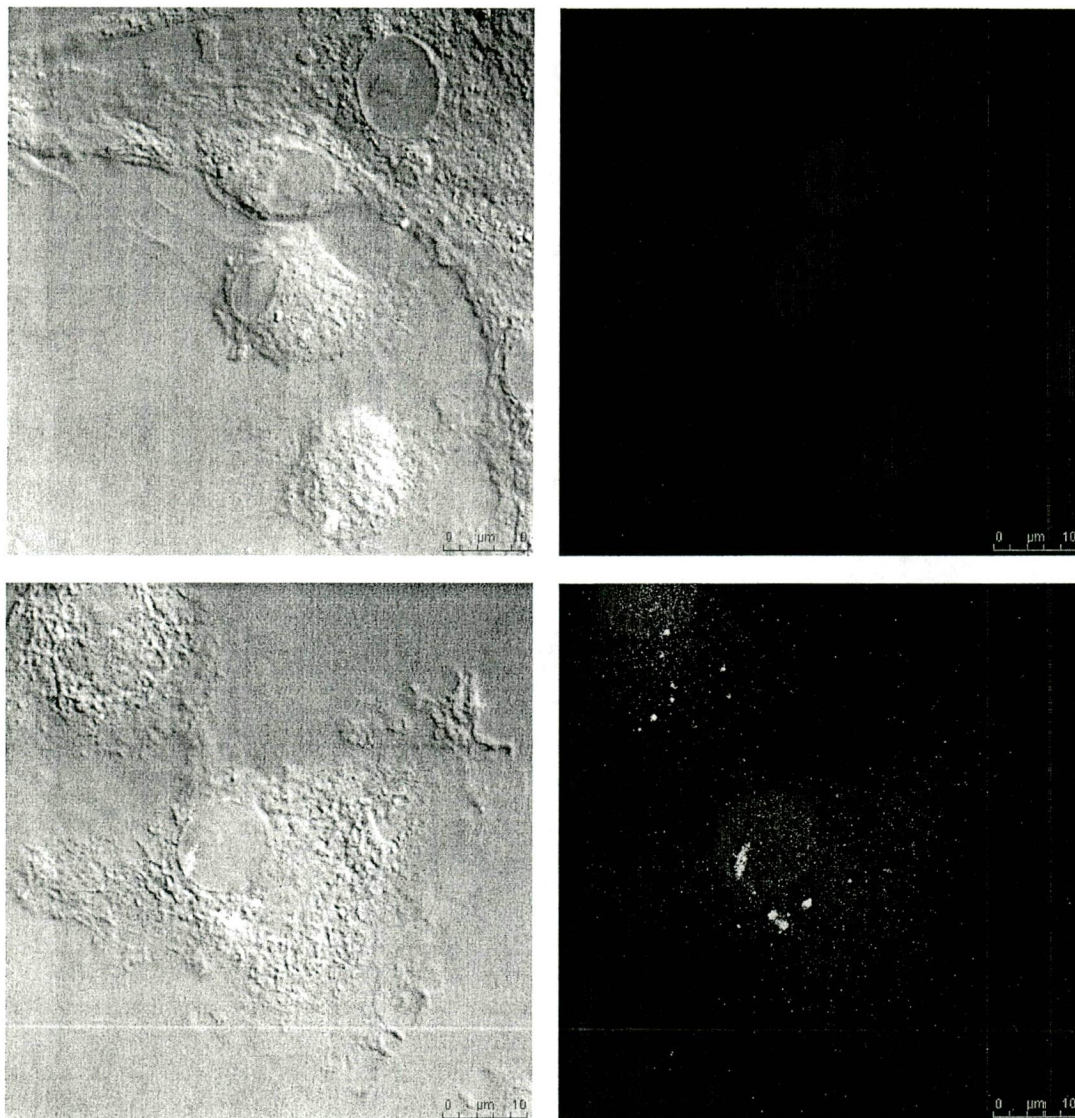


Figura 31. Análisis de la expresión del TLR3 por microscopia confocal. Las células dendríticas fueron incubadas con un anti-TLR3 y posteriormente tratadas con un anticuerpo anti-chivo conjugado a FITC. Los paneles superiores corresponden al control de autofluorescencia, es decir células incubadas solo con el anticuerpo secundario; mientras que los paneles inferiores corresponden a células incubadas con el anticuerpo primario y el secundario. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal Leica TCS SP2.

6. Silenciamiento del TLR3 en CDIs

Con la finalidad de inhibir la expresión del TLR3 mediante siRNA, se aplicaron las condiciones de transfección estandarizadas para CDIs, ya descritas anteriormente, con las que se probaron diferentes concentraciones de siRNA específico contra el TLR3. Se observó que empleando 10 nm de siRNA específico para TLR3 era suficiente para obtener un efecto en la inhibición de la expresión del TLR3, ya que a menores concentraciones no se obtenía el efecto deseado y a mayores concentraciones distinguía un efecto de toxicidad en el cultivo de. Después de 48 horas de transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 2%, se permeabilizaron y bloquearon para analizar la expresión del TLR3 por citometría de flujo. En las células tratadas con 10 n μ de siRNA específico contra el TLR3, se inhibió la expresión de la molécula (figura 32d) a diferencia de lo observado con el tratamiento de las CDIs con un siRNA no relacionado (figura 32c) ó tratadas solamente con el reactivo de transfección (figura 32b); así como con las células sin tratar (figura 32a). Para determinar el porcentaje de inhibición en la expresión del TLR3 en las CDIs, la intensidad de fluorescencia detectada en las células sin tratar se tomó como un 100% de expresión y a partir de este valor se determinó el porcentaje de expresión en las células tratadas tomando la intensidad de fluorescencia observada en cada uno de los histogramas asignada por el programa WinMDI 2.8. Aplicando esta herramienta, se obtuvo que en las células tratadas con el siRNA específico contra el TLR3, el porcentaje de inhibición de la expresión del TLR3 fue aproximadamente del 50% (figura 32 d).

Los ensayos de silenciamiento se repitieron en más de 3 ocasiones para demostrar que los resultados de inhibición de la expresión eran consistentes y que la viabilidad de las células tras el silenciamiento era mayor del 80%, lo cual fue demostrado por la exclusión del colorante azul tripano.

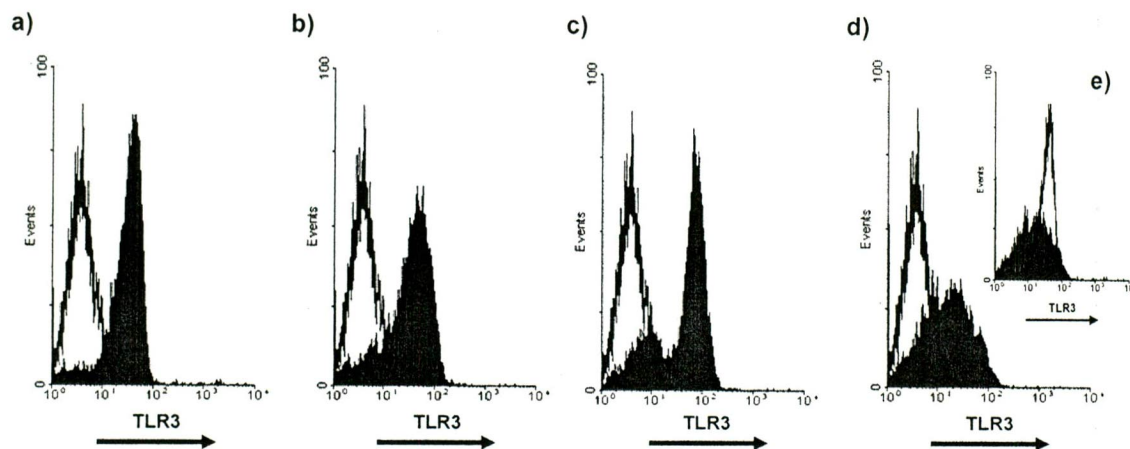


Figura 32. Expresión del TLR3 en CDIs silenciadas. Las CDIs fueron transfectadas con un siRNA para TLR3 y Dharmafect como reactivo de transfección. Después de 48 horas las células fueron fijadas, permeabilizadas y bloqueadas para analizar la expresión del TLR3 por citometría de flujo, incubando las células en ausencia (gráfico sin fondo excepto e) o en presencia de un anticuerpo anti-TLR3 (gráfico con fondo) y posteriormente con un anti-chivo conjugado a Alexa 555. **a)** células sin tratamiento; **b)** células tratadas con Dharmafect; **c)** células transfectadas con siRNA no relacionado; **d)** células transfectadas con siRNA para TLR3; **e)** comparación de la expresión del TLR3 en células sin tratamiento (gráfico sin fondo). En el eje "x" se graficó la expresión del TLR3 y en el eje "y" se representa el número de eventos.

7. Análisis por Plaqueo de la Eficiencia de la Infección por Dengue en CDIs Tratadas con siRNA para el TLR3

Con las condiciones ya establecidas de transfección y silenciamiento del TLR3 en las CDIs, se dio paso a la realización de los experimentos en los que se determine la función del TLR3 durante la infección por dengue. Para analizar la participación de esta proteína, se infectaron las CDIs con el virus DEN2, después del silenciamiento del TLR3. Como un primer paso se llevó a cabo una cinética de infección para elegir los tiempos, la MOI a la cual infectarían las células; y comparar la capacidad de infección de las CDIs con respecto a los macrófagos. Tanto las CDIs como los macrófagos se infectaron con el virus DEN2 a una MOI de 3, 5 y 7; y se tomaron alícuotas de los sobrenadantes de los cultivos infectados a las 24 y 36 h postinfección para determinar el título viral mediante ensayos de plaqueo en células BHK-21. Las CDIs son susceptibles a la infección, utilizando las MOI's analizadas y se observa un aumento en los virus producidos a las 36 h con respecto a las 24 h; también se observa un incremento en la cantidad de los virus producidos conforme aumenta la MOI, siendo la MOI de 7 en la que se detectó mayor cantidad de virus en ambos tiempos (figura 33).

En este experimento, también pudo observarse que las CDIs fueron marcadamente más susceptibles a la infección que los macrófagos (figura 33). Por lo tanto, para los siguientes ensayos en donde se determina la función del TLR3 durante la infección por dengue, se empleó una MOI de 5 y 36 h de infección, ya que con tales parámetros es posible la detección de los virus producidos por las CDIs. La MOI de 5 se eligió, ya que no existían grandes diferencias en la cantidad de virus producidos a las 36 h postinfección.

Para determinar la participación del TLR3 durante la infección de las CDIs por el virus del dengue, se llevó a cabo el silenciamiento del TLR3 en las CDIs, utilizando las condiciones ya mencionadas; 48 h posttransfección las células se infectaron con el virus del dengue a una MOI de 5 y se tomaron alícuotas del sobrenadante del cultivo a las 24 y 36 h postinfección; las cuales se utilizaron para realizar los ensayos de plaqueo en células BHK-21. Los resultados obtenidos en el ensayo de plaqueo, indican que las células tratadas para transfección no son susceptibles a la infección ó los sobrenadantes contienen elementos que inhiben la infección de las células BHK-21 en las que se realiza el plaqueo, por lo que no se puede evidenciar unidades formadoras de placas. Este comportamiento también se observó en las células tratadas con el siRNA no relacionado y en las células tratadas solo con el reactivo de transfección, en comparación a las células no tratadas, las cuales si fueron susceptibles a la infección (figura 34).

Cabe mencionar que se llevaron a cabo experimentos simultáneos en las que CDIs del mismo donador tratadas con el siRNA para el TLR3 y sus controles se sometieron a citometría de flujo en los que se comprobó el nivel de silenciamiento del TLR3 en las células tratadas con el siRNA para dicha molécula.

Los ensayos de plaqueo con los sobrenadantes de las células tratada con siRNA contra TLR3, las tratadas con siRNA no relacionado y las tratadas solo con el reactivo de transfección no presentaron formación de placas en células BHK-21 a diferencia de las encontradas con los sobrenadantes de las células sin tratamiento a las 36 h postinfección (figura 34).

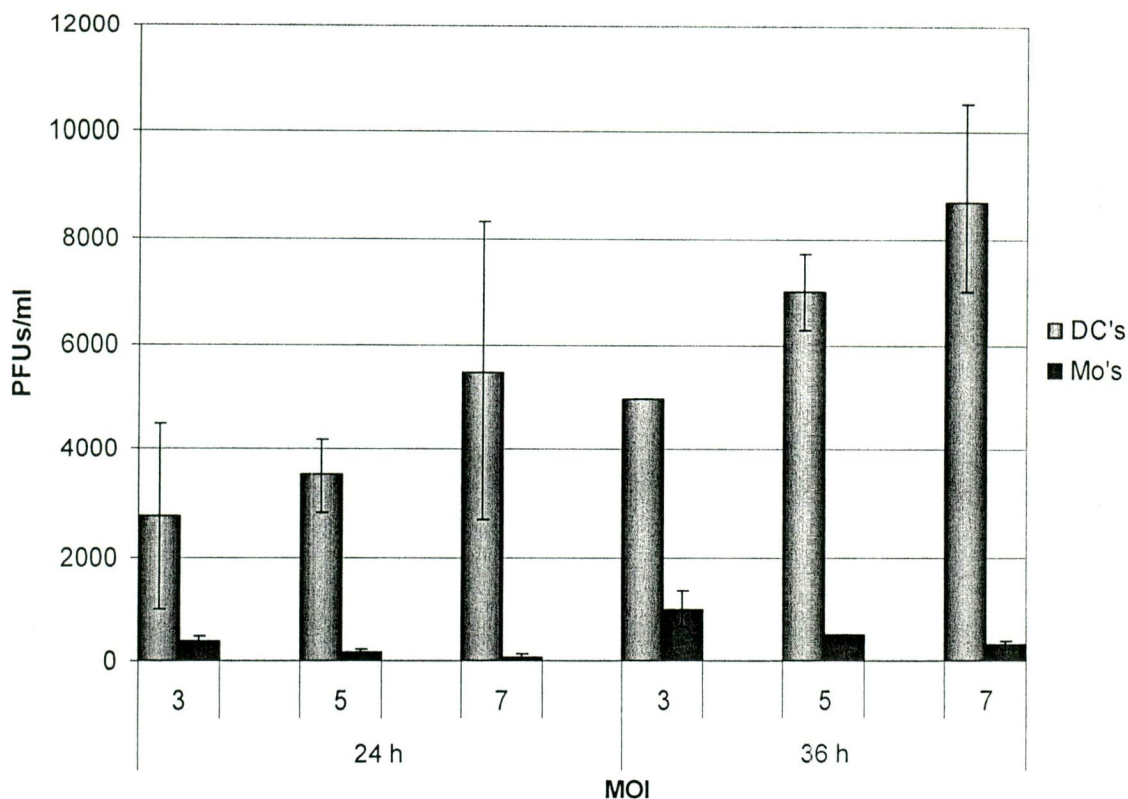


Figura 33. Cinética de infección en CDIs y macrófagos. Las CDIs y macrófagos (Mo's) fueron infectados con el virus DEN2 a una MOI de 3, 5 y 7. Se tomaron alícuotas de los cultivos infectados a las 24 y 36 h postinfección para determinar el título viral por medio de ensayos de plaqueo. En el eje "x" se graficó las diferentes MOI utilizadas durante 24 y 36 h de infección y en el eje "y" se representan las PFUs/ml.

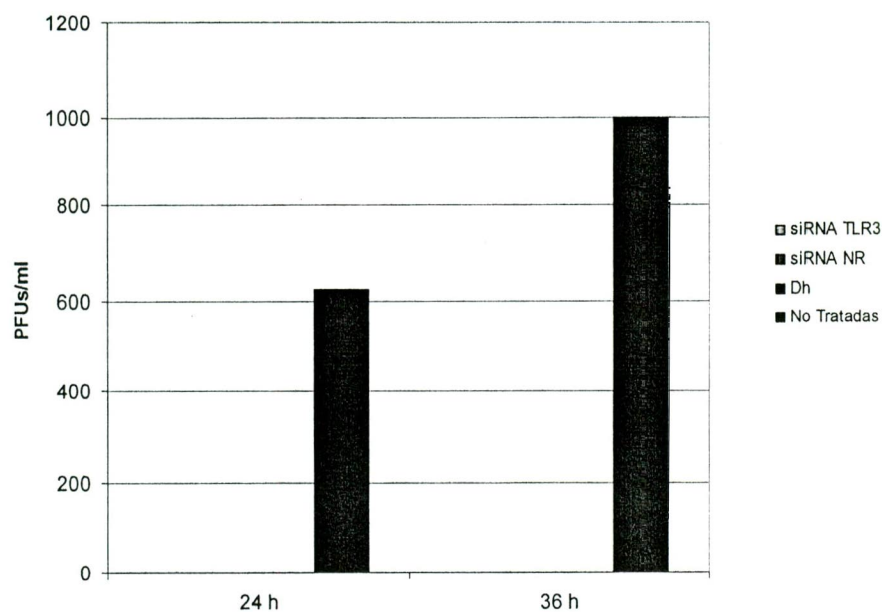


Figura 34. Ausencia de unidades formadoras de placas en CDIs tratadas para transfección. 48 h posttransfección, las CDIs se infectaron con el virus DEN2 a una MOI 5. Se tomaron alícuotas de los cultivos infectados a las 24 y 36 h postinfección para determinar el título viral por medio de ensayos de plaqueo.

8. Análisis de la Expresión de Marcadores de Maduración en las CDIs Tratadas con siRNA

Para analizar si el tratamiento de lipotransfección provoca la maduración de las CDIs y esto sea la causa de la ausencia de infección en éstas células, ya que las células dendríticas maduras son refractarias a la infección por dengue, se analizó en las CDIs tratadas con siRNA la expresión de los marcadores CD40, CD83 y CD86 reportados como marcadores de maduración en CDIs (Ho y cols., 2001; Matsumoto y cols., 2004; Re y Strominger, 2004; Douagi y cols., 2007). Después de 48 h de transfección las células se fijaron y se trataron con los anticuerpos contra CD40 (figura 35 a, b c y d), CD83 (figura 35 e, f, g y h) y CD86 (figura 35 i, j, k y l); y posteriormente con anticuerpos secundarios conjugados a FITC; las células se analizaron por citometría de flujo.

Como puede observarse en la figura 35, tanto en las CDIs no tratadas (a, e i), como en las tratadas solo con reactivo de transfección (b, f, j) y las tratadas con siRNA no relacionado (c, g, k) así como con siRNA contra TLR3 (d, h l) no hay expresión de estos marcadores de maduración; por lo tanto, la ausencia de unidades formadoras de placasen los ensayos de plaqueo, no se deben a que las células tratadas mediante lipotransfección se hayan diferenciado a células dendríticas maduras.

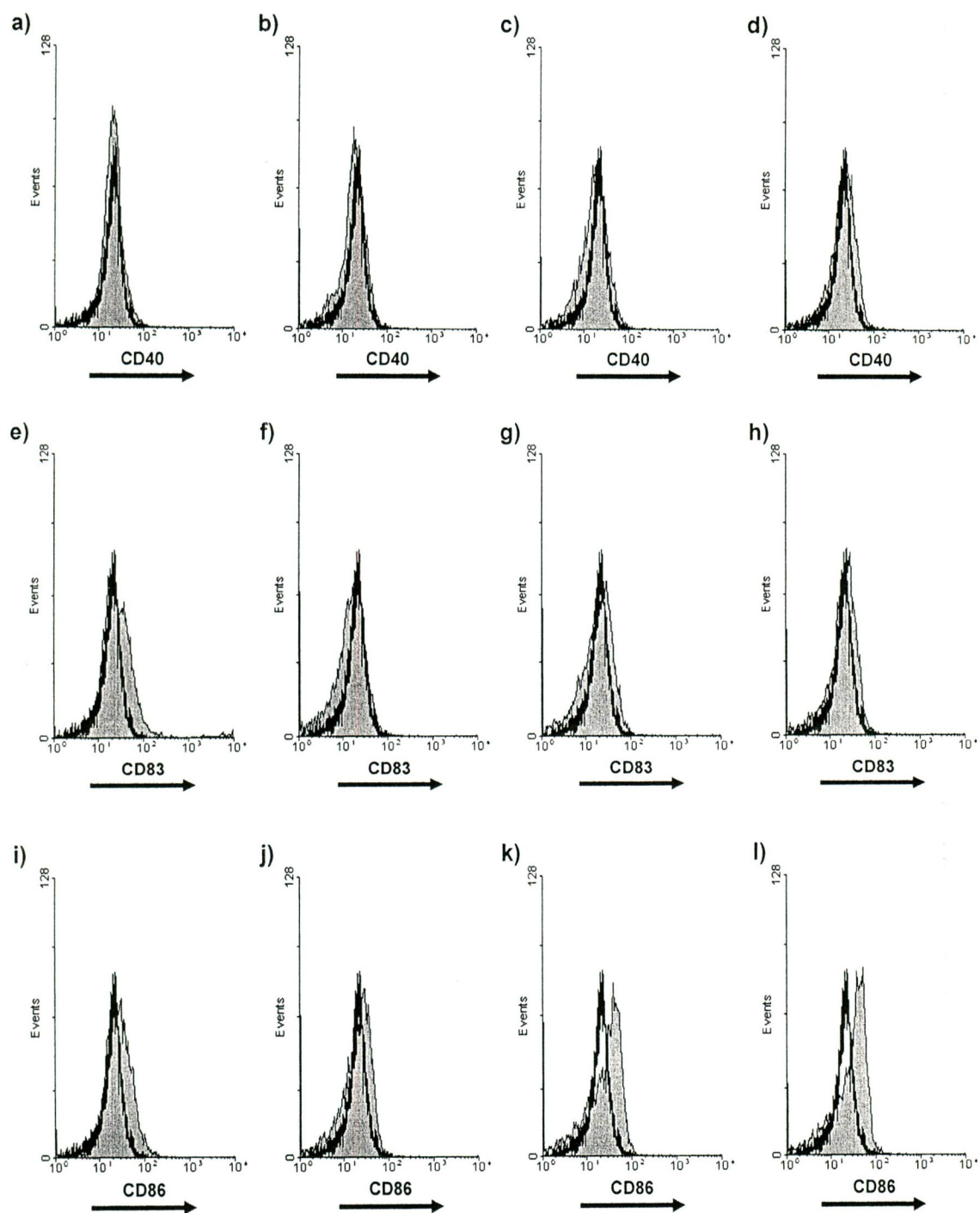


Figura 35. Análisis de la expresión de marcadores de maduración en las células dendríticas tratadas con siRNA. Después de 48 h de transfección, las CDIs tratadas con siRNA fueron fijadas con paraformaldehído al 2% y preparadas para analizar la expresión de marcadores de maduración CD40 (a-d), CD83 (e-h) y CD86 (i-l) por citometría de flujo. Las células se incubaron en ausencia (gráfico sin fondo) o en presencia del anticuerpo (gráfico con fondo) anti-CD40, anti-CD83 y anti-CD86 y posteriormente se incubaron con un anti-ratón conjugado a FITC. (a, e, i) células no tratadas; (b, f, j) células tratadas con el dharmafect; (c, g, k) células tratadas con un siRNA no relacionado; (d, h, l) células tratadas con siRNA contra TLR3. En el eje "x" se graficó la expresión del marcador de superficie y en el eje "y" se representa el número de eventos.

9. Análisis por Citometría de Flujo de la Eficiencia de la Infección por Dengue en CDIs Tratadas con siRNA para el TLR3

Después de corroborar que las células conservan su fenotipo de inmadurez, se optó por un método distinto al plaqueo para determinar la capacidad de infección en las células tratadas con siRNA. Así, se analizó la eficiencia de infección mediante la detección de la proteína E viral en las CDIs, para posteriormente realizar citometría de flujo. Para tal propósito, después de 48 h de transfección, las células se infectaron con el virus DEN2 y después de 24 h de infección se fijaron, se permeabilizaron, se bloquearon y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones probadas, las células tratadas con el siRNA contra el TLR3 (figura 36d), las tratadas con un siRNA no relacionado (figura 36c) y las tratadas con solo el reactivo de transfección (figura 36b) muestran una eficiencia de infección similar de 95%, 90% y 85% respectivamente; esto en comparación a la observada en las células sin tratamiento (figura 36a) que se considera como 100% de eficiencia en la infección. Cabe señalar que para obtener el valor de intensidad de fluorescencia con el que se obtuvieron los porcentajes de infección (con el programa WinMIDI), solo se tomó en cuenta a las células que fueron positivas a la infección y que están marcadas como M1 en los gráficos de la figura 36, donde esta región representa aproximadamente el 70% de la población total de células.

Con los resultados obtenidos, se establece que no hay diferencia significativa en la replicación viral, ya sea en la ausencia o presencia del TLR3 en CDIs con las condiciones ensayadas en el presente trabajo. Es importante recalcar que con el nivel de silenciamiento obtenido en este trabajo, se mantiene el 50% de la proteína disponible para las funciones que ésta desempeña, por lo tanto no es posible determinar si mayor nivel de silenciamiento defina algún efecto en la replicación del virus del dengue.

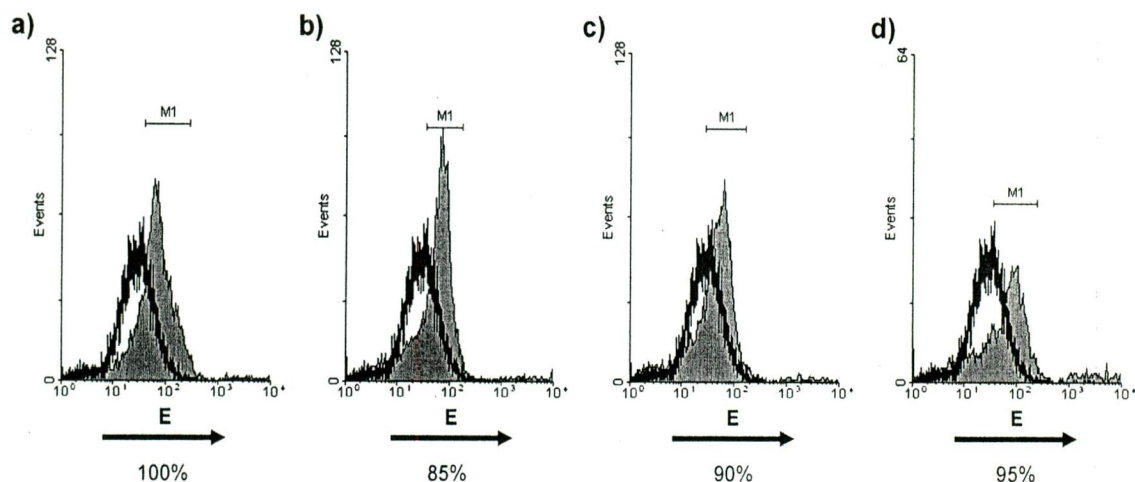


Figura 36. Eficiencia de infección en células dendríticas tratadas con siRNA para el TLR3. Las CDIs sin tratar (a), tratadas sólo con el reactivo de transfección (b), con siRNA no relacionado (c) o siRNA específico para TLR3 (d) se infectaron con el virus DEN2 a una MOI de 5. Después de 24 h de infección, las células se fijaron, se permeabilizaron, se bloquearon y por citometría de flujo se analizó la presencia de la proteína E viral. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-E y posteriormente se incubaron con un anticuerpo anti-ratón conjugado a FITC. MI (marca 1), indica la región de fluorescencia que representa las células que emiten fluorescencia y que representa aproximadamente el 70% de la población celular. El gráfico sin fondo corresponde al control de células sin infectar. En el eje "x" se graficó la presencia de la proteína E del virus y en el eje "y" se representa el número de eventos. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

10. Análisis de la Localización Celular del IRF3 en CDIs Tratadas con siRNA e Infectadas con el Virus del Dengue

Después de comprobar que la ausencia del TLR3 no tiene un efecto en la replicación del virus del dengue en CDIs, se analizó por inmunofluorescencia la localización celular del factor de transcripción IRF3 en las células tratadas con siRNA e infectadas con el virus DEN2. Para este fin, las CDIs se transfectaron con siRNA para inhibir la expresión del TLR3 y después de 48 h de transfección, las células se infectaron con el virus DEN2 y después de 24 h de infección se fijaron, se permeabilizaron, se bloquearon y se analizaron por microscopía confocal (figura 38). Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones probadas, las células tratadas con el siRNA contra el TLR3, las tratadas con un siRNA no relacionado, las tratadas con solo el reactivo de transfección y las no tratadas muestran una intensidad de fluorescencia similar en el núcleo y una intensidad similar en el citoplasma (figura 37). Cabe señalar que para cada condición ya mencionada, se tomaron campos representativos para tener un total de 30 células por condición, la intensidad de fluorescencia tanto en núcleo como en citoplasma se analizó mediante el programa "LAS AF lite" (Leica).

En base a esta metodología, se pudo determinar que en todas las condiciones señaladas siempre se mantuvo una presencia del IRF3 de alrededor del 55% en el núcleo y del 45% en citoplasma. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia en las células no tratadas ni infectadas, fue aproximadamente 1.6 veces mayor en comparación a las células infectadas no tratadas ó a las infectadas y a la vez tratadas mediante lipotransfección (figura 37). Por lo tanto, independientemente de que las CDIs se transfecten o no, la infección de las CDIs con el virus del dengue, provoca una menor expresión del IRF3 en la célula en comparación de las células no infectadas.

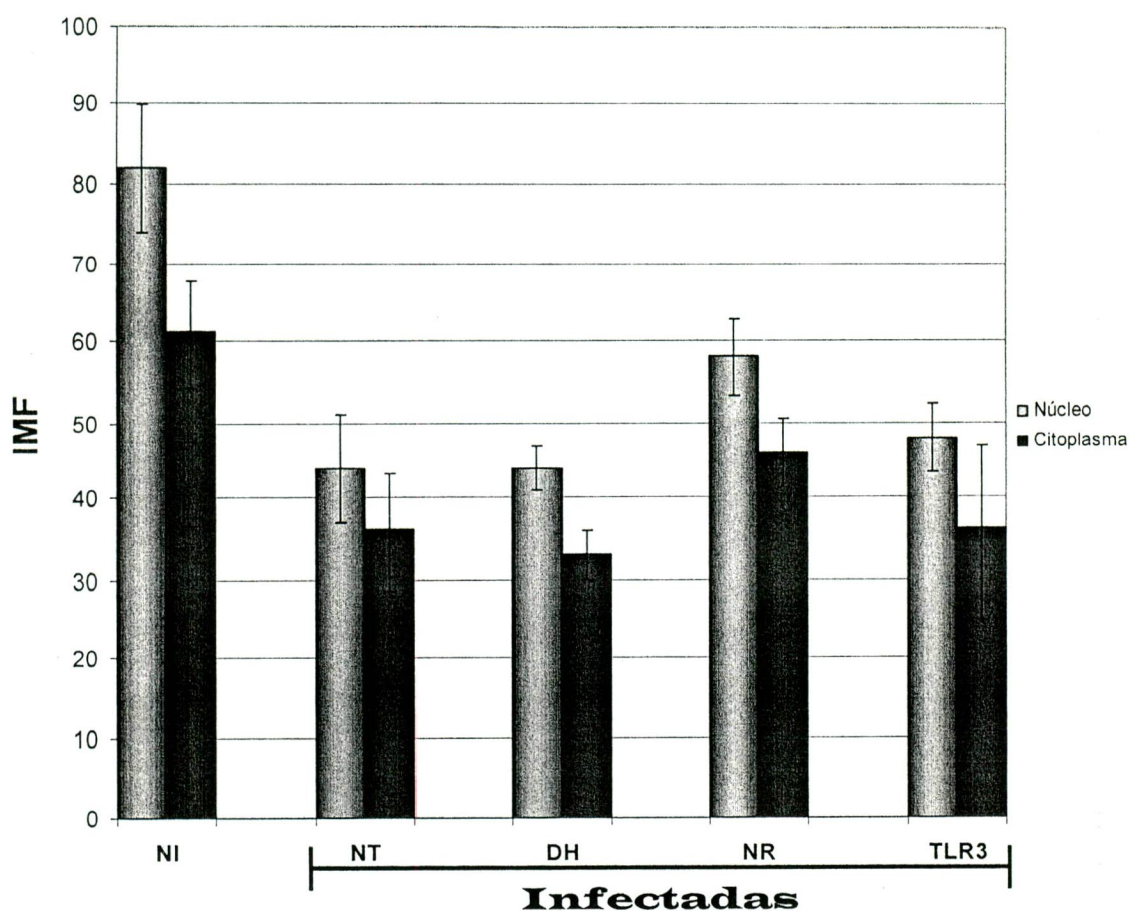


Figura 37. Análisis de la Intensidad de Fluorescencia Emitida por la Presencia del IRF3 en el Núcleo y en el Citoplasma en CDIs Transfectadas e Infectadas con el Virus del Dengue. Las CDIs sin tratar (NI y NT), tratadas sólo con el reactivo de transfección (DH), con siRNA no relacionado (NR) o siRNA específico para TLR3 (TLR3) se incubaron en ausencia (NI) o en presencia de DEN2 para infectar a una MOI de 5 (Infectadas). Después de 24 h de infección, las células se fijaron, se permeabilizaron, se bloquearon y por citometría de flujo se analizó la presencia de IRF3. La intensidad media de fluorescencia (IMF) del IRF3, tanto en núcleo como en citoplasma, obtenida para cada condición, se analizó por el programa "LAS AF lite". En el eje "x" se graficaron las diferentes condiciones de transfección e infección con el virus DEN2, y en el eje "y" se representan la IMF.

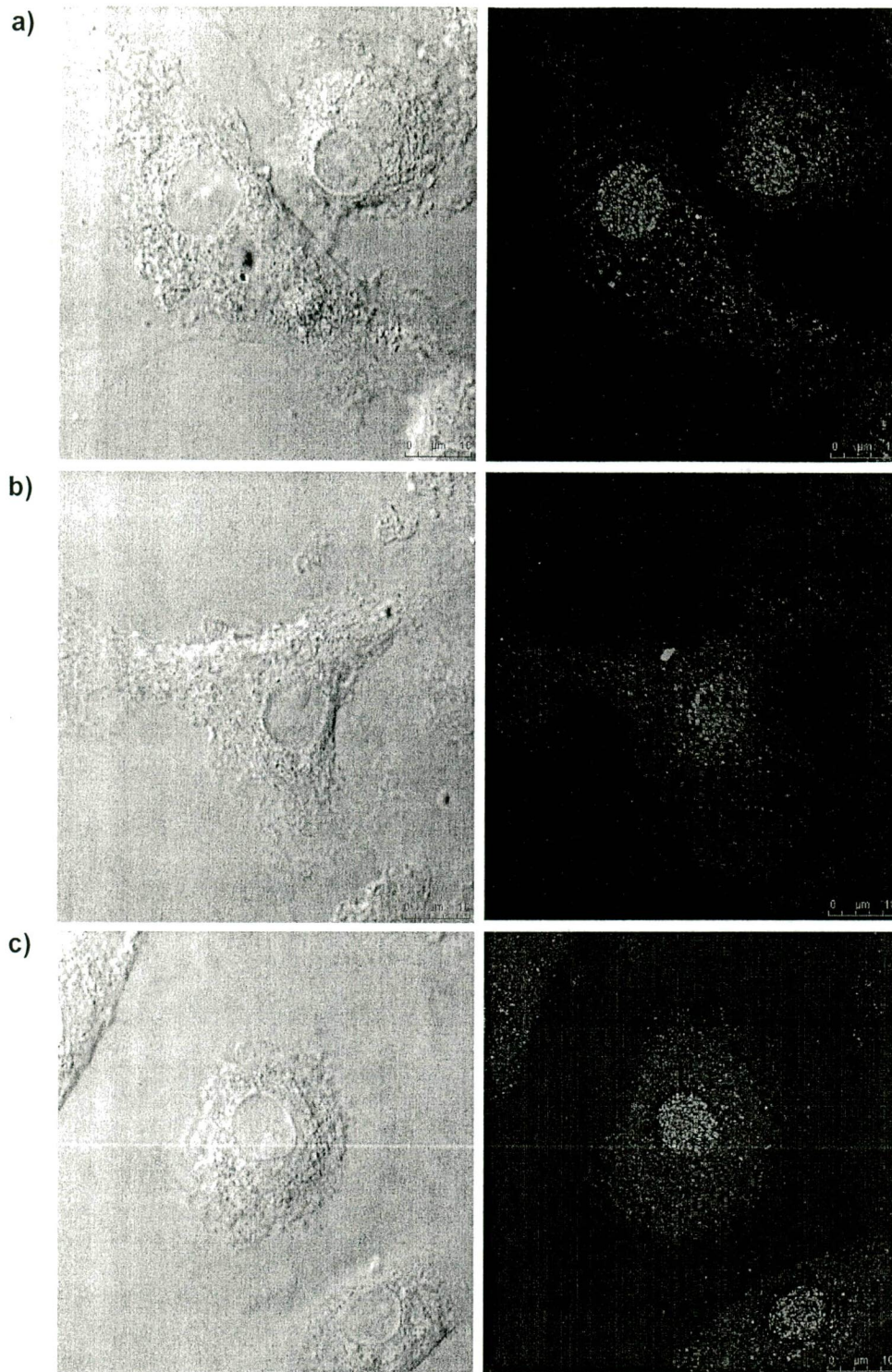


Figura 38. Análisis de la Localización Celular del IRF3 en las CDIs Transfectadas e Infectadas con el Virus del Dengue. Las CDIs sin tratar (a y b), tratadas con el siRNA específico para TLR3 (c) se incubaron en ausencia (a) o en presencia de DEN2 para infectar a una MOI de 5 (b y c). Después de 24 h de infección, las células se fijaron, se permeabilizaron, se bloquearon y posteriormente se incubaron con un anticuerpo anti-IRF3 y finalmente se incubaron con un anticuerpo anti-conejo conjugado a FITC y se analizaron por microscopía confocal. Para cada condición señalada, se tomaron campos representativos para tener un total de 30 células por condición, la intensidad de fluorescencia tanto en núcleo como en citoplasma se analizó mediante el programa "LAS AF lite" (Leica). Las imágenes mostradas son representativas de las condiciones señaladas en el texto.

DISCUSIÓN

El virus del dengue es agente causal de la fiebre del dengue y en los casos más severos de la enfermedad puede conducir al dengue hemorrágico y al síndrome de choque por dengue (Lei y cols., 2001). A pesar de que cada año a nivel mundial se reportan de entre 250 a 500 mil casos de dengue hemorrágico y de que la distribución geográfica de la enfermedad se ha incrementado (Gibbons y Vaughn, 2002; Rothman, 2004), en la actualidad no se cuenta con una vacuna o una terapia antiviral (Cologna y Rico-Hesse, 2003; Bente y cols., 2005).

Se ha propuesto que cuando el virus del dengue entra en el huésped humano, las primeras células que tienen contacto con el virus y que por lo tanto se convierten en blancos naturales son las células dendríticas derivadas de monocitos y las células de Langerhans (Cologna y Rico-Hesse, 2003). De estas las células dendríticas inmaduras son una de las células blanco más importantes, estas cuentan con un gran repertorio de TLRs que les permite reconocer patrones moleculares asociados a patógenos; por ejemplo, el TLR3 que es capaz de reconocer dsRNA de origen viral (Muzio y cols., 2000). Sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado que el TLR3 sea capaz de reconocer el dsRNA del virus del dengue, el cual es su intermediario replicativo. Siendo las células dendríticas esenciales para el establecimiento de un estado antiviral en el organismo y un blanco natural para la infección por el virus del dengue, éstas pueden utilizarse como un modelo de estudio de la infección por dengue en humanos. Por lo que en el presente trabajo se analizó la participación del TLR3 en las CDIs durante la infección por el virus del dengue.

Cuando las células dendríticas en un estado inmaduro entran en contacto con algún virus, se activan y expresan moléculas coestimuladoras y MHC indicando un estado de madurez, en este estado dejan de expresar moléculas de adhesión lo que les permite viajar a través del torrente sanguíneo para alcanzar los nódulos linfoides donde presentan los antígenos virales a los linfocitos T. Debido a este contacto con los linfocitos T, se ha propuesto que la infección de las células dendríticas por el virus del dengue es un paso crucial en el establecimiento de la infección en el organismo (Navarro-Sánchez y cols., 2003).

Por lo anterior entre otras razones se eligió a las CDIs como un modelo de estudio para la infección por dengue en humanos. Para estandarizar el cultivo de CDIs, obtuvimos monocitos a partir de sangre periférica de donadores sanos. Probando diferentes concentraciones de citocinas, se logró determinar que la concentración de citocinas que funciona mejor en nuestro trabajo para la diferenciación de monocitos a dendríticas es de 300 U/ml de GM-CSF y de 150 U/ml de IL-4, estas concentraciones son similares a las reportadas por Matsumoto y cols. (2003) utilizando el mismo kit comercial. Los monocitos purificados y estimulados con las citocinas durante 10 días para su diferenciación a CDIs, se caracterizaron mediante el análisis de la expresión de marcadores de superficie CD11c y CD1a, donde éste último se considera como un marcador de diferenciación y cuya expresión se relaciona a su vez con la pérdida del marcador CD14, el cual es un marcador característico de los monocitos y macrófagos los cuales además, no expresan el marcador CD1a [Cuellar y cols. (2004); Ho y cols. (2001 y 2005)].

Otra característica fenotípica de las CDIs es su baja adherencia, lo que observamos en nuestros cultivos y fue similar a otros reportes (Santini y cols., 2000; Wöfl y cols., 2002; Michiels y cols., 2005 y Ramakrishna y cols., 2007); sin embargo existen otros reportes (Sánchez-Torres y cols., 2001) en los que se trabaja con células dendríticas no adherentes, en éstos la baja o nula adherencia puede deberse a diferencias en los protocolos de diferenciación; como por ejemplo la concentración de citocinas, tiempo de tratamiento y el origen mismo de las células dendríticas; ya que también pueden derivarse de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ de la médula ósea ó de sangre de cordón umbilical, ó que se deriven de las células de humano o de ratón (Kwan y col., 2005; Yi y Kwak, 2005; Wu y Liu, 2007). Otros protocolos como los de Santini y cols. (2000), utilizaron IFN y GM-CSF en lugar de IL-4 y GM-CSF para la obtención de las células dendríticas, solo que en un estado de madurez; y en el trabajo de Aksoy y cols. (2005) para la obtención de las células dendríticas, utilizaron los sobrenadantes de la línea celular J558-GM-CSF, la cual secreta el GM-CSF.

Nuestro protocolo de diferenciación nos permitió obtener un cultivo homogéneo de alrededor del 90% las cuales fueron susceptibles a la infección por dengue a las MOIs probadas desde 3 a 7 y se observó que podían infectarse de mejor manera que los macrófagos, lo que concuerda con lo reportado por Cologna y Rico-Hesse (2003).

Una característica esencial de estas CDIs es la expresión del TLR3, que junto con las células Natural Killer y las células dendríticas mieloides son los únicos tipos celulares dentro de la población de células mononucleares que expresan ésta proteína (Muzio y cols., 2000; Kadowaki y cols., 2001; Matsumoto y cols., 2003; Schröder y Bowie, 2005; Bell y cols., 2006). Sin embargo, su expresión es baja y su localización es en los endosomas, lo cual se determinó mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo (Matsumoto y cols., 2003; Hewson y cols., 2005; Nishiya y cols., 2005). Las técnicas como el western blot son poco recomendables para la detección de ésta molécula, ya que se requeriría de por lo menos 45 millones de células para trabajar con la fracción mitocondrial y lisosomal donde se encuentra la proteína (Matsumoto y cols., 2003). Por lo que la detección de dicha proteína en los ensayos de western blot en extractos totales de CCIs fue muy pobre.

El TLR3 es un receptor de reconocimiento de patrones que reconoce el dsRNA sintético poly (I:C); por ello se ha propuesto que puede desempeñar una función al reconocer el dsRNA que forma parte del genoma de algunos virus o que se forma durante su proceso de replicación (Alexopoulou y cols., 2001; Matsumoto y cols., 2004; Okahira y cols., 2005; Schröder y Bowie, 2005; Bell y cols., 2006; Sasai y cols., 2006). El papel de esta proteína se ha demostrado durante la infección de las células epiteliales bronquiales por rinovirus; en este trabajo, Hewson y cols. (2005) analizaron la participación del TLR3 que se expresa en la superficie celular, en donde se bloqueó su función mediante anticuerpos; en este trabajo se demostró que la infección incrementa la producción de citocinas así al bloquear TLR3 se aumenta la replicación viral, demostrando así su función en restringir la replicación viral; sin embargo el incremento en la producción de citocinas solo podía deberse a la participación de una vía independiente de TLR3.

Con el virus West Nile perteneciente al género flavivirus, se demostró la participación del TLR3 en la infección por este virus. En el trabajo de Wang y cols. (2006), utilizando ratones knock-out para TLR3, se observó que a nivel sistémico presentaban más susceptibilidad a la infección pero más resistencia a la encefalitis provocada por el virus, mientras que la presencia del TLR3, condujo a la encefalitis y muerte de los ratones infectados por el virus West Nile; sugiriendo que el virus se beneficia por la presencia de la proteína, ya que permite penetrar la barrera hemato cerebral y así infectar el cerebro.

En otro trabajo en el que se investigó el papel del TLR3 en la respuesta inmune a la infección con helmintos, Aksoy y cols. (2005) reportaron la activación de las células dendríticas al ser expuestas a los huevecillos de helmintos, esto ocurrió porque el dsRNA presente en estos huevecillos pudo ser reconocido por el TLR3, lo cual condujo a la activación de NF- κ B e IRF3 que a su vez condujo a la expresión del IFN.

Para determinar la participación del TLR3 durante la infección por el virus del dengue, se utilizaron siRNAs para inhibir la expresión del TLR3 en CDIs. Cabe mencionar que la estandarización de la técnica de transfección es un logro importante, ya que como herramienta será muy útil en futuros proyectos. También se debe hacer notar que existen muy pocos artículos en los que se haya reportado transfección de siRNA en CDIs. Por ejemplo, en el trabajo de Stewart y cols., (2003), en el que se pone de manifiesto lo refractarios que son los cultivos primarios a la transfección, emplearon vectores lentivirales que expresaban shRNAs como una estrategia para lograr la transfección en células dendríticas. En nuestro sistema, se logró obtener una eficiencia de transfección de aproximadamente 85% con una viabilidad de alrededor del 85%; y los resultados en la inhibición en la expresión del TLR3 fueron de alrededor del 50%. Aunque se hubiese deseado un porcentaje de inhibición mayor; este porcentaje de silenciamiento se ha tomado como bueno para investigar la función de diversas moléculas por otros grupos (Stewart y cols. 2003).

Entre las razones a las cuales podría deberse este resultado, es la vida media del mRNA que codifica para el TLR3 y la vida media de la proteína que es muy larga; sin embargo como se señala en los trabajos de Matsumoto y cols. (2003 y 2004) tanto el GM-CSF como la IL-4 utilizados para la diferenciación de las células, también inducen la expresión del TLR3 y de otras proteínas como lo reporta Arrighi y cols. (2004). Por estas razones, el uso de las citocinas en la diferenciación podría interferir con el protocolo de silenciamiento. Aún así, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Stewart y cols. (2003), en donde utilizando vectores lentivirales para la expresión de shRNAs en células dendríticas logran inhibir la expresión de la GFP en un 50%. En otro trabajo donde utilizan los vectores lentivirales que expresan shRNAs es en el de Arrigí y cols. (2004), donde inhiben la expresión de DC-SIGN en un 90% en líneas celulares pero esta efectividad en el silenciamiento disminuye drásticamente cuando trabajaron con células dendríticas. Sin embargo, en el trabajo de Hill y cols. (2003) utilizaron siRNA y posteriormente LPS y TNF- α para activar a las células dendríticas, lograron inhibir la expresión de IL-12 hasta en un 85-90% en éstas células. Cabe señalar que en estos trabajos se utilizaron células dendríticas derivadas a partir de progenitores hematopoyéticos y nosotros preferimos utilizar células dendríticas derivadas de monocitos, porque como ya se ha mencionado, son un blanco natural del virus del dengue (Cologna y Rico-Hesse, 2003); sin embargo, por el uso de las citocinas, es difícil inhibir la expresión de las proteínas en éstas células Arrighi y cols. (2004).

Posterior a la inhibición de la expresión del TLR3 mediante siRNA, se llevó a cabo la infección de las CDIs con el virus del dengue, para analizar la función de la proteína determinando la eficiencia de infección del virus. Los resultados obtenidos de los ensayos de plaqueo a partir de los sobrenadantes de las CDIs tratadas mediante el protocolo de silenciamiento, mostraron que los sobrenadantes de las células tratadas por lipotransfección no eran capaces de formar placas. Lo que podría significar que las células tratadas aún solo con el reactivo de transfección se vuelven refractarias a la infección o que los

sobrenadantes contienen moléculas que evitan la infección del virus a las células donde realizan los ensayos de plaqueo.

De acuerdo con esta idea, se ha demostrado por Sledz y cols. (2003) que los siRNAs de 21 pb provocan la inducción de IFN- β . También en el trabajo de Bridge y cols. (2003), se reportó que los vectores plasmídicos y lentivirales que expresan shRNAs, pueden inducir a la 2'-5'-oligoadenilato sintasa, un gen blanco del IFN. Sin embargo, Karikó y cols. (2004) demostraron que tanto el siRNA como el shRNA inducen la producción de IFNs de tipo 1 a través del TLR3 y que se inhibe la expresión de mRNA independientemente de la secuencia del siRNA en células dendríticas derivadas de monocitos.

La activación y maduración de las CDIs a células dendríticas maduras podría darse por el tratamiento de lipotransfección, por lo que se analizó la expresión de los marcadores de maduración CD40 y CD86 y el marcador de activación CD83. Los resultados de citometría de flujo muestran que las células tratadas con siRNA no expresan estos marcadores de maduración y activación, los cuales, debieran expresarse en la superficie de las células dendríticas maduras, estos resultados concuerdan con lo que reportan Hill y cols. (2003), quienes no observaron la maduración en las células dendríticas tratadas con siRNA. Así se comprobó que las CDIs no sufrían maduración por el tratamiento de silenciamiento y por lo tanto, esa no era razón por la cual, la infección con las células tratadas no producían placas en células BHK21.

Por lo anterior, se requería de una estrategia alternativa para definir si las CDIs en las que se inhibe la expresión del TLR3 y sus controles podían infectarse con el virus del dengue ó si las células sufrían cambios suficientes por el tratamiento de transfección que ya no eran capaces de infectarse. Para tal propósito, se utilizó la citometría de flujo para la detección de la proteína E del virus en el interior de las células después del silenciamiento e infección.

Con dicho ensayo se demostró que las células con el tratamiento de transfección, tanto con el siRNA específico como con sus controles, eran capaces de infectarse con el virus del dengue denotado por la detección de la proteína E en la células, sin embargo; los porcentajes de infección determinados por esta

metodología fueron similares en las células tratadas por lipotransfección, los cuales oscilan entre 85 y 95% con respecto a las células no tratadas.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que el hecho de tratar a las células para el ensayo de lipotransfección produjo una leve disminución en la capacidad de infección de las CDIs, sin embargo son capaces de infectarse.

Así, el no encontrar diferencias significativas en cuanto a la infección de las células donde se redujo la expresión del TLR3 con respecto a los controles de transfección, puede deberse a que en el protocolo de silenciamiento solo se pudo inhibir la expresión del TLR3 en un 50%, quedando un 50% de proteína que continúa ejerciendo sus funciones. No obstante, los resultados también pueden deberse a que ésta proteína no participa o su participación no es indispensable para el reconocimiento del dsRNA del virus del dengue y así producir una respuesta antiviral. Todo lo anterior apoyaría la idea de que el silenciamiento parcial del TLR3 logrado en las CDIs no tiene ninguna implicación en la infección por el virus del dengue, no obstante no se descarta que al alcanzar un mayor nivel de silenciamiento, se obtengan evidencias de la participación de esta proteína en la replicación viral.

Apoyando esta idea, se encontraron en la literatura otros trabajos donde se ha analizado la participación del TLR3 durante las infecciones virales como el de Elco y cols (2005), que al infectar líneas celulares carentes del TLR3 con Sendai virus, no encontraron diferencias en cuanto a la inducción de genes estimulados por IFN en presencia o ausencia del TLR3. En el trabajo de Edelman y cols. (2004), utilizando el virus de la coriomeningitis linfocitaria, el virus de la estomatitis vesicular, el citomegalovirus murino y reovirus, encontraron que no se requiere del TLR3, para la generación de una respuesta antiviral efectiva, ya que en su ausencia, no se altera la patogénesis viral, ni deteriora la generación de una respuesta antiviral del hospedero a estos virus.

La explicación que dan los autores a estos resultados, es que posiblemente el TLR3 no entra en contacto con el dsRNA de estos virus, debido a que la concentración de dsRNA no es suficiente para inducir la vía de señalización a

través del TLR3; sugiriendo que la única manera en que TLR3 puede entrar en contacto con el dsRNA es a través de la endocitosis de éstas moléculas.

Schröder y Bowie, (2005), sugieren que la participación del TLR3 durante las infecciones virales dependerá entre otros factores de la ruta de entrada del virus, ya sea a través de los endosomas ó la membrana plasmática; de la localización del dsRNA en la célula, ya sea como parte del genoma o como un intermediario de replicación y de la abundancia de éste último producido durante el ciclo de replicación.

Además en estudios "in vitro" con TLR3 se demostró que se requieren concentraciones altas del agonista [poly (I:C)] para provocar una respuesta a través de este TLR (Edelman y cols. (2004). Por lo que se ha sugerido que el reconocimiento del dsRNA por el TLR3, sería cuando las células al experimentar la lisis, liberan estas moléculas de dsRNA que luego son endocitadas por las células dendríticas (Alexopoulou y cols., 2001; Boehme y Compton, 2004; Matsumoto y cols., 2004; Okahira y cols., 2005; Schröder y Bowie, 2005; Sasai y cols., 2006) recordando que en los endosomas de éstas células se expresa el TLR3 (Matsumoto y cols., 2003). Como se demostró en el trabajo de (Nishiya y cols., 2005) el TLR3 se encuentra en los mismos compartimientos intracelulares, que contienen células apoptóticas infectadas y que han sido endocitadas, donde el TLR3 puede acceder a su ligando.

Por otro lado, existen evidencias de su participación en la infección con otros virus en trabajos como los de Tabeta y cols. (2004) donde se demuestra que el TLR3 es esencial como mecanismo de la defensa inmune innata contra el citomegalovirus murino. También Rudd y cols. (2005) demostraron que el TLR3 tiene una función en la expresión de citocinas inducidas por el virus sincitial respiratorio; Hardarson y cols. (2007), reportaron que la infección con el virus de la encefalomiocarditis conduce a una respuesta inmune innata dependiente de TLR3, la cual brinda una protección contra el daño al miocardio inducido por el virus; y en el trabajo de Guillot y cols. (2005), que reportan la participación del TLR3 en la respuesta inmune de las células epiteliales del pulmón contra el virus influenza A.

Sin embargo, este último grupo de investigación también encontró evidencias de que la participación del TLR3 es al parecer patológica para el organismo y no tiene función benéfica, ya que en el trabajo de Le Goffic y cols. (2006), se demostró que la infección por el virus influenza A provoca una respuesta inflamatoria perjudicial inducida a través del TLR3, ya que ratones knock-out para esta proteína tienen una mayor sobrevivencia; y en el trabajo de Gowen y cols. (2006), se reportó que el TLR3 contribuye a la patogénesis del virus toro punta, pues ratones knock-out para esta proteína incrementaron su resistencia a la infección letal.

En cuanto al virus del dengue, debe recordarse también que uno de sus mecanismos de evasión a la respuesta del hospedero, es la formación de estructuras membranosas llamadas paquetes vesiculares que protegen el genoma del virus de las defensas del hospedero, tales como la PKR, la RNasa L, así como el iRNA (Uchil y Satchidanandam, 2003); tal vez este mecanismo protege su RNA de las funciones de reconocimiento del TLR3.

No obstante, debido a que el TLR3 no es una proteína involucrada tanto en la entrada del virus como en los procesos de replicación ó traducción, tomando en cuenta la gran susceptibilidad de las CDIs a la infección por dengue, tal vez la ausencia del TLR3 no tiene implicación alguna en la acumulación de la carga viral en la célula, pero sí podría tener alguna implicación en su entorno celular; es decir, podría a través de la producción de citocinas tener una participación en prevenir la infección en células vecinas; por lo tanto es necesario medir la respuesta, es decir la producción de citocinas.

Con respecto a los resultados obtenidos de la localización del IRF3 en las CDIs tratadas para el silenciamiento del TLR3 e infectadas, en relación con las células no tratadas e infectadas, se esperaban diferencias en la localización de esta molécula, pues en las células no tratadas e infectadas se predecía que tuvieran señal principalmente nuclear mientras que en la tratadas e infectadas ésta debía ser menor en el núcleo por la inhibición de la señalización mediante TLR3.

Sin embargo, resultó que en ambas condiciones el porcentaje de señal en el citoplasma fue del 45% y en el núcleo 55% y la intensidad de fluorescencia, que refleja el nivel de expresión de la proteína, fue similar.

También se analizó la localización del IRF3 en las células sin infectar y se determinó el mismo porcentaje de localización que en las células infectadas, pero cuando se comparó su intensidad de fluorescencia con las células infectadas se observó que las no infectadas mostraban 1.6 veces la intensidad detectada en las infectadas, sugiriendo que la infección por el virus del dengue promueve en las CDIs la inhibición en la expresión del IRF3. Por lo que en este caso el mecanismo que podría estar utilizando el virus para evadir la respuesta inmune no se relacionaría con la relocalización, sino con el nivel de expresión de dicha proteína.

Este resultado contrasta con lo obtenido por Fredericksen y cols. (2004 y 2006), donde analizando también por inmunofluorescencia la localización del IRF3, observaron con claridad que éste se translocaba al núcleo tras la infección con el WNV. Es importante mencionar que lo anterior se detectó en la línea celular Huh7, U-2OS y A549, en cambio en nuestro caso es un cultivo primario de células del sistema inmune.

El hecho de que en las células sin infectar y sin tratar, el IRF3 se encuentre principalmente nuclear puede deberse a que las células deben estimularse con citocinas para su diferenciación a CDIs y esto induzca la activación de algunas vías de señalización que promuevan la relocalización de dicha molécula además de conducir a la expresión y secreción de citocinas como IFN α/β , CXCL9, CXCL10 y CCL5 (Akira y cols., 2006; Honda y cols., 2005 y 2006; Sasai y cols., 2006).

CONCLUSIONES

Las células dendríticas inmaduras (CDIs) son un modelo muy interesante en el estudio de la infección por el virus del dengue en el humano, de ahí que en el presente proyecto se estandarizó el aislamiento, purificación y diferenciación de dichas células a partir de monocitos de sangre periférica.

El estudio de las interacciones funcionales del virus con las CDIs permitirán desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y de vacunación por lo que en este estudio se estandarizó la técnica de transfección de siRNAs en CDIs, lo que consideramos un logro importante por la dificultad que tiene el transfectar cultivos primarios y por las aplicaciones posteriores de la técnica en esta área de estudio.

Mediante la técnica de silenciamiento por siRNA se inhibió la expresión del TLR3 y con los resultados obtenidos, se establece que la replicación viral no se ve afectada por la inhibición en la expresión del TLR3 en las CDIs con las condiciones ensayadas en el presente trabajo. Sin embargo, el nivel de silenciamiento obtenido mantiene el 50% de la proteína, por lo tanto no es posible determinar si existe algún efecto en la replicación del virus del dengue a mayor nivel de silenciamiento.

Por otra parte, no hay diferencias significativas en cuanto a la localización nuclear del factor de transcripción IRF3, en ninguna de las condiciones probadas pero se detectaron diferencias en el nivel de expresión de dicho factor ya que las células no infectadas presentan un mayor nivel de expresión del IRF3 con respecto a las células infectadas. Lo que sugiere la inhibición en la expresión del IRF3 promovida por el virus del dengue en las CDIs.

PERSPECTIVAS

La inhibición de la expresión mediante siRNA es un método que ha tenido una enorme contribución en el conocimiento de las funciones en la relación virus célula huésped por lo que el mejorar su desempeño en el caso del silenciamiento del TLR3 sería importante para confirmar los resultados obtenidos hasta el momento.

Otra manera de confirmar el papel del TLR3 en la infección por dengue es la sobreexpresión de la proteína utilizando un plásmido y permitiendo su expresión en las CDIs para posteriormente probar la eficiencia de la infección viral. También se podrían utilizar una dominante negativa para TLR3 con la finalidad de observar un efecto similar al de la inhibición de expresión del TLR3 y probar su efecto durante la infección por dengue.

Por otro lado, abordar el estudio de las implicaciones que podría tener la inhibición de la vía de señalización en la que interviene el IRF3 en la respuesta inmune contra el virus del dengue así como la manera en que se produce tal inhibición, nos darían valiosas claves en el conocimiento de la relación del virus con la célula huésped y contribuiría al desarrollo de terapias antivirales y vacunas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Agrawal, N., P. V. N. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, and S. K. Mukherjee.** 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:657-685.
- **Akira S.** 2003. Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **278**:38105-38108.
- **Akira, S., and K. Takeda.** 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:499-511.
- **Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* **124**:783-801.
- **Aksoy, E., C. S. Zouain, F. Vanhoutte, J. Fontaine, N. Pavelka, N. Thieblemont, F. Willems, P. Ricciardi-Castagnoli, M. Goldman, M. Capron, B. Ryffel, and F. Trottein.** 2005. Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **280**:277-283.
- **Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell.** 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* **413**:732-738.
- **Alvarez, D. E., M. F. Lodeiro, S. J. Luduena, L. I. Pietrasanta, and A. V. Gamarnik.** 2005. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* **79**:6631-6643.
- **Arrighi, J. F., M. Pion, M. Wiznerowicz, T. B. Geijtenbeek, E. Garcia, S. Abraham, F. Leuba, V. Dutoit, O. Ducrey-Rundquist, Y. van Kooyk, D. Trono, and V. Piguet.** 2004. Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J. Virol.* **78**:10848-108755.
- **Avirutnan, P., P. Malasit, B. Seliger, S. Bhakdi, and M. Husmann.** 1998. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J. Immunol.* **161**:6338-6346.

- **Bell, J. K., J. Askins, P. R. Hall, D. R. Davies, and D. M. Segal.** 2006. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**:8792-8797.
- **Bente, D. A., M. W. Melkus, J. V. Garcia, and R. Rico-Hesse.** 2005. Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J. Virol.* **79**:13797-13799.
- **Beutler, B.** 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* **430**:257-263.
- **Boehme, K. W., and T. Compton.** 2004. Innate Sensing of Viruses by Toll-Like Receptors. *J. Virol.* **78**:7867-7873.
- **Bonnet, M. C., R. Weil, E. Dam, A. G. Hovanessian, and E. F. Meurs.** 2000. PKR stimulates NF- κ B irrespective of its kinase function by interacting with the I κ B kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 4532 - 4542.
- **Bridge, A. J., S. Pebernard, A. Ducraux, A. L. Nicoulaz, and R. Iggo.** 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* **34**:263-264.
- **Chen, Y., T. Magurie, R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. D. Esko, R. J. Linhardt, and R. M. Marks.** 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* **3**:866–871.
- **Chen, Y.-C., and S.-Y. Wang.** 2002. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J. Virol.* **76**:9877-9887.
- **Chu, J. J. H., and M. L. Ng.** 2004. Infectious entry of west nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* **78**:10543–10555.
- **Clyde, K., J. L. Kyle, and E. Harris.** 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.* **80**:11418-11431.
- **Cologna, R., and R. Rico-Hesse.** 2003. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J. Virol.* **77**:3929-3938.

- **Cuellar- Avila, A., C. Cifuentes-Rojas, y J. M. González-Escobar.** 2004. Generación in vitro de células dendríticas humanas de origen mieloide. *Univ. Scient.* **9**:57-67.
- **Diamond, M. S., and R. S. Klein.** 2004. West Nile virus: crossing the blood-brain barrier. *Nat. Med.* **10**:1294-1295.
- **Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa.** 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.* **303**:1529-1531.
- **Douagi, I., G. M. McInerney, A. S. Hidmark, V. Miriallis, K. Johansen, L. Svensson, and G. B. Karlsson Hedestam.** 2007. Role of interferon regulatory factor 3 in type I interferon responses in rotavirus-infected dendritic cells and fibroblasts. *J. Virol.* **81**:2758-2768.
- **Edelmann, K. H., S. Richardson-Burns, L. Alexopoulou, K. L. Tyler, R. A. Flavell, and M. B. Oldstone.** 2004. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology.* **322**:231-238.
- **Elco, C. P., J. M. Guenther, B. R. G. Williams, and G. C. Sen.** 2005. Analysis of genes induced by sendai virus infection of mutant cell lines reveals essential roles of interferon regulatory factor 3, NF- κ B, and interferon but not Toll-like receptor 3. *J. Virol.* **79**:3920-3929.
- **Falvo, J. V., B. S. Parekh, C. H. Lin, E. Fraenkel, and T. Maniatis.** 2000. Assembly of a functional beta interferon enhanceosome is dependent on ATF-2-c-jun heterodimer orientation. *Mol. Cell. Biol.* **20**:4814-4825.
- **Filomatori, C. V., M. F. Lodeiro, D. E. Alvarez, M. M. Samsa, L. Pietrasanta, and A. V. Gamarnik.** 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* **20**:2238-2249.
- **Fischer, F. R., Y. Luo, M. Luo, L. Santambrogio, and M. E. Dorf.** 2001. RANTES-induced chemokine cascade in dendritic cells. *J. Immunol.* **167**:1637-1643.
- **Fredericksen, B. L., M. Smith, M. G. Katze, P. Y. Shi, and M. Gale.** 2004. The host response to West Nile Virus infection limits viral spread through

the activation of the interferon regulatory factor 3 pathway. *J. Virol.* **78**:7737-7747.

- **Fredericksen, B. L., and M. Gale.** 2006. West Nile virus evades activation of interferon regulatory factor 3 through RIG-I-dependent and -independent pathways without antagonizing host defense signaling. *J. Virol.* **80**:2913-2923.
- **Gibbons, R. V., and D. W. Vaughn.** 2002. Dengue: an escalating problem. *Bmj.* **324**:1563-1566.
- **Gowen, B. B., J. D. Hoopes, M. H. Wong, K. H. Jung, K. C. Isakson, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and R. W. Sidwell.** 2006. TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to Phlebovirus infection. *J. Immunol.* **177**:6301-6307.
- **Guillot, L., R. Le Goffic, S. Bloch, N. Escriou, S. Akira, M. Chignard, and M. Si-Tahar.** 2005. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J. Biol. Chem.* **280**:5571-5580.
- **Hallman, M., M. Rämert, and R. A. Ezekowitz.** 2001. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr. Res.* **50**:315-321.
- **Hardarson, H. S., J. S. Baker, Z. Yang, E. Purevjav, C. H. Huang, L. Alexopoulou, N. Li, R. A. Flavell, N. E. Bowles, and J. G. Vallejo.** 2007. Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**:H251-H258.
- **Hewson, C. A., A. Jardine, M. R. Edwards, V. Laza-Stanca, and S. L. Johnston.** 2005. Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J. Virol.* **79**:12273-12279.
- **Hidmark, A. S., G. M. McInerney, E. K. Nordstrom, I. Douagi, K. M. Werner, P. Liljestrom, and G. B. Karlsson Hedestam.** 2005. Early alpha/beta interferon production by myeloid dendritic cells in response to

UV-inactivated virus requires viral entry and interferon regulatory factor 3 but not MyD88. *J. Virol.* **79**:10376-10385.

- Hill, J. A., T. E. Ichim, K. P. Kusznierek, M. Li, X. Huang, X. Yan, R. Zhong, E. Cairns, D. A. Bell, and W. P. Min. 2003. Immune modulation by silencing IL-12 production in dendritic cells using small interfering RNA. *J. Immunol.* **171**:691-696.
- Ho, L. J., J. J. Wang, M. F. Shaio, C. L. Kao, D. M. Chang, S. W. Han, and J. H. Lai. 2001. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J. Immunol.* **166**:1499-1506.
- Ho, L. J., L. F. Hung, C. Y. Weng, W. L. Wu, P. Chou, Y. L. Lin, D. M. Chang, T. Y. Tai, and J. H. Lai. 2005. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J. Immunol.* **174**:8163-8172.
- Honda, K., H. Yanai, A. Takaoka, and T. Taniguchi. 2005. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int. Immunol.* **17**:1367-1378.
- Huang, Y. H., C. C. Liu, S. T. Wang, H. Y. Lei, H. S. Liu, Y. S. Lin, H. L. Wu, and T. M. Yeh. 2001. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *J. Med. Virol.* **63**:247-251.
- Huang, Y.H., H. Y. Lei, H. S. Liu, Y. S. Lin, S. H. Chen, C. C. Liu, and T. M. Yeh. 2003. Tissue plasminogen activator induced by dengue virus infection of human endothelial cells. *J. Med. Virol.* **70**:610-616.
- Itaya, A., X. Zhong, R. Bundschuh, Y. Qi, Y. Wang, R. Takeda, A. R. Harris, C. Molina, R. S. Nelson, and B. Ding. 2007. A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J. Virol.* **81**:2980-2994.
- Jan, J. T., B. H. Chen, S. H. Ma, C. I. Liu, H. P. Tsai, H. C. Wu, S. Y. Jiang, K. D. Yang, and M. F. Shaio. 2000. Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kappaB are sequentially involved. *J. Virol.* **74**:8680-8691.

- **Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik.** 2001. Immunobiology. Garland Science. [Online.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=imm.TOC&depth=2>. Accessed 21 August 2006.
- **Jindadamrongwech, S., C. Thepparit, and D. R. Smith.** 2004. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch. Virol.* **149**:915-927.
- **Jones, M., A. Davidson, L. Hibbert, P. Gruenwald, J. Schlaak, S. Ball, G. R. Foster, and M. Jacobs.** 2005. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J. Virol.* **79**:5414-5420.
- **Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu.** 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* **194**:863-869.
- **Karikó, K., P. Bhuyan, J. Capodici, and D. Weissman.** 2004. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J. Immunol.* **172**:6545-6549.
- **Karikó, K., H. Ni, J. Capodici, M. Lamphier, and D. Weissman.** 2004. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* **279**:12542-12550.
- **Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira.** 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* **6**:981-988.
- **Kim, T., T. Y. Kim, W. G. Lee, J. Yim, and T. K. Kim.** 2000. Signaling pathways to the assembly of an interferon-beta enhanceosome. Chemical genetic studies with a small molecule. *J. Biol. Chem.* **275**:16910-16917.
- **Kim, V. N.** 2005. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol. Cells.* **19**:1-15.

- **Koonin, E. V.**, 1993. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J. Gen. Virol.* **74**:733-740.
- **Krishnan, M. N., B. Sukumaran, U. Pal, H. Agaisse, J. L. Murray, T. W. Hodge, and E. Fikrig.** 2007. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *J. Virol.* **81**:4881-4885.
- **Kwan, W. H., A. M. Helt, C. Marañón, J. B. Barbaroux, A. Hosmalin, E. Harris, W. H. Fridman, and C. G. Mueller.** 2005. Dendritic cell precursors are permissive to dengue virus and human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **79**:7291-7299.
- **Le Goffic, R., V. Balloy, M. Lagranderie, L. Alexopoulou, N. Escriou, R. Flavell, M. Chignard, and M. Si-Tahar.** 2006. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog.* **2**:e53.
- **Lei, H. Y., T.-M. Yeh, H.-S. Liu, Y.-S. Lin, S.-H. Chen, and C.-C. Liu.** 2001. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J. Biomed. Sci.* **8**:377-388.
- **Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale Jr., and S. M. Lemon.** 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**:2992-2997.
- **Li, K., Z. Chen, N. Kato, M. Gale Jr., and S. M. Lemon.** 2005. Distinct poly(I-C) and virus-activated signaling pathways leading to interferon-beta production in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **280**:16739-16747.
- **Lin, C. F., H. Y. Lei, A. L. Shiau, C. C. Liu, H. S. Liu, T. M. Yeh, S. H. Chen, and Y. S. Lin.** 2003. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J. Med. Virol.* **69**:82-90.
- **Lin, C. F., S. C. Chiu, Y. L. Hsiao, S. W. Wan, H. Y. Lei, A. L. Shiau, H. S. Liu, T. M. Yeh, S. H. Chen, C. C. Liu, and Y. S. Lin.** 2005. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J. Immunol.* **174**:395-403.

- **Lindenbach, B. D., and C. M. Rice.** 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* **59**:23-61.
- **López, C. B., J. S. Yount, and T. M. Moran.** 2006. Toll-like receptor-independent triggering of dendritic cell maturation by viruses. *J. Virol.* **80**:3128-3134.
- **López, T., M. Camacho, M. Zayas, R. Nájera, R. Sánchez, C. F. Arias, and S. López.** 2005. Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J. Virol.* **79**:184-192.
- **Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, and R. A. Flavell.** 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**:5598-5603.
- **Luplertlop, N., D. Missé, D. Bray, V. Deleuze, J. P. Gonzalez, V. Leardkamolkarn, H. Yssel, and F. Veas.** 2006. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep.* **7**:1176-1181.
- **Malmgaard, L., J. Melchjorsen, A. G. Bowie, S. C. Mogensen, and S. R. Paludan.** 2004. Viral activation of macrophages through TLR-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* **173**:6890-6898.
- **Marianneau, P., A. Cardona, L. Edelman, V. Deubel, and P. Desprès.** 1997. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *J. Virol.* **71**:3244-3249.
- **Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya.** 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **171**:3154-3162.
- **Matsumoto, M., K. Funami, H. Oshiumi, and T. Seya.** 2004. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol. Immunol.* **48**:147-154.
- **Michiels, A., S. Tuyaerts, A. Bonehill, J. Corthals, K. Breckpot, C. Heirman, S. Van Meirvenne, M. Dullaers, S. Allard, F. Bresseur, P. van der Bruggen, and K. Thielemans.** 2005. Electroporation of immature and

mature dendritic cells: implications for dendritic cell-based vaccines. *Gene Ther.* **12**:772-782.

- **Moustakas, A., and C. H. Heldin.** 2003. Ecsit-ement on the crossroads of Toll and BMP signal transduction. *Genes Dev.* **17**:2855-2859.
- **Muñoz-Jordán, J. L., G. G. Sánchez-Burgos, M. Laurent-Rolle, and A. García-Sastre.** 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:14333-14338.
- **Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani.** 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* **164**:5998-6004.
- **Navarro-Sanchez, E., R. Altmeyer, A. Amara, O. Schwartz, F. Fieschi, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and P. Desprès.** 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* **4**:723-728.
- **Navarro-Sánchez, E., P. Desprès, and L. Cedillo-Barrón.** 2005. Innate immune responses to dengue virus. *Arch. Med. Res.* **36**:425-435.
- **Nishiya, T., E. Kajita, S. Miwa, and A. L. DeFranco.** 2005. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J. Biol. Chem.* **280**:37107-37117.
- **Okahira, S., F. Nishikawa, S. Nishikawa, T. Akazawa, T. Seya, and M. Matsumoto.** 2005. Interferon-beta induction through toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell Biol.* **24**:614-623.
- **Osterlund, P., V. Veckman, J. Siren, K. M. Klucher, J. Hiscott, S. Matikainen, and I. Julkunen.** 2005. Gene expression and antiviral activity of alpha/beta interferons and interleukin-29 in virus-infected human myeloid dendritic cells. *J. Virol.* **79**:9608-9617.

- **Palmer, D. R., P. Sun, C. Celluzzi, J. Bisbing, S. Pang, W. Sun, M. A. Marovich, and T. Burgess.** 2005. Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *J. Virol.* **79**:2432-2439.
- **Pei, Y., and T. Tuschl.** 2006. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat. Methods.* **3**:670-676.
- **Peng, T., S. Kotla, R. E. Bumgarner, and K. E. Gustin.** 2006. Human rhinovirus attenuates the type I interferon response by disrupting activation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* **80**:5021-5031.
- **Ramakrishna, V., J. P. Vasilakos, J. D. Tario Jr, M. A. Berger, P. K. Wallace, and T. Keler.** 2007. Toll-like receptor activation enhances cell-mediated immunity induced by an antibody vaccine targeting human dendritic cells. *J. Transl. Med.* **5**:1-14.
- **Re, F., and J. L. Strominger.** 2004. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **173**:7548-7555.
- **Reyes-Del Valle, J., S. Chavez-Salinas, F. Medina, and R. M. Del Angel.** 2005. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol.* **79**:4557-4567.
- **Rice, C. M., E. M. Lenches, S. R. Eddy, S. J. Shin, R. L. Sheets, and J. H. Strauss.** 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science.* **229**:726-733.
- **Rothman, A. L.** 2004. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J. Clin. Invest.* **113**:946-951.
- **Rudd, B. D., E. Burstein, C. S. Duckett, X. Li, and N. W. Lukacs.** 2005. Differential role for TLR3 in respiratory syncytial virus-induced chemokine expression. *J. Virol.* **79**:3350-3357.
- **Samuel, C. E.** 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:778-809.

- **Samuel, M. A., J. D. Morrey, and M. S. Diamond.** 2007. Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. *J. Virol.* **81**:2614-2623.
- **Sánchez-Torres, C., G. S. García-Romo, M. A. Cornejo-Cortés, A. Rivas-Carvalho, and G. Sánchez-Schmitz.** 2001. CD16⁺ and CD16⁻ human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4⁺ T cells. *Int. Immunol.* **13**:1571-1581.
- **Santini, S. M., C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio, and F. Belardelli.** 2000. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J. Exp. Med.* **191**: 1777-1788.
- **Sasai, M., M. Matsumoto, and T. Seya.** 2006. The kinase complex responsible for IRF-3-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells (mDC). *J. Biochem.* **139**:171-175.
- **Schröder, M., and A. G. Bowie.** 2005. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander?. *TRENDS in immunology.* **26**:462-468.
- **Shresta, S., K. L. Sharar, D. M. Prigozhin, H. M. Snider, P. R. Beatty, and E. Harris.** 2005. Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J. Immunol.* **175**:3946-3954.
- **Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yueh, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin, and J. H. Huang.** 2000. Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* **62**:224-232.
- **Sledz, C. A., M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, and B. R. G. Williams.** 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* **5**:834-839.
- **Stewart, S. A., D. M. Dykxhoorn, D. Palliser, H. Mizuno, E. Y. Yu, D. S. An, D. M. Sabatini, I. S. Chen, W. C. Hahn, P. A. Sharp, R. A. Weinberg, and C. D. Novina.** 2003. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA.* **9**:493-501.

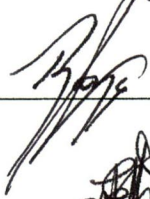
- **Suharti, C., E. C. M. van Gorp, T. E. Setiati, W. M. V. Dolmans, R. J. Djokomoeljanto, C. E. Hack, H. ten Cate, and J. W. M. van der Meer.** 2002. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue choque syndrome. *Thromb Haemost.* **87**:42-46.
- **Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and B. Beutler.** 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**:3516-3521.
- **Takeda, K., and S. Akira.** 2005. Toll-like receptor in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**:1-14.
- **Tassaneeritthep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumpfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger, and M. A. Marovich.** 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **197**:823-829.
- **Tuschl, T.** 2003. Mammalian RNA Interferente, p. 265-279. *In* G. J. Hannon (ed.), "RNAi, A Guide to Gene Silencing", Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Uchil, P. D., and V. Satchidanandam.** 2003. Architecture of the flaviviral replication complex. Protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane compartments. *J. Biol. Chem.* **278**:24388-24398.
- **Vogel, S. N., K. A. Fitzgerald, and M. J. Fenton.** 2003. TLRs differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol. Interv.* **3**:466-477.
- **Wagoner, J., M. Austin, J. Green, T. Imaizumi, A. Casola, A. Brasier, K. S. A. Khabar, T. Wakita, M. Gale, and S. J. Polyak.** 2007. Regulation of CXCL-8 (interleukin-8) induction by double-stranded RNA signaling pathways during hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **81**:309-318.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 28 de febrero del 2008, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Q.F.B. Sergio Isaac De La Cruz Hernández.

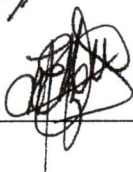
Dra. Martha Yocupicio Monroy



Dra. Rosa Ma. Del Ángel Núñez



Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez



Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Dr. Mauricio Castañón Arreola



Coordinación de Certificación y Registro

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno

Pedro Ahumada



TESIS URGENTES

REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTORICO MEXICO, D. F.

TEL. 5512-8469
PART. 2619-0742

PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.
SABADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.